UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant
Laboratoire EA4245 – T2i (Transplantation, Immunologie et Inflammation)

THÈSE présentée par :

Adélaïde DORAY

soutenue le : **24 juin 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**
Discipline/ Spécialité : Science de la vie et de la santé

Rôle de la protéine $Na_V\beta4$ dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses et non-cancéreuses

THÈSE dirigée par :

Monsieur ROGER Sébastien	Maître de Conférence, HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Madame DEFAMIE Norah	Maîtresse de Conférence, HDR, Université de Poitiers
Monsieur GAUTIER Mathieu	Professeur des Universités, Université de Picardie

PRÉSIDENT DU JURY :

Madame REVERDIAU Pascale	Professeure des Universités, Université de Tours

---

JURY :

Monsieur BARON Christophe	Professeur des Universités – praticien hospitalier, Université de Tours
Madame DEFAMIE Norah	Maîtresse de Conférence, HDR, Université de Poitiers
Monsieur GAUTIER Mathieu	Professeur des Universités, Université de Picardie
Monsieur RAPETTI-MAUSS Raphaël	Chargé de recherches, Université de Nice Sophia-Antipolis
Madame REVERDIAU Pascale	Professeure des Universités, Université de Tours
Monsieur ROGER Sébastien	Maître de Conférence, HDR, Université de Tours

Remerciements

Je souhaite remercier toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribuer à ce projet de thèse et qui m'ont soutenue pendant ces quatre années.

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, et maintenant directeur du laboratoire EA4245 Transplantation, Immunologie et Inflammation (T2i), le Dr Sébastien Roger, qui m'a encadrée et dirigée sur ce projet de thèse. Je te remercie de m'avoir permis et poussée à présenter ces travaux de recherche dans des congrès scientifiques et aussi d'avoir proposé la mobilité que j'ai effectuée à Copenhague, qui était une expérience très enrichissante.

Je souhaite également remercier la Dr Norah Défamie, le Pr Mathieu Gautier, le Pr Christophe Baron, le Dr Raphaël Rapetti-Mauss et la Pr Pascale Reverdiau d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Je remercie également le Pr Christophe Baron, ancien directeur du laboratoire EA4245 T2i, de m'avoir permis de réaliser mes travaux de thèse au sein du laboratoire. Je te remercie également pour toute ton aide et tes encouragements apportés sur ces derniers mois de thèse qui m'ont été très précieux.

Je remercie le Pr Stéphan Chevalier et le Dr Christophe Vandier, directeurs successifs du laboratoire UMR1069 Nutrition, Croissance et Cancer, dans lequel j'ai effectué ma première année de thèse, pour m'avoir permis d'effectuer mes premières expériences. Je souhaite aussi adresser mes remerciements à tous les membres présents et anciens de ce laboratoire qui ont pu me suivre et m'aider dans mes travaux de recherche. Un clin d'œil tout particulier à Lucie qui m'a fortement accompagnée tout au long de ma thèse. Merci infiniment pour tous tes conseils

scientifiques mais aussi personnels, j'espère que tu pourras concrétiser tous tes projets en cours et futurs.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres du laboratoire EA4245 T2i, pour leur bonne humeur et leur soutien pendant mes années de thèse. Merci à Carole Desplanches, notre secrétaire, pour ta réactivité et gentillesse, à Audrey, pour ton aide sur les dernières expériences, la gestion des commandes et ta bienveillance, à Stéphanie, pour tous tes conseils et ta bonne humeur, à Marie, pour nos nombreuses discussions, à Osbaldo, thank you so much for your positive mind, à Elodie, merci pour tes conseils et nos discussions en salle de culture, à Quentin, pour nos rigolades qui m'ont permis de me détendre un peu pendant cette thèse, à Roxane, merci pour ton aide à la plateforme BCR et ton écoute lors de nos dernières discussions, et à Thomas, je te souhaite plein de réussite pour ta thèse. Je remercie aussi tous les autres membres du laboratoire que j'ai pu rencontrer de près ou de loin.

Je souhaite également remercier la Pr. Stine F Pedersen de m'avoir accueillie avec bienveillance dans son laboratoire pendant un mois. Je remercie également Marc Severin, Michala Rolver et Katrine F. Mark pour leur encadrement et pédagogie notamment en culture cellulaire tridimensionnelle. Merci également pour votre sympathie, ce qui m'a permis d'avoir une très bonne expérience du Danemark.

Je tiens à remercier également les personnes qui m'ont soutenue et aidée pendant mes travaux de thèse, notamment les membres du laboratoire U1259 – MAVIVH, avec qui nous avons partagé les paillasses. Merci notamment à Stéphanie de m'avoir aidée sur les transformations bactériennes et aussi à Aurélie, Charline et Jade pour nos discussions de thésards.

Enfin, je remercie toutes les personnes de mon entourage pour leur soutien. Merci à mes amis, Adeline et Lucile, j'espère qu'on pourra se revoir bientôt et se faire une session triple cheese, Florentin, je ne te remercierais jamais assez pour ton aide scientifique sur les plasmides mais aussi de m'avoir présenté toutes ces personnes, en particulier une ;-), Nico, Aurélie, Arno, Micka, Lorène, Aous, Dorian, Johan, Dumila, Andréa, Cyril, Flo, Tatiana, Clémence, et les autres, merci à vous tous.

Enfin, merci à ma famille pour leur soutien pendant cette thèse. Et merci à ***toi***, d'être toujours là pour moi, quoi qu'il arrive.

Table des matières

Sommaire

INTRODUCTION **1**

I. Les Cancers **1**

A. Généralités 1

B. Le cancer du sein 2

1. Chiffres 2

2. Différents types de cancer du sein 5

C. Le cancer colorectal 7

1. Chiffres 7

II. Phénotype physiologique **9**

A. Le tissu épithélial 9

B. Jonctions cellulaires du tissu épithélial 10

III. Mécanismes de cancérisation **14**

A. Carcinogenèse 14

B. Étapes de la carcinogenèse 15

C. Les principaux gènes touchés pendant la carcinogenèse 17

D. Caractéristiques des cellules cancéreuses 19

E. La transition épithélio-mésenchymateuse et cancer 20

1. Régulation de la TEM 23

2. Les déterminants moléculaires de la TEM dans le cancer 24

3. La β-caténine, la TEM et le cancer 28

IV. Les sous-unités auxiliaires Navβ des canaux sodiques dépendants du voltage 33

A. Gènes codant pour les sous-unités Navβ 33
B. Structures des sous-unités Navβ 33
C. Modifications post-traductionnelles des sous-unités Navβ 35
1. Modifications post-traductionnelles par N-glycosylation 35
2. Modifications post-traductionnelles par phosphorylation 35
3. Modifications post-traductionnelles par clivages 36
D. Fonctions des sous-unités Navβ 38
1. Protéines auxiliaires des sous-unités Navα 38
2. Interactions avec d'autres canaux 40
3. Fonctions non-auxiliaires 40
a) Rôle d'adhésion cellulaire 40
b) Fonctions biologiques 42
4. Expression et rôles dans le cancer 43
a) Navβ1 44
b) Navβ2 46
c) Navβ3 47
d) Navβ4 48
e) Conclusion sur les sous-unités Navβ dans le cancer 50

OBJECTIFS DE LA THESE 55

MATERIEL ET METHODES 57

I. Culture cellulaire 57

II. Sélection des lignées cellulaires CRISPR/Cas9 Navβ4 58

III. Lignées cellulaires shARN Navβ4 59

IV. Production de « cystes » 60

V. Etude de la dégradation de la matrice extracellulaire 63

VI. Time lapse – suivi de migration individuelle 63

VII. Invasion / Migration cellulaire 64

VIII. Test de mesure de la viabilité cellulaire 65

IX. Test de prolifération cellulaire – EdU 66

X. PLA (Proximity Ligation Assay) 66

XI. Génération de plasmides de surexpression de *SCN4B* 67

XII. Transfection – siARN et surexpression de Naᵥβ4 69

XIII. Extraction ARN et RT-qPCR 70

XIV. Inhibition du protéasome 73

XV. Etude de l'activité de la RhoGTPase RhoA 73

XVI. Western blot 74

XVII. Analyse des images et statistiques 77

RESULTATS 79

I. Lignée épithéliale mammaire non cancéreuse MCF10A 79

A. Article scientifique soumis dans la revue Cells. 79

B. Absence de Naᵥ1.5 dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses MCF10A 117

C. La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses diminue la migration et l'invasion cellulaires en 2D 118

D. Les protéines Naᵥβ4 et β-caténine semble proche dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A 120
E. La sous-expression par siARN de *SCN4B* dans les cellules mammaires MCF10A ne modifie pas l'invasion cellulaire. 123
F. La surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires Crβ4 ne modifie pas l'expression de la protéine β-caténine. 125
G. La surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires MCF10A ne modifie pas l'expression de la protéine β-caténine. 127
H. La surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A diminue l'expression des marqueurs mésenchymateux vimentine et N-cadhérine. 132

II. Conséquence de la réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 135

A. Sélection des cellules mammaires cancéreuses MDA-MB-231 sous-exprimant Naᵥβ4 par la technique CRISPR/Cas9 135
B. La réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires cancéreuses augmente l'invasion cellulaire 138
C. La réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires cancéreuses diminue l'expression transcriptionnelle de *CTNNB1* et *CDH1* ... 140

III. Lignée de cellules colorectales cancéreuses HCT116-Luc..... 142

A. Sélection des lignées cellulaires colorectales cancéreuses HCT116-Luc sous exprimant *SCN4B* 142
B. La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules colorectales cancéreuses augmentent l'invasion cellulaire 144
C. La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules colorectales cancéreuses diminue le marqueur épithélial CDH1 et augmente certains marqueurs mésenchymateux 146

IV. Modulation de l'expression de Na$_V$β4 et de l'activité RhoA par la supplémentation en acide docosahexaénoïque (22:6 n-3) 148

DISCUSSION 151

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 161

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 167

Liste des Figures

Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers de la population mondiale en 2020. 2

Figure 2 : Incidence et mortalité du cancer du sein dans le monde en 2020 4

Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer colorectal dans le monde en 2020... 8

Figure 4 : Les différents sous-types d'épithélium de revêtement 10

Figure 5 : Jonctions intercellulaires majeures dans un épithélium 12

Figure 6 : Processus de cancérisation. 17

Figure 7 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses. 20

Figure 8 : Régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux lors de la TEM. 28

Figure 9 : Régulation de la TEM 31

Figure 10 : Alignement des séquences des sous-unités Na$_V$β. 34

Figure 11 : Représentations schématiques des modifications post-traductionnelles des sous-unités Na$_V$β. 37

Figure 12 : Représentation schématique de la culture cellulaire tridimensionnelle de cystes. 61

Figure 13 : Représentation schématique des différentes constructions réalisées pour le gène *SCN4B* 68

Figure 14 : Absence d'expression de Na$_V$1.5 dans la lignée de cellules mammaires non cancéreuses et forte expression dans les cellules tumorales 117

Figure 15 : La réduction de *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses diminue la mobilité, la migration et la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire en 2D 119

Figure 16 : Etude de la proximité entre les protéines Naᵥβ4 et β-caténine dans les cellules mammaires non cancéreuses..... 122

Figure 17 : La sous-expression de *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses ne modifie pas l'invasion cellulaire..... 124

Figure 18 : La surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses Crβ4 ne modifie pas l'expression de la *CTNNB1*/β-caténine 126

Figure 19 : Vérification de la surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A..... 128

Figure 20 : La surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A ne modifie pas l'expression de la *CTNNB1/*β-caténine. 130

Figure 21 : La surexpression du gène *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A WT diminue l'expression transcriptionnelle de *VIM* et *CDH2* 133

Figure 22 : Inhibition de l'expression de Naᵥβ4 dans les 3 clones CRISPR #3 à #5 sélectionnés de MDA-MB-231..... 136

Figure 23 : La réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires cancéreuses augmente la mobilité et la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire en 2D 139

Figure 24 : La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 diminue l'expression de *CTNNB1* et *CDH1* 141

Figure 25 : Inhibition de l'expression de Naᵥβ4 dans les cellules shNaᵥβ4 #2 de HCT116-Luc..... 143

Figure 26 : La réduction de Naᵥβ4 dans les cellules colorectales cancéreuses augmente la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire en 2D 144

Figure 27 : La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules colorectales cancéreuses HCT116-Luc shNa$_V$β4 #2 diminue le marqueur épithélial *CDH1* et augmente certains marqueurs mésenchymateux 147

Figure 28 : La supplémentation en DHA augmente l'expression protéique de Na$_V$β4 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. 149

Figure 29 : La supplémentation en DHA diminue l'activité de la RhoGTPase RhoA dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. 150

Liste des tableaux

Tableau 1 : Expression des principaux marqueurs protéiques des phénotypes épithéliaux et mésenchymateux 27

Tableau 2 : Les sous-unités Na$_V$β dans les cancers 51

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR 72

Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude des protéines d'intérêt..... 76

Listes des publication, communications, et mobilité

Publication soumise intégrée à la thèse

Adélaïde DORAY[1], Roxane LEMOINE[1], Marc SEVERIN[2], Stéphanie CHADET[1], Osbaldo LOPEZ-CHARCAS[1], Audrey HÉRAUD[1], Christophe BARON[1], Pierre BESSON[1], Arnaud MONTEIL[3], Stine Falsig PEDERSEN[2] & Sébastien ROGER[1,4§]. The voltage-gated sodium channel beta4 subunit maintains epithelial phenotype in mammary cells. 2021, soumise dans la revue Cells.

Communications orales

Adélaïde Doray, Lucie Brisson, Stéphanie Chadet, Lucile Poisson, Osbaldo Lopez Charcas, Caroline Goupille, Lobna Ouldamer, Christophe Baron, Pierre Besson, Sébastien Roger, The role of the auxiliary $Na_V\beta4$ subunit in maintaining epithelial phenotype. Septembre 2019, 30th Ion Channel Meeting, Sète (France)

Adélaïde Doray, Lucie Brisson, Stéphanie Chadet, Lucile Poisson, Osbaldo Lopez Charcas, Caroline Goupille, Lobna Ouldamer, Christophe Baron, Pierre Besson, Sébastien Roger, The role of the auxiliary $Na_V\beta4$ subunit in maintaining epithelial phenotype. Novembre 2019, consortium 4th meeting Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of epithelial cancers, Tours (France)

Communications affichées

Adélaïde Doray, Lucie Brisson, Stéphanie Chadet, Lucile Poisson, Osbaldo Lopez Charcas, Caroline Goupille, Lobna Ouldamer, Christophe Baron, Pierre Besson, Sébastien Roger, Rôle de la sous-unité auxiliaire Na$_v$β4 dans le maintien d'un phénotype épithélial. Octobre 2019, 32e Colloque Biotechnocentre, Seillac (France)
Prix pour la meilleure affiche

Adélaïde Doray, Lucie Brisson, Stéphanie Chadet, Lucile Poisson, Osbaldo Lopez Charcas, Caroline Goupille, Lobna Ouldamer, Christophe Baron, Pierre Besson, Sébastien Roger, Rôle de la sous-unité auxiliaire Na$_v$β4 dans le maintien d'un phénotype épithélial. Décembre 2019, Journée recherche biomédicale, Tours (France)

Mobilité

Laboratoire de la Pr. Stine F. Pedersen à l'Université de Copenhague au Danemark du 1er juin 2019 au 30 juin 2019 pour l'apprentissage des techniques cellulaires tridimensionnelles

Liste des abréviations

2D : deux dimensions

3D : trois dimensions

ADN : acide désoxyribonucléique

Akt : protein kinase B

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messager

BACE1 : β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1

BRCA1/2 : gène 1 ou 2 du cancer du sein

CAM : cellular adhesion molecule ; molécule d'adhésion cellulaire

Crβ4 : CRISPR/Cas9 Na_Vβ4

DHA : acide docosahexaénoïque

EGF : epidermal growth factor ; facteur de croissance épidermique

Gap : jonctions communicantes

GSK3β : glycogen synthase kinase 3 beta

GTP : guanosine triphosphate

HEK : human embryonic kidney

HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain

Ig : immunoglobuline

IP_3 : inositol 1,4,5-trisphosphate

K_V : canaux potassiques dépendants du voltage

MLH1 : MutL homolog 1

MMPs : métalloprotéinases matricielles

MSH2 : MutS homolog 2

Na_V : canaux sodiques dépendants du voltage

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PI3K : phosphoinositide 3-kinases

PKC : protéine kinase C

PLA : Proximity Ligation Assay

RhoA : Ras homolog family member A

shARN : petit ARN en épingle à cheveux

siARN : petit ARN interférent

SMA : smooth muscle actin

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TGFβ : transforming growth factor beta

TME : transition mésenchymato-épithéliale

TTX : tétrodotoxine

ZO : Zonula Occludens

Introduction

I. Les Cancers

A. Généralités

De nos jours, les cancers sont un véritable fléau qui touchent les individus du monde entier. En effet, plus de 18 millions de nouveaux cancers seraient déclarés dans le monde chaque année, dont 382 000 nouveaux cas en France (chiffres de 2018 – santé publique France). Il existe trois grandes catégories de cancers : les carcinomes, se développant à partir des tissus épithéliaux, les sarcomes, apparaissant dans des tissus mous et de support, tels que les os ou les muscles par exemple, et les cancers hématopoïétiques, qui sont des cancers liquides, se développant dans le sang ou les organes lymphoïdes. Les cancers les plus fréquents dans le monde sont ceux du sein, de la prostate, du poumon, et le cancer colorectal, et les plus meurtriers sont le cancer du poumon, le cancer du sein et le cancer colorectal (Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ; Figure 1).

Ces travaux de thèse ont été plus particulièrement effectués sur le cancer du sein et le cancer colorectal. En effet, ces deux cancers sont parmi les plus fréquents et les plus meurtriers. Par ailleurs, il a aussi été montré que l'expression de la sous-unité Na$_V$β4 est diminuée de façon importante dans ces deux types de cancers (Bon *et al.*, 2016).

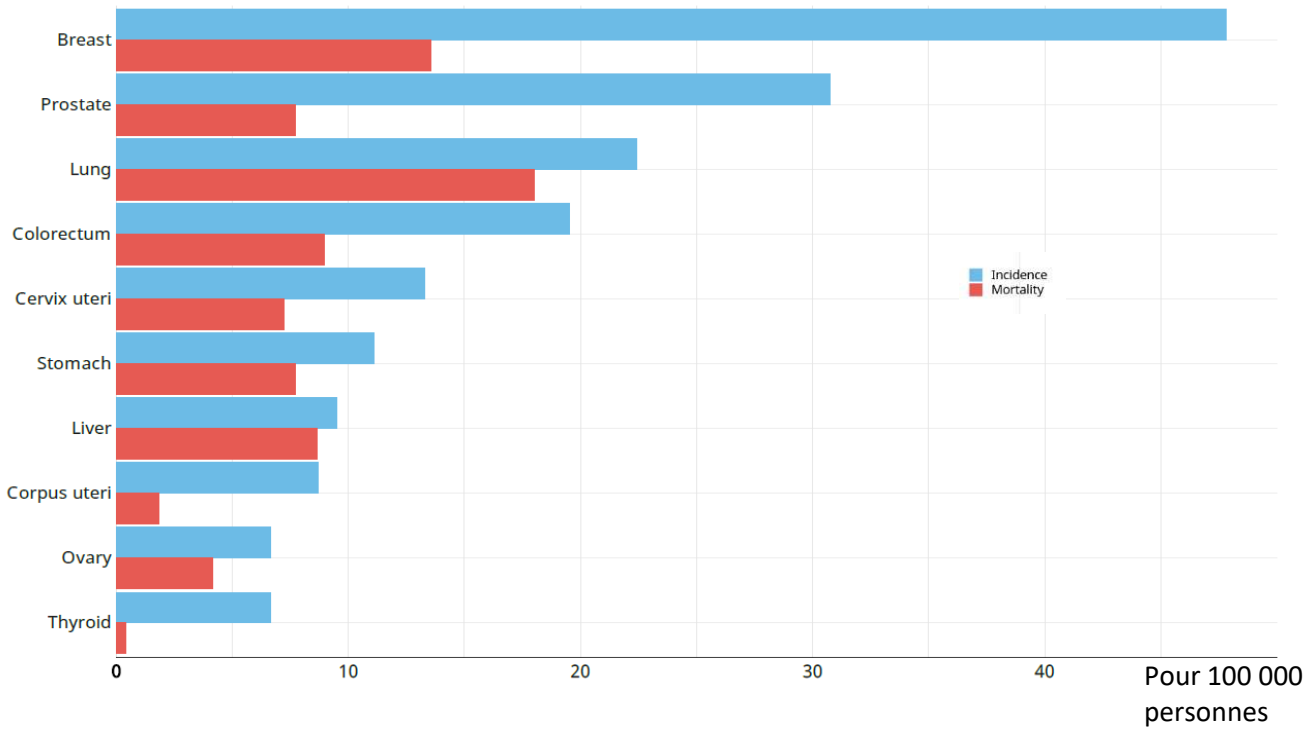


Figure 1 : Incidence et mortalité des cancers de la population mondiale en 2020.

Les principaux cancers les plus fréquents sont le cancer du sein, de la prostate et du poumon et le cancer colorectal. Les principaux cancers les plus meurtriers sont le cancer du poumon, le cancer du sein et le cancer colorectal (pour 100 000 personnes ; source : OMS (2020)).

B. Le cancer du sein

1. Chiffres

Près de 60 000 nouveaux cas de cancer du sein ont été déclarés en 2020, ce qui fait de ce cancer le plus répandu en France tous sexes et âges confondus. C'est également le cancer le plus meurtrier chez les femmes (15,6 pour 100 000 personnes ; source de l'OMS). Il est important de noter que ce cancer peut également survenir chez les hommes, même si cela reste rare (environ 1% des cas de cancer du sein ; site internet de la Ligue contre le cancer).

Ce cancer est plus répandu dans les pays industrialisés (Figure 2), ce qui peut s'expliquer par certains modes de vie, comme la consommation de tabac et d'alcool, le surpoids ou le manque d'activité physique. D'autres facteurs de risque non liés à ces modes de vie peuvent aussi être précurseur de cancer du sein, tels que l'âge, des prédispositions génétiques ou encore des antécédents médicaux (site internet de santé publique France).

Les dépistages de cancer du sein se sont améliorés au fur et à mesure des avancées technologiques et scientifiques, notamment par des dépistages par mammographie organisés à partir de 50 ans permettant alors une prise en charge de cette maladie plus précoce et rapide, et éviter ainsi des formes plus agressives. De nos jours, 5 ans après le diagnostic d'un cancer du sein, la survie est de 87% ; la survie à 10 ans reste bonne et est de 76% (site internet de l'Institut National du Cancer – chiffres de 2021). Cependant, dans les pays sous-développés, la mortalité due à ce cancer est plus élevée, probablement à cause d'un diagnostic plus tardif ainsi qu'une prise en charge moins efficace (Figure 2).

Les principales thérapies du cancer du sein sont la chirurgie et la radiothérapie. Selon les types de cancers du sein, d'autres traitements peuvent être utilisés en complément comme, la chimiothérapie néoadjuvante (avant la chirurgie ou la radiothérapie), la chimiothérapie adjuvante (après la chirurgie ou la radiothérapie), la chimiothérapie utilisée en parallèle des principales techniques, l'hormonothérapie ou des traitements ciblés (site internet de la Ligue contre le cancer).

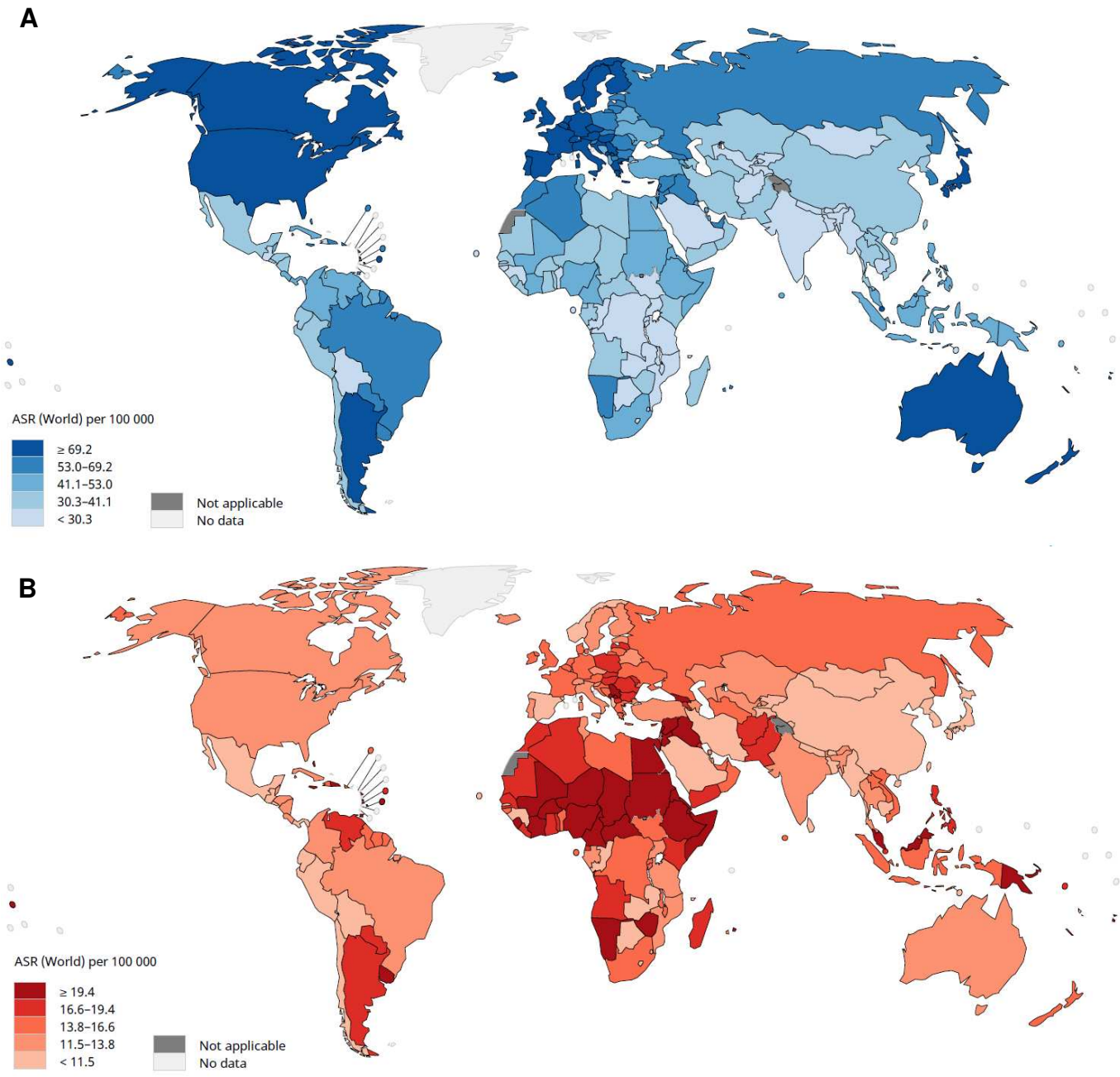


Figure 2 : Incidence et mortalité du cancer du sein dans le monde en 2020.

A. Le cancer du sein est plus fréquent dans les pays industrialisés et développés.

B. La mortalité due à ce cancer est plus importante dans les pays sous-développés (source : OMS (2020)).

2. Différents types de cancer du sein

Dans la majorité des cas de cancer du sein, il s'agit d'adénocarcinomes canalaires et lobulaires, c'est-à-dire que la tumeur se développe à partir de cellules épithéliales de la glande mammaire (les autres types de cancers qui touchent le sein sont la tumeur phyllode, le sarcome ou le lymphome). Parmi les adénocarcinomes, deux types de cancers sont distingués : les cancers dits *in situ* et les cancers infiltrants (site internet de l'Institut national du cancer).

Le cancer mammaire *in situ* se caractérise par la présence de cellules cancéreuses toujours situées dans la glande mammaire. À la différence des cancers *in situ*, les cancers infiltrants se caractérisent par une infiltration des tissus environnant la glande mammaire. Les cellules cancéreuses issues de ce type de cancer peuvent aussi se disséminer dans le réseau veineux ou lymphatique pour infiltrer d'autres organes, tels que les os, les poumons, le foie ou le cerveau, et former des tumeurs secondaires dans ces organes appelés métastases (site internet de l'Institut national du cancer).

Il existe différents sous-types moléculaires de cancers du sein :

- le luminal A,
- le luminal B,
- le HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) positif ou HER2 enrichi,
- et le triple-négatif.

Le luminal A est un cancer hormonodépendant et se caractérise par une augmentation de l'expression de récepteurs aux œstrogènes α. Il ne surexprime pas le récepteur HER2 (Marotti *et al.,* 2010). Il est de grade 1 ou 2. Ce sous-type de cancer est souvent synonyme de bon pronostic. Le luminal B est aussi un cancer hormonodépendant et également caractérisé par l'expression de récepteurs aux œstrogènes, mais dans une plus faible proportion que le luminal A. Il peut être HER2

positif ou négatif. Il est de grade 2 ou 3, dû à une prolifération accrue comparée au luminal A. Les cancers luminaux A et B sont les cancers du sein les plus fréquents.

Certains cancers du sein sont HER2 positif ou dits HER2 enrichi, c'est-à-dire que dans ce cas, les celles cancéreuses surexpriment le récepteur HER2. Ils n'expriment généralement pas les récepteurs hormonaux (ni aux œstrogènes, ni à la progestérone). Ceux-ci représentent environ 15 à 20% des cas de cancers du sein.

Enfin, les cancers du sein triple-négatifs sont les plus agressifs et sont donc de stade 3. Ils n'expriment ni les récepteurs aux hormones (œstrogènes et progestérone), ni les récepteurs HER2. Ce type de cancer du sein peut se caractériser par la présence de mutations sur les gènes *BRCA1* ou *BRCA2* (gène 1 ou 2 du cancer du sein). Les cancers du sein triple-négatifs sont souvent de mauvais pronostic, l'hormonothérapie ou les traitements ciblant le récepteur HER2 étant inefficaces (sites internet de la Ligue contre le cancer et de l'Institut Curie).

C. Le cancer colorectal

1. Chiffres

Le cancer colorectal, regroupant les cancers du côlon et du rectum, est l'un des cancers les plus répandus dans le monde avec près de 2 millions de cas en 2020. En France, en 2020, près de 50 000 nouveaux cas de cancer colorectal ont été estimés ; il est le troisième cancer le plus fréquent pour les hommes et le deuxième pour les femmes (derrière le cancer du sein ; OMS).

Comme c'est le cas pour le cancer du sein, le cancer colorectal présente une incidence plus élevée dans les pays industrialisés, ce qui peut être corrélé aux habitudes de vie (Figure 3 ; OMS). La mortalité due à ce cancer est importante dans certains pays, comme en Russie, en Espagne ou encore dans les pays de l'Est de l'Europe. En France, le cancer colorectal est le deuxième cancer le plus meurtrier avec environ 20 000 cas (OMS).

Cinq ans après le diagnostic de ce cancer, 63% des patients survivent ; la survie à 10 ans décroît et n'est que de 52%, ce qui est relativement faible (site internet de l'Institut National du Cancer – chiffres de 2021). Il est donc important de mieux comprendre l'origine du cancer colorectal et son développement afin d'améliorer les méthodes diagnostic et les thérapies.

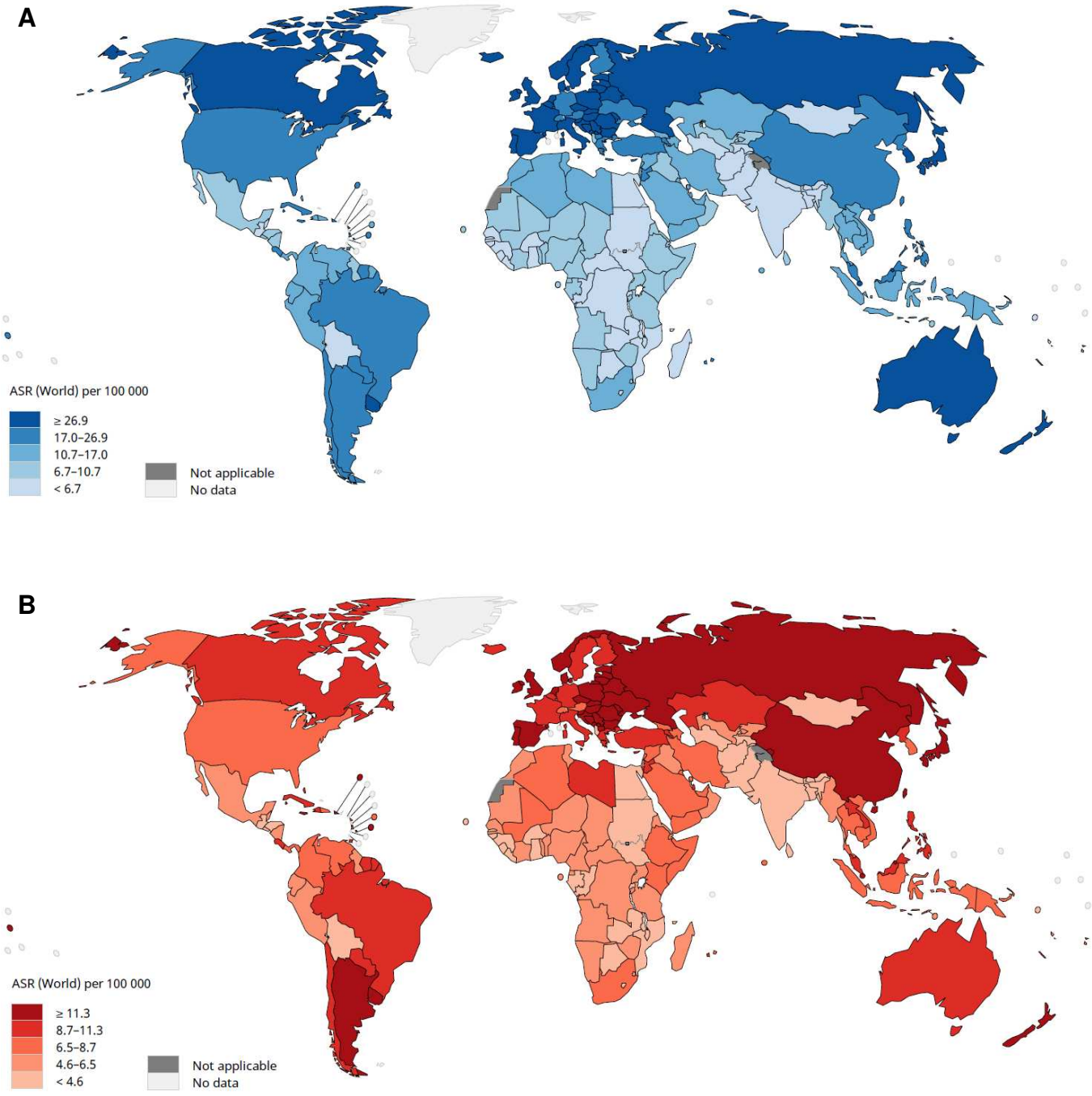


Figure 3 : Incidence et mortalité du cancer colorectal dans le monde en 2020.

A. Le cancer colorectal est plus fréquent dans les pays développés et industrialisés.

B. La mortalité due au cancer colorectal est plus importante dans certains pays comme la Russie, l'Espagne ou le Royaume-Uni (source : OMS (2020)).

II. Phénotype physiologique

A. Le tissu épithélial

Le tissu épithélial est constitué de cellules épithéliales polarisées, organisées, et liées les unes aux autres par de nombreuses interactions cellulaires : les jonctions serrées, les jonctions communicantes, les jonctions adhérentes et les desmosomes (Radisky, 2005 ; Thiery *et al.*, 2009). Ces interactions entre les cellules épithéliales leur permettent de maintenir une intégrité structurelle et fonctionnelle (Lee *et al.*, 2006 ; Kalluri, 2009). L'épithélium exerce plusieurs fonctions comme notamment la protection mécanique contre l'environnement extérieur, ou chimique contre des substances toxiques, la filtration et l'absorption de nutriments, la sécrétion, et l'excrétion.

Il existe deux types d'épithéliums au sein de l'organisme : les épithéliums de revêtement et les épithéliums glandulaires. Parmi les épithéliums de revêtement, recouvrant ou tapissant les surfaces et cavités du corps, plusieurs sous-types sont classifiés selon la forme des cellules qui les composent et de leur agencement (Figure 4) : l'épithélium simple pavimenteux (dans le péritoine) ou cubique (dans le rein), l'épithélium simple prismatique cilié (au niveau de la trompe utérine) ou non cilié (au niveau de l'intestin grêle), l'épithélium pseudostratifié prismatique (dans la trachée), l'épithélium stratifié pavimenteux (au niveau de l'épiderme), cubique (dans l'œsophage) ou prismatique (dans le pharynx), et enfin l'épithélium transitionnel (dans la vessie). Parmi les épithéliums glandulaires, deux sous-types sont distingués : les glandes endocrines, permettant la sécrétion d'hormones puis leur diffusion dans la circulation sanguine, et les glandes exocrines, libérant ses produits de sécrétion via des conduits, comme c'est le cas pour la glande mammaire (Tortora et Derrickson, 2017).

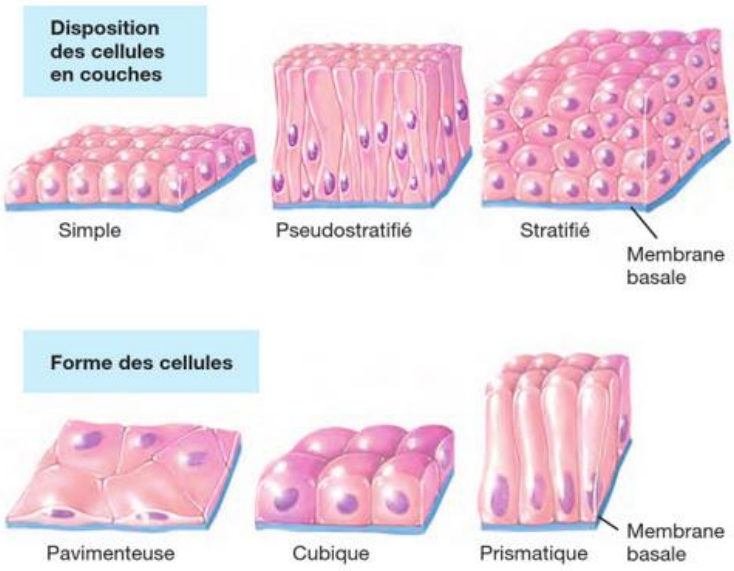


Figure 4 : Les différents sous-types d'épithélium de revêtement.

L'épithélium de revêtement est classifié en plusieurs sous-types : l'épithélium simple pavimenteux ou cubique, l'épithélium simple prismatique cilié ou non cilié, l'épithélium pseudostratifié prismatique, l'épithélium stratifié pavimenteux, cubique ou prismatique, et enfin l'épithélium transitionnel (Tortora et Derrickson, 2017).

B. Jonctions cellulaires du tissu épithélial

Les jonctions serrées sont des complexes où de nombreuses protéines agissent afin de permettre une étanchéité intercellulaire. Elles participent également à la polarité cellulaire épithéliale, en empêchant les protéines spécifiques de la membrane basale de rejoindre la membrane apicale et *vice versa*. Elles sont majoritairement composées de trois protéines : les occludines, les claudines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM junction adhesion molecule), liées à des protéines Zonula Occludens (ZO) (Figure 5 ; Schneeberger et Lynch, 2004).

Les jonctions communicantes, appelées aussi jonctions gap, sont des connections intercellulaires permettant aux cytoplasmes de deux cellules adjacentes d'être en contact et d'échanger une multitude de signaux, de second messagers, de métabolites, de molécules et d'ions, inférieurs à environ 1,2 kDa.

Elles permettent notamment de maintenir l'homéostasie tissulaire en maintenant les concentrations et le pH intracellulaire (Nielsen *et al.*, 2012). Ces échanges se font grâce à des protéines appelées les connexines. Six connexines s'arrangent entre elles afin de former un connexon, qui peut être homomérique ou hétéromérique s'il est formé de connexines différentes ou non, et qui constitue un hémi-canal. Le connexon d'une cellule peut s'associer à un autre connexon d'une cellule adjacente, formant alors un canal jonctionnel homotypique ou hétérotypique si ces deux connexons sont similaires ou non (Figure 5 ; Nielsen *et al.*, 2012). Depuis une cinquantaine d'années, les connexines ont été montrées pour être impliquées dans de nombreux cancers, comme par exemple la connexine 43 qui est impliquée dans le cancer du sein et du poumon et les glioblastomes (Aasen *et al.*, 2019 ; Chepied *et al.*, 2020).

Les jonctions adhérentes sont des structures dynamiques où un complexe, composé de E-cadhérine, β-caténine et α-caténine, joue un rôle de régulateur dynamique des filaments d'actine. En effet, la domaine intracellulaire de la E-cadhérine lie la β-caténine, qui est elle-même liée à une autre protéine, l'α-caténine. Ce complexe conduit à des jonctions adhérentes par la formation de filaments d'actine via cette dernière protéine de liaison (Baranwal et Alahari, 2009 ; Chen *et al.*, 2014). Enfin, des protéines de la famille des RhoGTPases (Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) et RhoA (Ras homolog family member A)), enzymes hydrolysant le GTP (guanosine triphosphate) en guanosine diphosphate (GDP), sont capables de réguler de manière négative les jonctions adhérentes par leur rôle bien connu sur la polymérisation de l'actine car les jonctions adhérentes nécessitent des filaments d'actine intacts (Niessen et Gottardi, 2008). Ainsi, l'ensemble de ces protéines régulées créent un processus dynamique et permet le maintien de l'intégrité épithéliale (Figure 5 ; Baum et Georgiou, 2011 ; Citi *et al.*, 2011).

Les desmosomes sont des structures responsables de l'adhésion intercellulaire, permettant une résistance aux forces mécaniques, composés d'un réseau de cadhérines, de protéines de liaison et de filaments intermédiaires de

kératine. En effet, ce complexe est constitué de desmogléines et de desmocollines qui appartiennent à la famille des cadhérines, pouvant se lier aux protéines de la famille des armadillo, permettant l'attachement des filaments intracellulaires aux protéines membranaires. Les protéines armadillo possèdent une répétition de séquence d'une quarantaine d'acides aminés formant des structures en hélice. La famille des protéines armadillo est constituée, entre autres, de la β-caténine, p120-caténine, plakoglobine et plakophililine. Celles-ci permettent d'ancrer les filaments de kératine à la membrane plasmique permettant ainsi l'adhérence cellulaire (Figure 5 ; Green *et al.,* 2019).

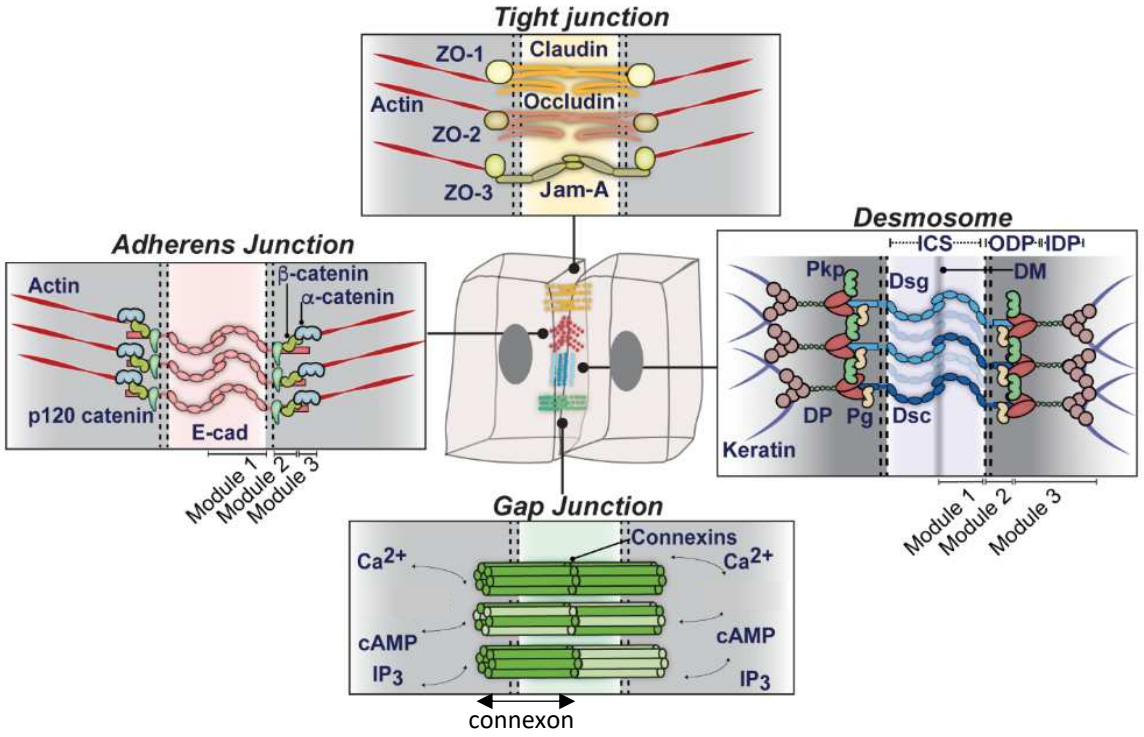


Figure 5 : Jonctions intercellulaires majeures dans un épithélium.

Les cellules épithéliales créent des interactions entre elles par différents types de jonctions : les jonctions adhérentes, les desmosomes, les jonctions serrées et les jonctions gap. Les jonctions adhérentes permettent l'ancrage du cytosquelette d'actine à des points d'adhésion intercellulaire, par l'interaction de plusieurs protéines (E-cadhérine, β- et α- caténines, p120 caténine). Dans les jonctions serrées, les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion jonctionnelle se

mobilisent à la formation de la barrière paracellulaire. Les protéines ZO permet la fortification de ce type de jonction. Dans les desmosomes, l'adhésion est réalisée par des cadhérines appelées desmogléines (Dsg) et desmocollines (Dsc), associées aux protéines plakoglobines (Pg), plakophilines (Pkp) et desmoplakine (DP) afin d'ancrer les filaments intermédiaires de kératine à la membrane. Enfin, les jonctions gap sont réalisées à partir de complexes de connexines, permettant le passage d'un flux d'ions, de petites molécules et de protéines entre les cellules épithéliales. (cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cad, cadherin; DM, dense midline; ICS, intercellular space; IDP, inner dense plaque; IP3, inositol trisphosphate; ODP, outer dense plaque) (modifié d'après Green et al., 2019).

Le tissu épithélial mammaire est également pourvu de ces jonctions intercellulaires, et plus particulièrement des jonctions serrées où les protéines ZO sont exprimées et sont dérégulées négativement dans le cancer du sein (Itoh et Bissell, 2003 ; Lanigan *et al*., 2007). Ce tissu épithélial exprime également la E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes, permettant le maintien de l'intégrité épithélial (Bruner et Derksen, 2018). Les connexines 26 et 43 sont exprimées au niveau des jonctions communicantes du tissu épithélial mammaire (Monaghan et al., 1996).

Le tissu épithélial colorectal est aussi caractérisé par les jonctions serrées, les jonctions adhérentes où la E-cadhérine est exprimée, les desmosomes, et les jonctions communicantes où la connexine 43 est également exprimée (Zahraoui, 2004 ; Laukoetteret *al*., 2006 ; Zouiten-Mekki *et al*., 2013 ; Bruner et Derksen, 2018).

III. Mécanismes de cancérisation

A. Carcinogenèse

Une tumeur est un ensemble de cellules indifférenciées qui, échappant au contrôle de l'organisme, se multiplient indéfiniment, envahissent les tissus voisins en les détruisant, et se répandent dans l'organisme en métastases. Différents mécanismes, causés par une dérégulation de plusieurs gènes, sont responsables, d'abord de l'altération des cellules saines, puis de leur prolifération incontrôlée et enfin de leur échappement du tissu d'origine. Ce sont respectivement les étapes d'initiation, de promotion et de dissémination, appelée aussi progression cancéreuse (Farber, 1984). Les cellules de l'organisme sont soumises à un équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Lorsque cet équilibre est dérégulé, cela conduit notamment à une prolifération cellulaire accrue, entrainant une cascade d'évènements menant à la cancérisation ; une tumeur peut alors se développer et les patients peuvent développer un cancer (Farber, 1984).

B. Étapes de la carcinogenèse

Le mécanisme de cancérisation ou la carcinogenèse se fait en plusieurs étapes (Figure 6).

La première étape est l'**initiation cancéreuse** qui se caractérise par l'altération du génome d'une cellule saine par, entre autres, l'apparition et la conservation de mutations dans différents gènes clés, comme des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 6 ; Cerda-Troncoso *et al.*, 2021).

La seconde étape, appelée la **promotion cancéreuse**, se caractérise par la prolifération de cette cellule endommagée suite à sa ou ses lésion(s) de l'ADN (acide désoxyribonucléique ; Figure 6). Les mutations activatrices des proto-oncogènes ou/et inhibitrices des gènes suppresseurs de tumeurs favorisent cette prolifération qui conduit à un amas de cellules endommagées formant une tumeur (Cerda-Troncoso *et al.*, 2021).

La troisième étape est la **progression cancéreuse** (Figure 6). Lorsque la tumeur devient trop volumineuse, les cellules situées au centre sont éloignées des vaisseaux et capillaires sanguins et se trouvent alors en hypoxie. Ces cellules envoient donc des signaux afin de générer de nouveaux vaisseaux sanguins, notamment le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). Ce facteur pro-angiogénique se fixe alors sur son récepteur tyrosine kinase (VEGFR) sur les cellules endothéliales et favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ces derniers irriguent alors la tumeur qui peut continuer à se développer. C'est le processus d'angiogenèse. Les cellules se trouvant en hypoxie surexpriment également les facteurs induit par l'hypoxie (HIFs) qui jouent un rôle dans l'angiogenèse, la survie, l'invasion et le métabolisme cellulaire. Cette étape impacte également le métabolisme des cellules tumorales. En effet, les cellules

tumorales utilisent le glucose, comme la majorité des cellules différenciées, comme source d'énergie pour favoriser la croissance et la survie cellulaire. En 1930, le biochimiste O. Warburg a décrit que le glucose est catabolisé en ATP (adénosine triphosphate), sous oxygène, par la glycolyse aérobie. Cette capacité cellulaire de préférer la glycolyse au lieu de la phosphorylation oxydative mitochondriale est appelée l'« effet Warburg » (Warburg, 1930). Lorsque ces cellules se trouvent en hypoxie, donc ayant un accès à l'oxygène restreint, celles-ci produisent de l'énergie par la glycolyse anaérobie, produisant alors en majorité du lactate et une faible proportion d'ATP. La consommation en glucose est donc plus importante sous hypoxie pour les cellules cancéreuses. Lorsque le glucose n'est plus disponible, les cellules n'ont plus d'apport énergétique et peuvent mourir (Vander Heiden *et al.*, 2009). Durant cette étape, les cellules subissent d'autres mutations des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, en faveur d'une prolifération accrue et anarchique tout en échappant à l'apoptose. Les cellules acquièrent également une indépendance vis-à-vis des signaux qui peuvent la réguler tels que les facteurs de croissance et les signaux pro-apoptotiques (Hanahan et Weinberg, 2000).

Enfin, la dernière étape est la **dissémination cancéreuse** ou cascade métastatique (Figure 6). La tumeur évoluait jusqu'alors localement, au niveau du tissu dans lequel la première cellule a été altérée. Mais, les cellules acquièrent des capacités de malignité suite à d'autres modifications génétiques, notamment des capacités exacerbées de migration et de dégradation de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, les cellules subissent la transition épithélio-mésenchymateuse, conduisant à l'activation de diverses voies de signalisation favorisant, entre autres, la migration et l'invasion cellulaire (chapitre §III, E). Ces évènements permettent aux cellules de s'étendre dans les tissus sains voisins par les réseaux sanguin et lymphatique (intravasation des cellules). Les cellules altérées peuvent alors envahir

et se développer dans d'autres organes (extravasation des cellules) aboutissant à des foyers métastatiques (Cerda-Troncoso *et al.*, 2021).

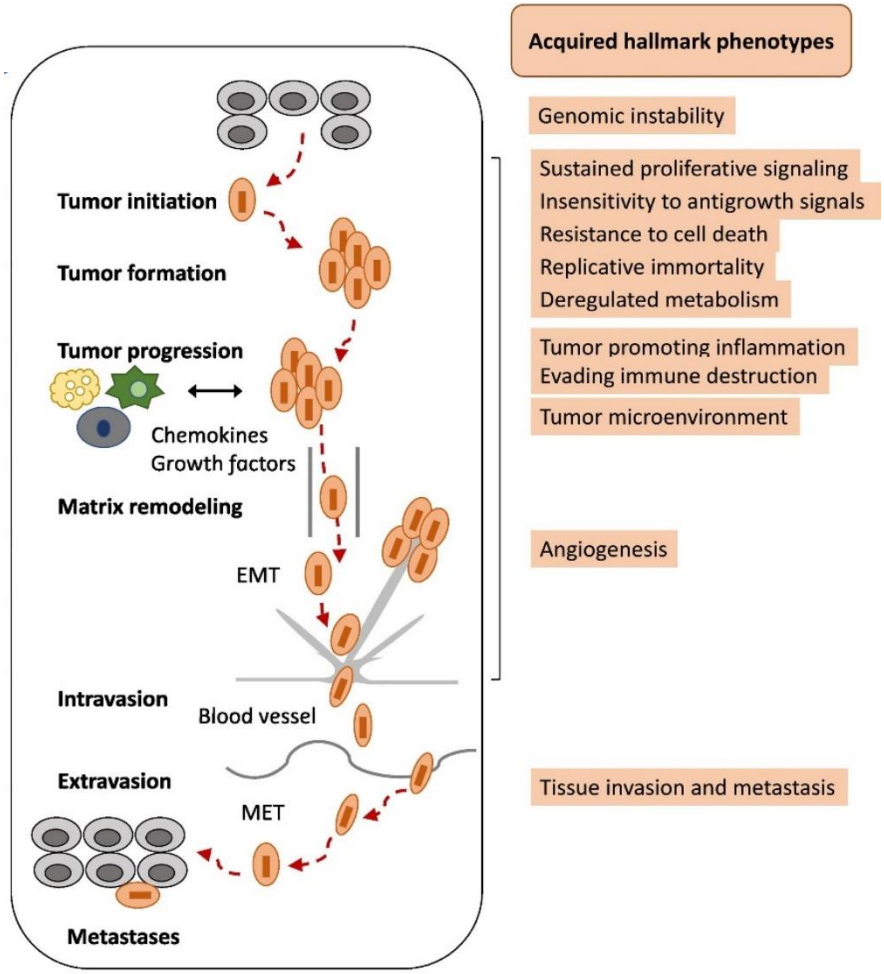


Figure 6 : Processus de cancérisation.

Le processus de cancérisation de fait en plusieurs étapes : l'initiation, la promotion, la progression et enfin la dissémination cancéreuse (modifié d'après Singla, 2020).

C. Les principaux gènes touchés pendant la carcinogenèse

Pendant la carcinogénèse, une ou plusieurs mutations peuvent atteindre différents gènes, comme les proto-oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeurs.

Les proto-oncogènes sont impliqués dans la croissance et la division des cellules. Parmi ceux-ci, on retrouve le gène *HER2* qui peut être surexprimé dans certains cancers du sein suite à une mutation, conduisant alors à une prolifération accrue des cellules cancéreuses et favorisant la croissance tumorale. Une tumeur étant positive pour le gène *HER2* est souvent diagnostiquée de haut grade avec un mauvais pronostic. Le gène *MYC*, codant pour un facteur de transcription, ou les gènes codant pour la protéine Ras appartenant à la famille des petites GTPases font également partie des proto-oncogènes. Une ou plusieurs mutations touchant l'un de ses gènes conduisent à leur surexpression (Moasser, 2007 ; Afrăsânie *et al.*, 2019). Ces mutations peuvent être transmises de façon spontanée suite à une erreur de réplication ou acquise suite à l'exposition à des facteurs mutagènes environnementaux par exemple. Lorsqu'une mutation activatrice touche l'un de ces proto-oncogènes, la prolifération cellulaire devient alors exacerbée.

D'autres gènes, appelés gènes suppresseurs de tumeur, régulent et limitent la prolifération des cellules dans un contexte physiologique, en ralentissant le cycle cellulaire ou en favorisant la mort cellulaire (appelée apoptose), et ont donc un effet opposé à ceux des proto-oncogènes. Ils peuvent subir des mutations invalidantes, c'est le cas notamment des gènes *BRCA1* et *BRCA2* qui peuvent être mutés dans 1 à 7% des tumeurs mammaires (Huszno *et al.,* 2018). Dans un contexte physiologique, les gènes *BRCA1* et *BRCA2* ont une fonction de réparation de l'ADN. Le gène APC (adenomatous polyposis coli) contrôlant la mitose et impliqué dans le cancer colorectal, ainsi que le gène codant pour la protéine p53 (*TP53*), facteur de transcription ayant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose, font également partie des gènes suppresseurs de tumeurs (Yoshida et Miki, 2004 ; Yu *et al.,* 2015). Le gène *TP53* a également un rôle de réparation l'ADN dans un contexte physiologique. C'est aussi le cas pour les gènes impliqués dans la réparation des mésappariements tels que *MLH1* (MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2) et *MSH2* (MutS homolog 2 ; Yoshida et Miki, 2004 ; Yamamoto

et Imai, 2015 ; Yu *et al.,* 2015). Une mutation sur l'un de ces gènes peut alors entraîner une dysfonction de la réparation de l'ADN, comme c'est le cas des mutations touchant les gènes *MLH1* et *MSH2* qui conduisent au syndrome de Lynch associé au cancer colorectal (Yamamoto et Imai, 2015). Les cellules ayant un ADN endommagé entrent normalement en apoptose, cependant certaines d'entre elles perdent le contrôle et n'en sont plus capables. Les cellules continuent alors de se proliférer avec une erreur génétique.

Lorsque ces gènes suppresseurs de tumeurs sont mutés, leur fonction de régulation est altérée, la mort cellulaire peut être impactée, conduisant alors à une prolifération accrue des cellules.

D. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses possèdent de nombreuses caractéristiques (Figure 7). En 2000, Hanahan et Weinberg ont décrit six caractéristiques fondamentales des cellules cancéreuses : l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'échappement à l'apoptose, l'induction de l'angiogenèse, la capacité réplicative illimitée et l'invasion des tissus et la formation de métastases (Hanahan et Weinberg, 2000). Ces effets ont été largement décrits depuis plusieurs années dans divers types cancéreux, notamment pour la résistance à l'apoptose, l'invasion des tissus et la formation de métastases (Kleeff *et al.*, 2000 ; Pistritto *et al.*, 2016 ; Heredia-Soto *et al.*, 2020 ; Vollmann-Zwerenz *et al.,* 2020 ; O'Connell *et al.*, 2021)

En 2011, ces auteurs ont apporté quatre nouvelles caractéristiques propres aux cellules cancéreuses : la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, l'échappement à une destruction par le système immunitaire, et l'instabilité et les mutations du génome et l'inflammation favorisant les tumeurs (Hanahan et

Weinberg, 2011), et ont aussi été décrites depuis plusieurs années (Lasry *et al.*, 2016 ; Pavlova et Thompson, 2016).

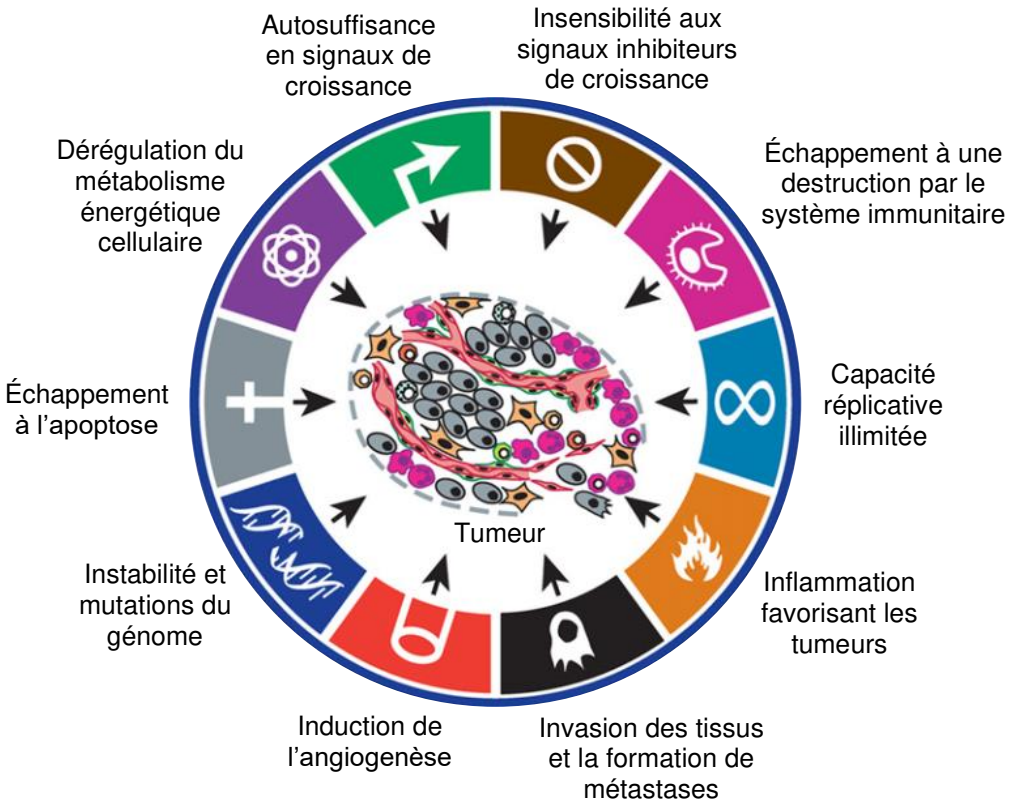


Figure 7 : Les caractéristiques des cellules cancéreuses.

Les cellules cancéreuses possèdent dix caractéristiques dont l'autosuffisance en signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance, l'échappement à l'apoptose, l'induction de l'angiogenèse, la capacité réplicative illimitée, l'invasion des tissus et la formation de métastases, la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire, l'échappement à une destruction par le système immunitaire, l'instabilité et les mutations du génome et l'inflammation favorisant les tumeurs (modifié d'après Hanahan et Weinberg, 2011).

E. La transition épithélio-mésenchymateuse et cancer

Durant la carcinogenèse, les cellules épithéliales acquièrent des caractéristiques de cellules mésenchymateuses sous l'effet de différents signaux

comme l'hypoxie, un stress mécanique, l'expression de facteurs de croissance ou encore de cytokines, notamment par l'activation de voie de signalisation telles que celles du TGFβ (transforming growth factor beta) ou de l'EGF (epidermal growth factor ; Kalluri et Weinberg, 2009 ; Zeisberg et Neilson, 2009 ; Lee et Nelson, 2012). La transformation d'une cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse se fait lors d'un processus, réversible, appelé la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), où les cellules épithéliales perdent leur polarité apico-basale, leur adhésion cellulaire et l'intégrité de la membrane basale, par le désassemblage de leurs jonctions intercellulaires (adhérentes, serrées), conduisant à un phénotype allongé (Kalluri et Neilson, 2003 ; Lee *et al.*, 2006 ; Wells *et al.*, 2011 ; Huang *et al.*, 2012 ; Varga *et al.*, 2014). En revanche, elles acquièrent une capacité de migration et d'invasion cellulaire par leurs adhésions focales et l'expression de protéases matricielles (Eskiizmir et Özgür, 2018).

La TEM est impliquée dans plusieurs évènements physiologiques tels que le développement embryonnaire ou l'organogenèse (Locascio et Nieto, 2001 ; Lee et Nelson, 2012), et elle est aujourd'hui reconnue pour être fondamentale dans la progression cancéreuse (Yang et Weinberg, 2008 ; Thiery *et al.*, 2009). Elle est souvent caractérisée par une augmentation de la mobilité cellulaire, élément clé pour les métastases (Ishigaki *et al.*, 2011). Cependant, certaines études ont suggéré que la TEM n'est pas essentielle pour induire les fonctions de mobilité cellulaire notamment dans les métastases, mais plutôt pour la résistance aux traitements anti-cancéreux (Fischer *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2015).

Ainsi, la TEM est classée selon 3 sous-types :

- **Type I** : Durant l'embryogenèse et le développement des organes, la TEM est un processus physiologique participant à la migration des cellules vers des tissus adjacents pour former des organes et tissus. La TEM étant un processus réversible, une fois que les

nouveaux organes sont développés, la transformation des cellules mésenchymateuses en cellules épithéliales s'effectue et ces dernières assurent les fonctions physiologiques des tissus épithéliaux (Hay, 1990 ; Vićovac et Aplin, 1996 ; Liu *et al.*, 1999 ; Bischof *et al.*, 2006 ; Thiery et Seeman, 2006 ; Kalluri et Weinberg, 2009).

- **Type II** : Durant la cicatrisation de type fibrose, la TEM est enclenchée, sous la dépendance de facteurs inflammatoires tels que les cytokines ou les interleukines, afin de permettre aux fibroblastes de réparer et reconstruire les tissus endommagés (Kalluri et Weinberg, 2009). Elle continue tant qu'il y a une lésion tissulaire et jusqu'à ce que la blessure soit cicatrisée (Okada *et al.*, 1996 ; Rastaldi *et al.*, 2002 ; Chilosi *et al.*, 2003 ; Zeisberg *et al.*, 2003 ; Ivanova *et al.*, 2008).
- **Type III** : Dans un contexte pathologique de croissance tumorale, ou de progression cancéreuse, les cellules épithéliales acquièrent un phénotype mésenchymateux par l'activation de facteurs de transcription qui stimule la TEM (Zajchowski *et al.*, 2001 ; Cunha *et al.*, 2002 ; Wiseman et Werb, 2002) et acquièrent des capacités de mobilité, d'invasion (Thiery, 2002). De récentes études ont montré que la TEM peut avoir un rôle dans la résistance aux traitements anti-cancéreux via l'expression et l'activité des facteurs de transcription, notamment *SNAI1, SNAI2, TWIST* et *ZEB*. Ces derniers pourraient donc être la cible de nouvelles approches thérapeutiques contre le cancer (Fischer *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2015 ; Wang *et al.*, 2016 ; van Staalduinen *et al.*, 2018 ; Song et Faber, 2019).

1. Régulation de la TEM

Plusieurs stimuli externes, tels que des facteurs de croissance, des cytokines, des hormones, activant des voies de signalisation de transduction du signal, ou encore l'hypoxie, sont connus pour initier ou réguler la TEM (Lee et Nelson, 2012 ; Figure 9).

Les facteurs de croissance, comme l'EGF, se lient à des récepteurs tyrosine-kinases, tels que l'EGFR (epidermal growth factor receptor) ou HER2, connus pour être impliqués dans de nombreux cancers (Appert-Collin *et al.*, 2015). L'activation de ces récepteurs stimule la TEM et induit l'expression de Snail et Twist, conduisant à l'inhibition d'expression de la E-cadhérine (Lee *et al.*, 2011 ; Lo *et al.*, 2007 ; Peinado *et al.*, 2007). Les facteurs de croissance ont aussi un effet sur l'activité de petites protéines G de la famille des RhoGTPases, via les voies de signalisation Ras et PI3K (phosphoinositide 3-kinases)/Akt (protein kinase B) (Bakin *et al.*, 2000 ; Edme *et al.*, 2002). Les RhoGTPases jouent un rôle crucial dans les réarrangements du cytosquelette d'actine, et leur activation, associée à la TEM, augmente la migration et l'invasion cellulaire (Keely *et al.*, 1997 ; Edme *et al.*, 2002), notamment par l'activation des MMPs (Zhuge et Xu, 2001).

Par ailleurs, le TGFβ, via la voie de signalisation de Smad ou celles de PI3K ou ERK (extracellular signal-regulated kinase), induit l'expression de Snail et Slug et le recrutement de MMPs, conduisant à la répression de la E-cadhérine, ce qui fait du TGFβ un régulateur proéminent de la TEM (Figure 9 ; Peinado *et al.*, 2003 ; Thuault *et al.*, 2006). En contrepartie, les complexes de Smad, qui agissent en tant que facteurs de transcription, induisent l'expression de la N-cadhérine et de l'α-SMA (Nawshad *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2009).

En outre, l'hypoxie induit le relargage de facteurs HIF1/2α (facteurs induits par l'hypoxie) conduisant à l'expression de Twist, Snail et Slug. L'expression de ces marqueurs de la TEM ainsi que celle de la N-cadhérine permet l'acquisition de capacités invasives et la dissémination des cellules cancéreuses (Gort *et al.,* 2008). Enfin, l'environnement tumoral qui est riche en cytokines peut également conduire

à l'activation de la TEM via notamment les voies de signalisation de l'interleukine 6 (IL-6 ; Sullivan *et al.*, 2009).

2. Les déterminants moléculaires de la TEM dans le cancer

Des facteurs de transcriptions sont fortement exprimés par les cellules mésenchymateuses. C'est le cas des protéines Snail et Slug, codées respectivement par les gènes *SNAI1* et *SNAI2*, et Zeb, codée par le gène *ZEB*, qui sont des répresseurs directs de la E-cadhérine et favorise l'expression de marqueurs mésenchymateux (Comijn *et al.*, 2001 ; Kalluri et Neilson, 2003 ; Eger *et al.*, 2005 ; Vandewalle *et al.*, 2009 ; Lee *et al.*, 2011). Lors de la TEM, Snail et Zeb modulent la progression du cycle cellulaire et la survie (Vega *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2010;), et Zeb ajoute aussi la capacité de migration et d'invasion dans du matrigel (Comijn *et al.*, 2001; Vandewalle *et al.*, 2005 ; Vandewalle *et al.*, 2009).

Un autre facteur de transcription Twist, codé par le gène *TWIST*, est exprimé de façon aberrante dans les cellules épithéliales subissant la TEM (Kida *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2008). Les facteurs de transcription Twist et Slug ont fréquemment été retrouvés dans les tumeurs mammaires. Cette co-expression s'explique par la liaison de Twist sur le promoteur de Slug pour activer sa transcription (Casas *et al.*, 2011). Cette co-expression est essentielle pour le rôle de Twist dans l'invasion, la formation d'invadopodes et les métastases. En effet, Slug joue un rôle prépondérant dans le maintien d'un phénotype motile dans les cellules tumorales envahissantes, notamment dans les cellules cancéreuses mammaires (Comijn *et al.*, 2001 ; Perez-Moreno *et al.*, 2001 ; Peinado *et al.*, 2004 ; Cheng *et al.*, 2007 ; Eckert *et al.*, 2011). L'expression de Twist et Slug a pour conséquence l'altération de la matrice extracellulaire par l'induction d'expression de métalloprotéinases matricielles (MMPs), ainsi que des protéases à sérine, à cystéine ou à aspartate, favorisant de

ce fait l'invasion cellulaire et la dissémination métastatique, tout en libérant des facteurs de croissances et des cytokines présentes jusqu'alors dans la matrice extracellulaire (Lochter *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 2004 ; Jo *et al.*, 2009).

Nous avons précédemment vu que les cellules épithéliales expriment majoritairement et fortement la E-cadhérine, dont le rôle principal est de maintenir l'intégrité cellulaire. Durant la TEM, l'expression de celle-ci est directement ou indirectement réprimée par la fixation de facteurs de transcription, comme Twist, Zeb ou Snail, sur le promoteur de son gène *CDH1* (Puisieux *et al.*, 2014). La réduction de la E-cadhérine favorise la perte de la polarité cellulaire et l'organisation de l'épithélium, en désassemblant les jonctions intercellulaires épithéliales. La répression transcriptionnelle d'autres marqueurs épithéliaux, comme les intégrines ou les cytokératines, contribue également à ces évènements. Le facteur de transcription Snail réprime aussi d'autres protéines clés d'un phénotype épithélial comme les occludines et la desmoplakine (Ohkubo et Ozawa, 2004).

Suite à la perte d'expression de marqueurs épithéliaux, le cytosquelette est réorganisé et les cellules expriment alors de nombreux marqueurs mésenchymateux, tels que la N-cadhérine, la vimentine, l'α-SMA (smooth muscle actin) entre autres. En effet, lors de la TEM, un phénomène appelé le « switch » des cadhérines est observé et consiste au remplacement du marqueur épithélial E-cadhérine en marqueur mésenchymateux N-cadhérine, codé par le gène *CDH2* (Nakagawa and Takeichi, 1998 ; Cavallaro et Christofori, 2004 ; Lee et Nelson, 2012). Ceci est une des caractéristiques majeures de la TEM (Edelman *et al.*, 1983 ; Tepass *et al.*, 2000). Ce phénomène a été mis en évidence dans la carcinogenèse et la progression tumorale (Tomita *et al.*, 2000 ; Hazan *et al.*, 2004 ; Bryan et Tselepis, 2010). La surexpression de la N-cadhérine a été identifiée dans les cancers du sein, de la prostate et le cancer colorectal et est souvent corrélée avec une diminution de l'expression de la E-cadhérine (Acs *et al.*, 2001 ; Rosivatz *et al.*,

2002 ; Peinado *et al.*, 2004 ; Lee et Nelson, 2012). Cette surexpression de la N-cadhérine est associée à une perte d'adhésion cellulaire et à une perte de la polarité apico-basale (Tomita *et al.*, 2000 ; Peinado *et al.*, 2004).

Les cellules mésenchymateuses expriment aussi la vimentine, codée par le gène *VIM* (Yeaman *et al.,*1999). La vimentine est une protéine de type filament intermédiaire, permettant aux cellules d'acquérir une force de traction nécessaire aux mouvements tissulaires (Eckes *et al.*, 2000). La mobilité et la plasticité nécessaires au développement tumoral sont aussi des capacités apportées par la vimentine, permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à la tumeur primaire, de migrer et d'envahir les tissus avoisinants induisant alors des métastases (Tsai *et al.,* 2012). L'expression de la vimentine est souvent utilisée pour identifier la TEM dans la progression cancéreuse, et a été corrélée avec une augmentation du grade tumoral, une augmentation de l'invasion cellulaire et avec les métastases (Heatley *et al.*, 1993 ; Gilles *et al.*, 1996 ; Yang *et al.*, 2004 ; Eskiizmir et Özgür, 2018).

Une autre protéine du cytosquelette, l'α-SMA, codée par le gène *ACTA2*, qui est une isoforme d'actine, est impliquée dans la contraction du muscle lisse. Il a été montré que cette protéine est fortement exprimée dans les cellules mésenchymateuses (Nakajima *et al.*, 1997) et a été détectée dans le cancer du sein (Sarrió *et al.*, 2008).

Pour conclure, les processus connus pour contribuer à la TEM sont l'expression des facteurs de transcriptions tels que Snail, Slug, Zeb et Twist, l'altération de l'expression des protéines membranaires, comme la E-cadhérine, la réorganisation et l'expression de protéines du cytosquelette, comme entre autres la vimentine, et le recrutement d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, tels que les MMPs ou des protéases à sérine, à cystéine ou à aspartate (Tableau 1 et Figure 8 ; Kalluri et Weiberg, 2009 ; De Craene et Berx, 2013 ; Mitschke *et al.*, 2019).

La TEM est un processus réversible, qu'elle soit de type I, II ou III. Le processus inverse est appelé la transition mésenchymato-épithéliale (TME) et est activée lors de la reprogrammation des cellules souches pluripotentes, de la cicatrisation et dans les métastases. Les cellules mésenchymateuses, motiles, deviennent alors des cellules épithéliales polarisées. Durant la TME, à l'inverse de la TEM, les marqueurs épithéliaux sont exprimés, tels que la E-cadhérine, et les marqueurs mésenchymateux sont réprimés, comme Snail, Slug, Zeb1/2 et N-cadhérine (Sipos et Galamb, 2012 ; Pei *et al.*, 2019). Dans un contexte cancéreux, la TME permet l'intégration des cellules cancéreuses ayant envahi un autre organe, c'est-à dire, la stabilisation des métastases (Yao *et al.*, 2011 ; Gunasinghe *et al.,* 2012 ; Liao et Yang, 2017)

Tableau 1 : Expression des principaux marqueurs protéiques des phénotypes épithéliaux et mésenchymateux.

D'après Kalluri et Neilson, 2003 ; Yang et Weinberg, 2008 ; Kalluri et Weinberg, 2009 ; Zeisberg and Neilson, 2009 ; Shirakihara et al., 2013 ; Masugi et al., 2015 ; Serrano-Gomez et al., 2016 ; Yu et al., 2021.

Phénotype **Type de marqueurs**	**Epithélial**	**Mésenchymateux**
Membranaires	E-cadhérine, occludine, claudines, desmogléines	N-cadhérine, intégrines-α3/β4
Cytosoliques	ZO-(1/2/3), cytokératines, desmoplakine, α- et β-caténine	Vimentine, fibronectine, α-SMA
Facteurs de transcription	Cdx2 (Caudal-type homeobox protein-2)	Snail, Slug, Zeb, Twist

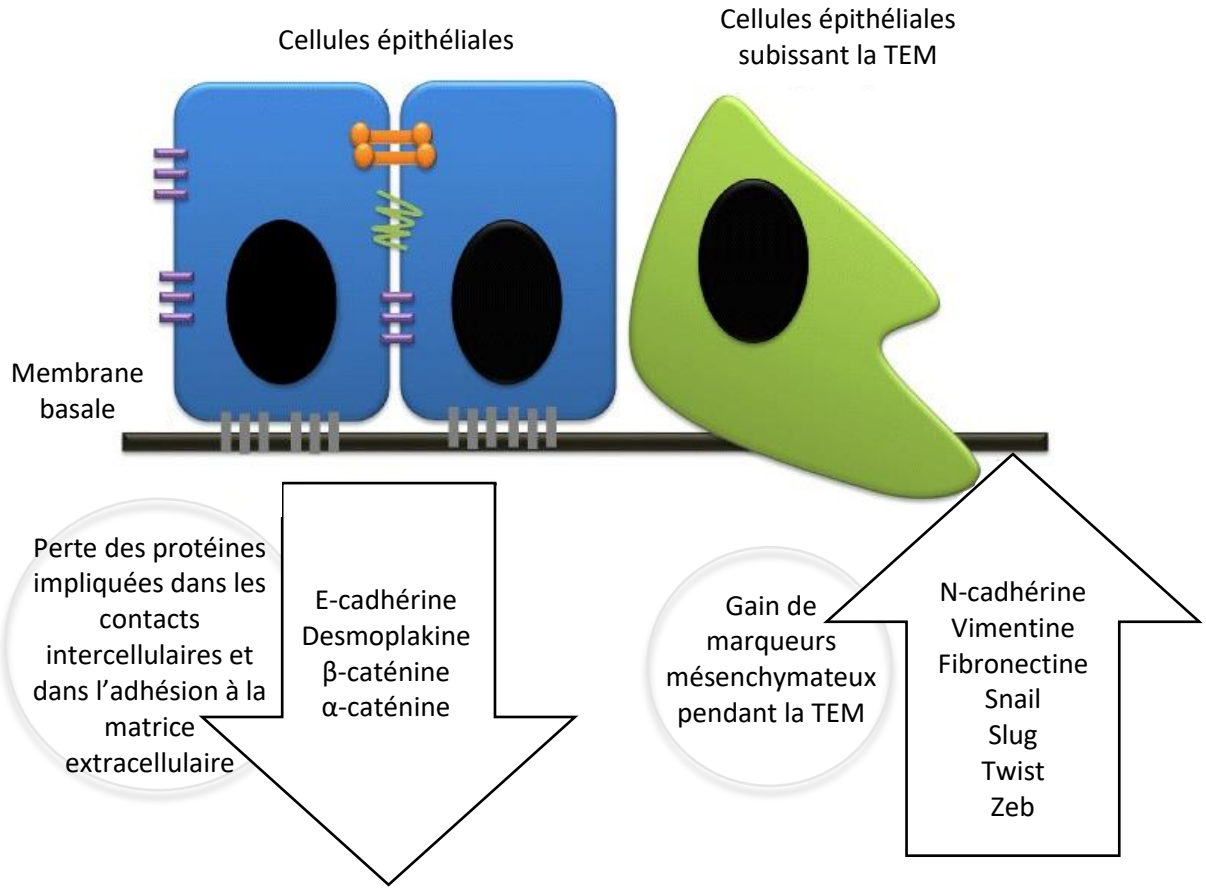


Figure 8 : Régulation des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux lors de la TEM.

Les cellules épithéliales subissant la TEM perdent leurs marqueurs épithéliaux, tels que la E-cadhérine et expriment en contrepartie des marqueurs mésenchymateux, tels que la N-cadhérine et la vimentine (modifié d'après Serrano-Gomez et al., 2016).

3. La β-caténine, la TEM et le cancer

La β-caténine (codée par *CTNNB1*) joue un rôle clé dans les jonctions adhérentes, lorsqu'elle est liée à la E-cadhérine et l'α-caténine (chapitre §Introduction, III, D, 3). Lors de la TEM, la perte d'expression de la E-cadhérine module la séquestration de protéines cytoplasmiques, comme la β-caténine. Ceci a

pour conséquence une libération de la β-caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau pour réguler l'expression des gènes associées à la TEM (Yook *et al.*, 2006, Varga *et al.*, 2014). De plus, l'activation de la voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine, par la fixation de la glycoprotéine Wnt sur le récepteur transmembranaire Frizzled, contribue également à la translocation de la β-caténine dans le noyau (Figure 9 ; Xu *et al.,* 2020). En effet, l'activation de cette voie induit l'inhibition du complexe formé par APC(adenomatous polyposis coli), Axin et GSK3β, responsable de la dégradation par le protéasome de la β-caténine (Gavert et Ben-Ze'ev, 2007), conduisant alors à sa stabilisation dans le cytoplasme. Cette dernière est alors transloquée dans le noyau et induit l'expression de gènes associés à la TEM, comme Snail, Slug, Twist, Zeb ou encore la N-cadhérine (Conacci-Sorrell *et al.*, 2003 ; Nelson et Nusse, 2004 ; Zavadil et Böttinger, 2005 ; Yook *et al.*, 2006 ; Varga *et al.*, 2014). Par ailleurs, il existe d'autres voies de signalisation non canoniques Wnt n'impliquant pas la β-caténine, notamment celle dépendante du calcium. Cette voie est activée lors de la fixation de Wnt sur le récepteur Frizzled couplé aux protéines G, conduisant au clivage du phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP_2), par la phospholipase C (PLC), en inositol-triphosphate (IP_3) et en diacylglycérol (DAG). Ce dernier active la protéine kinase C (PKC) et conduit à la polymérisation de l'actine. L'IP_3 induit le relargage du calcium provenant des stocks du réticulum endoplasmique conduisant au réarrangement du cytosquelette d'actine, à la prolifération et la motilité cellulaire et à la progression tumorale (Niehrs, 2012 ; Abedini *et al.*, 2020).

Il a été montré que les voies de signalisation, initiant la TEM ou la régulant, participent fortement à la progression cancéreuse. En effet, il a été montré que la voie de signalisation Wnt/β-caténine est activée de façon aberrante dans plusieurs types de cancer, notamment les cancers colorectal, gastrique et de la prostate conduisant à l'accumulation de la protéine β-caténine dans le noyau afin de jouer son rôle de facteur de transcription (Kalluri et Neilson, 2003 ; Nawshad *et al.*, 2005 ; Li *et al.*, 2018). Cette accumulation est accentuée par des mutations touchant la E-

cadhérine (Berx *et al.,* 1995 ; Hajra *et al.*, 2012). Les mutations de la β-caténine sont quant à elles rares dans le cancer du sein (van Schie et van Amerongen, 2020) mais sont retrouvées dans les cancers colorectaux, du foie et les mélanomes (Morin *et* al., 1997 ; Miyoshi *et al.*, 1998 ; Polakis, 2007), ce qui inhibe son ubiquitination et augmente sa translocation nucléaire pour induire la transcription de facteurs tels que *SNAI, ZEB* et favoriser une transition épithélio-mésenchymateuse (Morin, 1999).

Les voies du TGFβ sont aussi impliquées dans la régulation positive de la β-caténine. En effet, l'activation de cette voie conduit à la suppression de GSK3β induisant l'inhibition du complexe de dégradation de la β-caténine, lors de la migration des cellules cancéreuses (Nawshad et al., 2005 ; Nelson et Nusse, 2004).

La voie de signalisation PI3K/Akt a aussi un rôle de phosphorylation sur GSK3β (glycogen synthase kinase 3 beta) qui a pour conséquence son inactivation. Cela empêche alors la dégradation de la β-caténine et Snail, contribuant à la TEM (Figure 9 ; Zhou *et al.*, 2004).

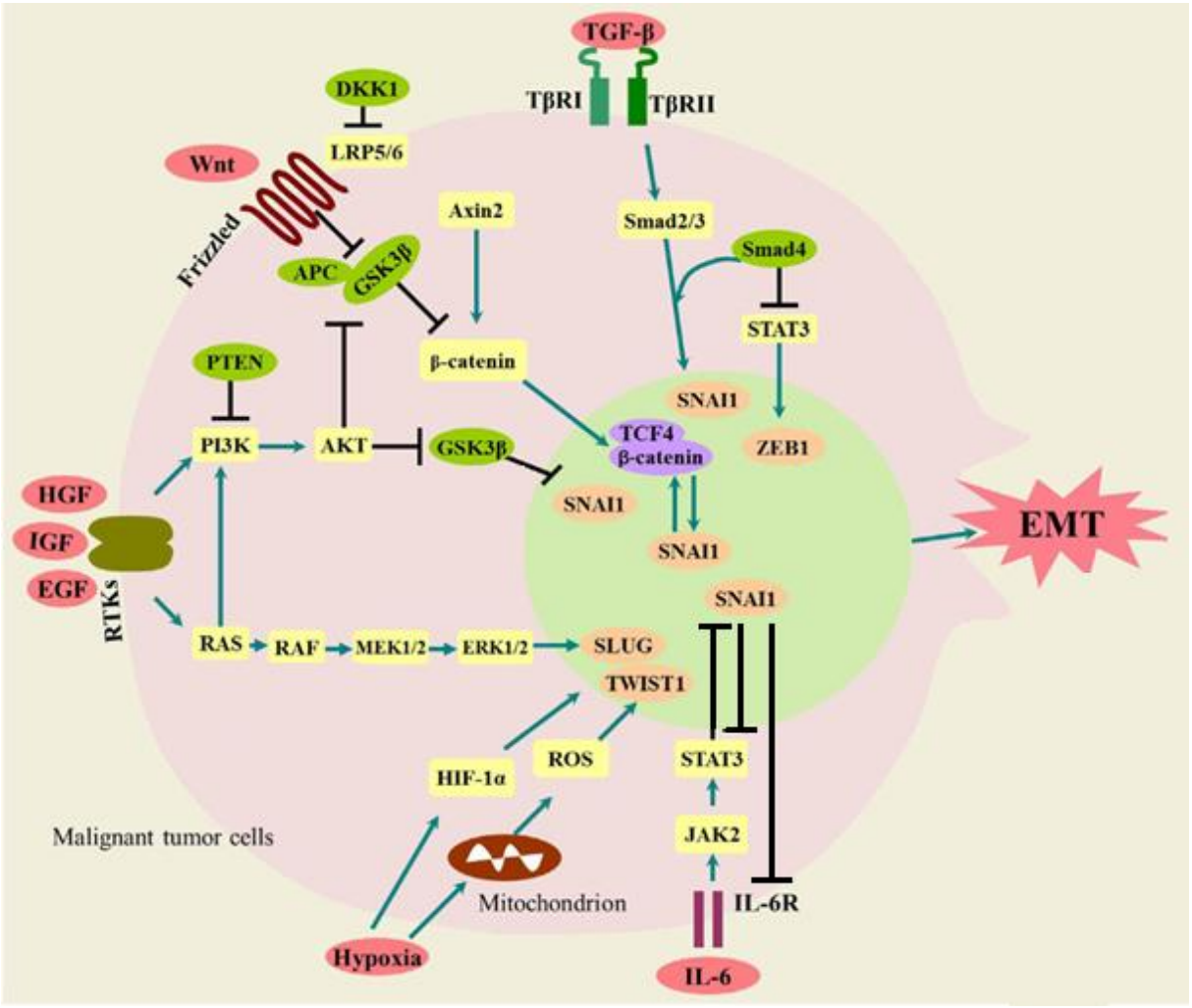


Figure 9 : Régulation de la TEM.

Les voies de signalisation induites par des facteurs de croissance, des cytokines, Wnt, ou encore l'hypoxie, peuvent initier ou réguler la TEM (modifié d'après Cao et al., 2015).

Les évènements se produisant dans le cadre de la TEM de type III, décrits précédemment, s'appliquent également aux cancers mammaire et colorectal.

En effet, dans le cancer du sein, il a été montré que la régulation négative des récepteurs aux œstrogènes, notamment le récepteur α, pouvaient entraîner la TEM, se caractérisant par la prolifération, la migration cellulaire ainsi que l'agressivité. L'expression du marqueur épithélial E-cadhérine est réduite, tandis qu'en parallèle, l'expression de marqueurs mésenchymateux est induite, telle que

celle de la vimentine et de slug, (Ye *et al.*, 2010 ; Al Saleh *et al.*, 2011 ; Karamanou *et al.,* 2020).

Dans le cancer colorectal, il a également été montré que la TEM est induite et se caractérise notamment par la sous-expression de la E-cadhérine et la sur-expression de la N-cadhérine et la vimentine, via la régulation de voies de signalisation de Wnt/β-caténine et du TGFβ. Il a également été montré que les facteurs de transcription impliqués dans la TEM, *SNAI1, SNAI2, TWIST, ZEB,* sont fortement exprimés (Cao *et al.*, 2015 ; Vu et Datta, 2017).

IV. Les sous-unités auxiliaires Na$_V$β des canaux sodiques dépendants du voltage

A. Gènes codant pour les sous-unités Na$_V$β

Les canaux sodiques dépendants du voltage (Na$_V$) sont constitués de deux types de sous-unités : Na$_V$α et Na$_V$β. Les sous-unités Navα regroupent neuf protéines, de Na$_V$1.1 à Na$_V$1.9, codées par les gènes *SCN1A* à *SCN11A*. Elles ont été identifiées comme les sous-unités « principales » formant le pore du canal (Catterall *et al.*, 2005). Ces sous-unités Navα ont été classées en deux groupes selon leur résistance à la tétrodotoxine (TTX) : les sensibles à la TTX, bloqués par une concentration de l'ordre du nM de la TTX, et les résistants à la TTX, bloqués par une concentration de supérieure à 1 µM, regroupant les sous-unités Na$_V$1.1 à Na$_V$1.4, Na$_V$1.6 et Na$_V$1.7, et les sous-unités Na$_V$1.5, Na$_V$1.8 et Na$_V$1.9 respectivement (Elliott et Elliott, 1993).

Cinq sous-unités Na$_V$β ont été identifiées comme sous-unités auxiliaires : Na$_V$β1 et son variant d'épissage Na$_V$β1B, codés par le gène *SCN1B*, Na$_V$β2, Na$_V$β3 et Na$_V$β4, codées par les gènes *SCN2B, SCN3B* et *SCN4B* respectivement (Isom *et al.*, 1992 ; Isom *et al.*,1995 ; Kazen-Gillespie *et al.*, 2000 ; Patino *et al.*, 2011 ; Morgan *et al.*, 2000 ; Qin *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2003).

B. Structures des sous-unités Na$_V$β

Les sous-unités Na$_V$β sont composées d'une unique séquence polypeptidique de 215 à 268 acides aminés (Figure 10). Toutes ces sous-unités, exceptée Na$_V$β1B, contiennent une boucle immunoglobuline (Ig) au niveau de l'extrémité N-terminale extracellulaire, un segment transmembranaire en hélice alpha et une extrémité C-terminale cytoplasmique (Isom *et al.*, 1994). La protéine Na$_V$β1B possède une région N-terminale avec une boucle Ig similaire aux autres

sous-unités Navβ, mais ne possède pas de domaine transmembranaire à cause d'une rétention de l'intron 3 par un épissage alternatif. Cela a pour conséquence une protéine soluble et sécrétée (Kazen-Gillepsie *et al.*, 2000 ; Patino *et al.*, 2011). La sous-unité Navβ1B a aussi une extrémité C-terminale différente, car cette dernière est similaire à celle de Navβ1 qu'à seulement 17% au niveau des résidus 150 à 268 (Qin *et al.*, 2003). Les sous-unités Navβ1 et Navβ3 sont similaires à 57% (Morgan *et al.*, 2000) et les sous-unités Navβ2 et Navβ4 à 35% (Yu *et al.* 2003).



Figure 10 : Alignement des séquences des sous-unités Navβ.

*Les séquences des sous-unités Navβ1, Navβ1B, Navβ2, Navβ3 et Navβ4, ont été alignées avec UniProt (un * (astérisque) indique les positions qui ont un seul résidu entièrement conservé ; un : (deux-points) indique la conservation entre des groupes de propriétés fortement similaire ; un . (point) indique la conservation entre des groupes de propriétés faiblement similaires).*

C. Modifications post-traductionnelles des sous-unités Na$_V$β

Les sous-unités Na$_V$β peuvent subir plusieurs modifications post-traductionnelles notamment par glycosylation, phosphorylation ou même par clivages protéolytiques (Figure 11).

1. Modifications post-traductionnelles par N-glycosylation

Les sous-unités Na$_V$β matures contiennent trois à quatre sites de N-glycosylation sur des résidus du domaine Ig (Figure 11). En effet, les sous-unités Na$_V$β1 et Na$_V$β3 contiennent quatre résidus pouvant être N-glycosylés en positions 93, 110, 114 et 135, et en positions 95, 109, 113 et 121, respectivement. Les sous-unités Na$_V$β2 et Na$_V$β4 en contiennent trois sur les positions 42, 66 et 74, et 45, 71 et 113, respectivement. Cela contribue à la régulation de leur expression membranaire mais aussi à la régulation de l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques sodiques dépendants du voltage, notamment Na$_V$1.2, Na$_V$1.5, Na$_V$1.7 (Isom *et al.*, 1992 ; McCormick *et al.*, 1998 ; Johnson *et al.*, 2004).

2. Modifications post-traductionnelles par phosphorylation

Il a été démontré que la sous-unité Na$_V$β1 peut être phosphorylée sur le résidu tyrosine Y181 au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire (Figure 11). Cette phosphorylation entraine différents effets. Dans le cœur, elle induit un changement de sa localisation subcellulaire, des tubules T aux disques intercalaires

(Malhotra *et al.*, 2004). La sous-unité Navβ1 peut aussi interagir avec le récepteur tyrosine phosphatase β par son domaine intracellulaire. Cette interaction induit la phosphorylation du résidu Y181 de la sous-unité Navβ1 dans les neurones de rat (Ratcliffe *et al.*, 2000). Cette phosphorylation conduit au recrutement de l'ankyrine qui cause une agrégation des points de contact cellule-cellule (Malhotra *et al.*, 2000 ; Malhotra *et al.*, 2002), par la présence de la kinase fyn (qui appartient à la famille des kinases src). Le recrutement de cette protéine peut être abrogé par la mutation du résidu Y181 dans les cellules pulmonaires de hamster chinois (Malhotra *et al.*, 2002). Ainsi, la localisation subcellulaire de la sous-unité Navβ1 et ses interactions avec les protéines du cytosquelette peuvent être modulées par la phosphorylation de son résidu Y181.

3. Modifications post-traductionnelles par clivages

Les sous-unités Navβ contiennent des sites de clivage pour des enzymes de la famille des secretases (Figure 11). Chacune des sous-unités, exceptée Navβ1B, peut être clivée par l'enzyme BACE1 (β-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1) au niveau de l'extrémité N-terminale, proche de la région transmembranaire (Navβ1 et Navβ2 : entre les acides aminés 144 et 145 ; Navβ3 : entre les acides aminés 128 et 129 ; Navβ4 : entre les acides aminés 149 et 150 ; Wong *et al.*, 2005 ; Gersbacher *et al.*, 2010). Ce clivage a été confirmé *in vivo* pour les sous-unités Navβ2 et Navβ4 (Wong *et al.*, 2005). Le clivage effectué par cette β-secretase conduit à la libération d'un domaine N-terminal soluble similaire à Navβ1B (Patino *et al.*, 2011). L'expression du gène *SCN1A* peut être régulée par la translocation du fragment intracellulaire de Navβ2 vers le noyau, généré par le clivage de BACE1 (Kim *et al.*, 2007).

Un second type de secretases peut cliver les sous-unités β. Il s'agit des γ-secretases qui clivent les quatre sous-unités Navβ au niveau du domaine

intracellulaire juxtamembranaire, reconnaissant la charge positive de la lysine (K) ou de l'arginine (R) (Xu *et al.*, 2016). Cela a pour conséquence de générer un fragment C-terminal soluble dans le cytoplasme d'environ 15 kDa (Kim *et al.*, 2005 ; Kim *et al.*, 2007 ; Wong *et al.*, 2005). Le fragment C-terminal des sous-unités Naᵥβ, issu du clivage des γ-secretases, induit l'expression transcriptionnelle des sous-unités Naᵥα et leur expression protéique par sa translocation dans le noyau dans des systèmes hétérologues de neurones (Kim *et al.,* 2005 ; Kim *et al.,* 2007). L'utilisation d'un inhibiteur des γ-secretases, DAPT, dans des lignées cellulaires issues d'ovaires de hamster chinois exprimant de façon stable la sous-unité Naᵥβ2 permet la réduction de l'adhésion et la migration cellulaire, ce qui suggère que le fragment cytosolique C-terminal de la sous-unité Naᵥβ2 est important dans ses processus (Kim *et al.*, 2005).

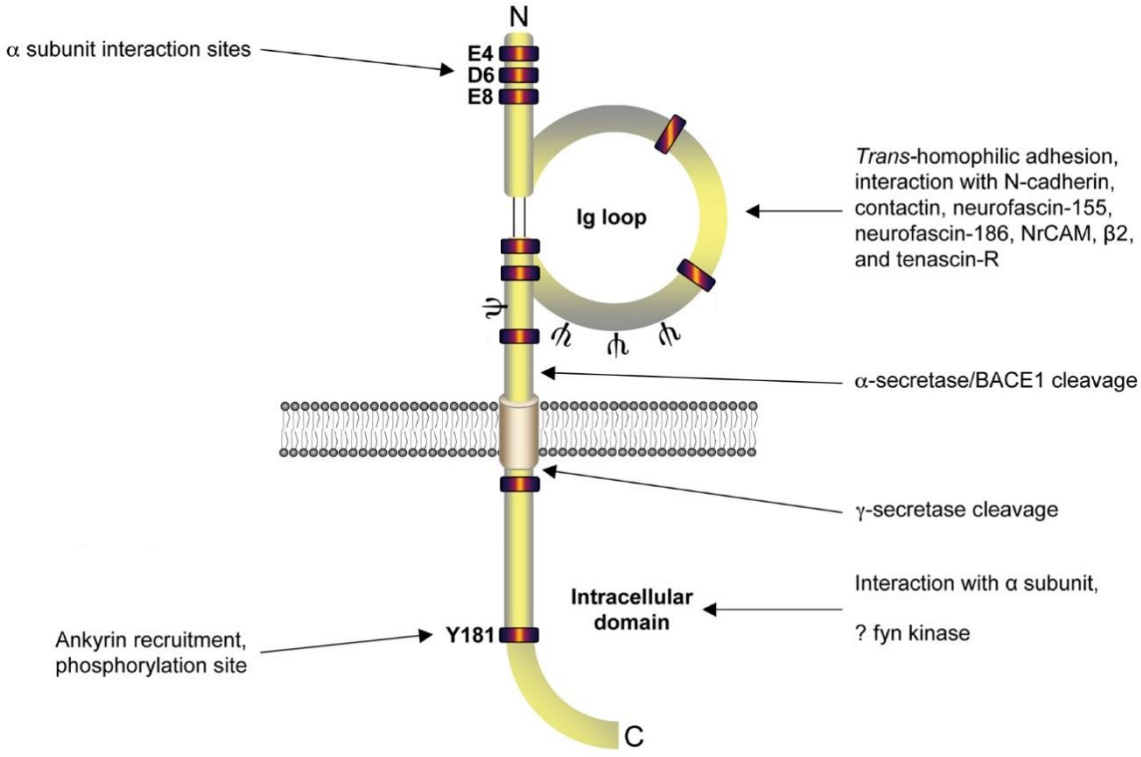


Figure 11 : Représentations schématiques des modifications post-traductionnelles des sous-unités Naᵥβ.

Les sous-unités Na$_V$β peuvent subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles, telles que des glycosylations (représentées par ψ), phosphorylations ou clivages (modifié d'après Brackenbury et Isom, 2011).

D. Fonctions des sous-unités Na$_V$β

1. Protéines auxiliaires des sous-unités Na$_V$α

Les sous-unités Na$_V$β ont été premièrement décrites comme sous-unités auxiliaires interagissant avec les sous-unités Na$_V$α afin de modifier leurs propriétés de canal ionique (Calhoun et Isom, 2014). En effet, les sous-unités Na$_V$β ont largement été explorées dans les cellules excitables où elles sont hautement exprimées notamment dans les cellules musculaires squelettiques, cardiaques, et les neurones, en présence des sous-unités Na$_V$α (Isom *et al.*, 1992 ; Isom *et al.,* 1995 ; Morgan *et al.*, 2000 ; Yu *et al.*, 2003 ; Maier *et al.*, 2004 ; Lopez-Santiago *et al.*, 2006 ; Brackenbury *et al.*, 2010 ; Lopez-Santiago *et al.*, 2011). Chez l'humain, une sous-unité Na$_V$α s'associe à une ou deux sous-unités Na$_V$β, soit Na$_V$β1 ou Na$_V$β3 de manière non-covalente, et avec Na$_V$β2 ou Na$_V$β4 de manière covalente par l'établissement de ponts disulfures au niveau de la boucle Ig via les cystéines 26 et 58 respectivement (McCormick *et al.*, 1998 ; Meadows *et al.,* 2001 ; Spampanato *et al.,* 2004 ; Catterall *et al.,* 2005 ; Chen *et al.,* 2012 ; Gilchrist *et al.,* 2013).

Il a été démontré que l'expression de la sous-unité Na$_V$1.2 dans des oocytes de *xenopus*, en présence de la sous-unité Na$_V$β1, conduit à une augmentation de l'amplitude du courant sodique, accélère l'activation et l'inactivation en comparaison avec l'expression seule de Na$_V$1.2 (Isom *et al.*, 1992). Des résultats similaires ont été obtenus par la sous-unité Na$_V$β2 co-exprimée avec Na$_V$1.2 (Isom *et al.*, 1995). L'expression simultanées de ces trois sous-unités, Na$_V$1.2, Na$_V$β1 et Na$_V$β2, conduit également à ces mêmes régulations du courant sodique mais de façon accrue

comparés qu'avec une seule des deux sous-unités Navβ (Bouza et Isom, 2018). Ces phénomènes n'ont pas été entièrement mis en évidence lors de l'expression de ces sous-unités dans une lignée cellulaire pulmonaire de hamster chinois. En effet, l'expression de Nav1.2 et de Navβ1 ou Navβ1B conduit aux mêmes conséquences que celles observées dans les oocytes de *xenopus* ; cependant, l'expression de Navβ2 n'induit pas de modification du courant sodique produit par Nav1.2 (Kazen-Gillespie *et al.*, 2000 ; Kazarinova-Noyes *et al.,* 2001 ; McEwen *et al.*, 2004 ; Patino *et al.*, 2011). Des études réalisées dans les lignées cellulaires d'ovaires de hamster chinois et embryonnaires humaines de reins (HEK human embryonic kidney) ont montré que l'expression des sous-unités Navβ1 ou Navβ3 accélère l'inactivation de Nav1.3, Nav1.5, et module l'activité de Nav1.7, et que l'expression des sous-unités Navβ1B ou Navβ2 n'a pas d'effet sur Nav1.3 (Kazen-Gillespie *et al.*, 2000 ; Meadows *et al.*, 2002 ; Ko *et al.*, 2005 ; Patino *et al.*, 2011 ; Laedermann *et al.,* 2013). Toujours dans la lignée cellulaire HEK293, l'expression de Navβ4 induit une accélération de l'inactivation de Nav1.5 comparée à Nav1.5 seule, et de l'activation de Nav1.2 ou Nav1.4, ainsi que du courant sodique en présence de Nav1.1 (Yu *et al.*, 2003 ; Medeiros-Domingo *et al.,* 2007 ; Aman *et al.,* 2009).

Il a été montré que des mutations sur les sous-unités Navβ peuvent conduire à plusieurs pathologies cardiaques et neuronales, des désordres neuropsychiatriques ou une sensation altérée de la douleur. Ces mutations induisent une modulation d'expression des sous-unités Navα, une altération de leur propriétés cinétiques et une sensibilité à la TTX modifiée (Catterall, 2000 ; Kazen-Gillepsie *et al.*, 2000 ; Qin *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2003 ; Patino *et al.*, 2009 ; Patino *et al.*, 2011 ; Bouza et Isom, 2018).

L'expression des gènes des sous-unités Navα peut aussi être modulée par les autres sous-unités Navβ (Wong et al., 2005). L'expression de sous-unité Navβ1 seule, ou co-exprimée avec Navβ2, augmente l'expression membranaire de Nav1.2, mais Navβ2 seule n'induit pas cette augmentation (Isom *et al.*, 1995 ; Kazarinova-

Noyes *et al.,* 2001). L'expression de Na$_V$β1 et Na$_V$β3 augmente l'expression de Na$_V$1.7, tout en modulant son état de glycosylation. En effet, la sous-unité Na$_V$β1 peut conduire à une forme alternative entièrement glycosylée de Na$_V$1.7. La sous-unité Na$_V$β3, quant à elle, augmente l'expression de la forme glycosylée en son centre (Laedermann *et al.,* 2013). *In vivo*, la sous-unité Na$_V$β1 diminue l'expression de Na$_V$1.1 mais augmente celle de Na$_V$1.3 (Chen *et al*., 2004).

2. Interactions avec d'autres canaux

Les sous-unités Na$_V$β modulent la fonction des canaux sodiques dépendants du voltage, comme vu précédemment, mais aussi d'autres canaux ioniques comme les canaux potassiques dépendants du voltage (Kv), en particulier les canaux Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6, Kv4.2, Kv4.3 et Kv7.2 (Nguyen *et al*., 2012 ; Marionneau *et al*., 2012 ; Deschênes *et al*., 2008). Le courant potassique généré par les canaux Kv4.2 est diminué lors de la sous-expression de la sous-unité Na$_V$β1, mais à l'inverse, son expression augmente l'expression de Kv4.2 (Marionneau *et al*., 2012).

3. Fonctions non-auxiliaires

a) Rôle d'adhésion cellulaire

Les sous-unités Na$_V$β appartiennent à la famille des protéines d'adhésion cellulaire (CAM cellular adhesion molecule), grâce à leur boucle immunoglobuline sur l'extrémité extracellulaire N-terminale, qui leur confère des similarités avec, entre autres, les intégrines et les cadhérines, et partagent également une haute homologie avec la myéline P0 (Isom *et al*., 1995 ; Isom and Catteral, 1996 ; Isom, 2002 ; Cadhoun and Isom, 2014 ; Morgan *et al*., 2000 ; McCormick *et al*., 1998). L'adhésion et la migration cellulaires peuvent être régulées par les sous-unités Na$_V$β

dans les cellules excitables, par cette fonction de CAM (Brackenbury et Isom, 2011). Il a aussi été décrit que la régulation de ces propriétés peut avoir lieu sans l'expression des sous-unités α des canaux sodiques voltage dépendants (Isom *et al.*, 1995 ; Kazarinova-Noyes *et al.*, 2001 ; Yu *et al.*, 2003 ; McEwen *et al.*, 2004 ; Bon *et al.,* 2016). En effet, il a été montré que les sous-unités Naνβ1, ou Naνβ2, entraîne une agrégation cellulaire et l'expression de l'ankyrine aux points de contact cellule-cellule, avec ou sans co-transfection de la sous-unité Naνα1.2 dans les cellules de drosophile S2 (Kazarinova-Noyes *et al.*, 2001). Par ailleurs, par le blocage des canaux sodiques Naν (par l'utilisation de la TTX) des cellules cancéreuses mammaires, il a été montré que la migration cellulaire est augmentée lors d'une réduction d'expression de la sous-unité Naνβ4 (Bon *et al.*, 2016).

La sous-unité Naνβ1 peut interagir avec une sous-unité Naνβ1 d'une autre cellule, provoquant une adhésion cellule-cellule (Meadows *et al.,* 2001). Lorsque que cette sous-unité n'est pas phosphorylée, la protéine ankyrine est recrutée et liée au niveau de l'extrémité intracellulaire C-terminale de la sous-unité Naνβ1. En revanche, la phosphorylation de la tyrosine 181 de Naνβ1 ne permet pas à l'ankyrine de se lier (Malhotra *et al.*, 2002). Par ailleurs, la sous-unité Naνβ1 peut interagir avec d'autres protéines de la famille CAM, comme la contactine, Caspr (aussi connue sous le nom de paranodine ou neurexine IV), ainsi que la neurofascine-155 (Kazarinova-Noyes *et al.*, 2001 ; McEwen *et al.*, 2004 ; McEwen and Isom, 2004). La co-expression de Naνβ1, Naν1.2, et de la contactine induit l'augmentation d'expression des sous-unité Naνα et augmente de ce fait le courant sodique en comparaison avec celui généré par la co-expression de Naνβ1 et Naν1.2 seulement (Kazen-Gillespie *et al.*, 2000 ; Patino *et al.,* 2011).

Il a été montré que la sous-unité Naνβ2 peut interagir avec la sous-unité Naνβ1, tenascine-R et tenascine-C (protéines de la matrice extracellulaire) par l'extrémité extracellulaire N-terminale dans des expériences de titration *in vitro* (Srinivasan *et al.*, 1998 ; Xiao *et al.*, 1999 ; Kazarinova-Noyes *et al.*, 2001).

Une étude a démontré que la neurofascine-186 et la sous-unité Navβ3, co-exprimées dans la lignée cellulaire HEK293, interagissent pour augmenter le courant sodique dans un système hétérologue en augmentant l'expression membranaire de Nav1.2. La sous-unité Navβ3 n'interagit pas avec l'ankyrine (Ratcliffe *et al.*, 2001). Une autre étude a montré que la sous-unité Navβ3 n'est pas associée avec la contactine et ne possède pas d'activité d'adhésion cellule-cellule, contrairement à la sous-unité Navβ1, même si elle possède une fonction similaire de modulation des canaux (McEwen *et al.*, 2009).

Enfin, les interactions cellulaires avec la sous-unité Navβ4 n'ont pas été beaucoup reportées. Une récente étude a montré que la sous-unité Navβ4 peut interagir avec les protéines CAM via son domaine Ig par la formation d'un pont disulfure entre la cystéine 58 et celle d'autres protéines, et de liaisons hydrogènes au niveau des résidus 30 à 35 (Shimizu *et al.*, 2016 ; Shimizu *et al.*, 2017 ; Bouza et Isom, 2018).

b) Fonctions biologiques

Le rôle multifonctionnel des sous-unités Navβ a été décrit (Brackenbury et Isom, 2011 ; O'Malley *et al.*, 2015 ; Roger *et al.*, 2015), notamment dans la croissance des neurites, la guidance des axones, la régulation de décharge neuronale et leur fasciculation (Brackenbury *et al.*, 2008 ; Patino and Isom, 2010 ; O'Malley *et al.*, 2015).

En effet, la sous-unité Navβ1 interagit avec la neurofascine-186 pour augmenter le courant sodique, via l'augmentation d'expression membranaire de Nav1.2, dans un système hétérologue. La sous-unité Navβ1 interagit également avec NrCAM, N-cadhérine et la tenascine-R pour restreindre les canaux sodiques dépendants du voltage aux nœuds de Ranvier dans les axones myélinés (Xiao *et al.*, 1999 ; Malhotra *et al.*, 2000 ; Kazarinova-Noyes *et al.*, 2001 ; Ratcliffe *et al.*,

2001 ; Malhotra *et al.*, 2004 ; McEwen and Isom, 2004). De plus, l'adhésion cellule-cellule induite par l'interaction homophilique de Naνβ1 augmente la croissance des neurites tandis que celle induite par Naνβ2 la diminue (Davis *et al.*, 2004), par la modulation de la voie de signalisation impliquant la kinase fyn via l'extrémité intracellulaire C-terminale (Brackenbury *et al.*, 2008 ; Brackenbury et Isom, 2011). L'expression de la sous-unité soluble Naνβ1B induit une croissance des neurites similaire à celle induite par Naνβ1 transmembranaire (Patino *et al.*, 2011), suggérant que le domaine extracellulaire serait impliqué dans cette régulation.

L'interaction de la sous-unité Naνβ2 avec la tenascine module la prolifération et la migration cellulaire pendant l'embryogenèse neuronale (Midwood *et al.*, 2011 ; Anlar et Gunel-Ozcan, 2012).

Enfin, la délétion de l'extrémité extracellulaire N-terminale de la sous-unité Naνβ4 conduit à la diminution de l'adhésion cellulaire mais à une augmentation de son association avec les sous-unités Naνα, dans des cellules de hamster chinois (Shimizu *et al.*, 2017). Une étude a aussi montré que l'expression de la sous-unité Naνβ4 dans les cellules non excitables est nécessaire pour induire le développement des cellules $CD4^+$ T (Lo *et al.*, 2012).

4. Expression et rôles dans le cancer

Depuis quelques années, certaines études ont montré que les sous-unités Naνβ ne sont pas seulement exprimées dans les cellules excitables mais le sont aussi dans les cellules non-excitables qui n'expriment pas les sous-unités Naνα. En effet, les sous-unités Naνβ n'ont pas seulement un rôle auxiliaire des sous-unités Naνα mais ont aussi des fonctions qui leur sont propres. Des études ont démontré que les sous-unités Naνβ sont impliquées dans les voies de signalisation promouvant le développement cancéreux, indépendamment ou non des sous-unités Naνα.

L'expression des sous-unités Na$_V$β peut être modifiée selon le type de cancers et le grade cancéreux (Patel and Brackenbury, 2015). De plus, certains résultats semblent mettre en évidence que l'expression des sous-unités Na$_V$β est différente selon les lignées cellulaires cancéreuses, les cultures primaires et les biopsies à cause des fonctions d'adhésion qui peuvent être modulées en fonction du type cellulaire (Hernandez-Plata *et al.*, 2012 ; Lopez-Charcas *et al.*, 2021).

Les sous-unités Na$_V$β contiennent une boucle Ig qui leur donne des similarités avec les CAM et donc une capacité d'adhésion. Cette structure peut aussi être impliquée dans le processus métastatique sur différents types cellulaires cancéreux (Brackenbury, 2012).

a) Na$_V$β1

La sous-unité Na$_V$β1 est hautement exprimée au niveau transcriptionnel dans une lignée cellulaire cancéreuse mammaire faiblement métastatique (MCF7), en particulier au niveau des lamellipodes, et faiblement exprimée dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire fortement métastatiques (MDA-MB-231) (Chioni *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2012). Une sous-expression expérimentale de cette sous-unité, par l'utilisation d'un siARN (petit ARN (acide ribonucléique) interférent) dans les cellules MCF7, induit une augmentation de la migration cellulaire de plus de 100% et une diminution de l'adhésion cellulaire d'environ 35% (Chioni *et al.*, 2009). Il a également été démontré que la surexpression stable de la sous-unité Na$_V$β1 dans les cellules MDA-MB-231 conduit à une augmentation de l'adhésion cellule-cellule et cellule-substrat, et réduit la migration (Chioni *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que cette sous-unité préviendrait l'invasion cellulaire cancéreuse dans un contexte de cancer du sein. En revanche, la surexpression de la sous-unité Na$_V$β1 dans les cellules MDA-MB-231 ne conduit pas à une augmentation de l'expression de la protéine E-cadhérine (Nelson *et al.*, 2014).

La sous-unité Na$_V$β1 est fortement exprimée dans une lignée cellulaire cancéreuse pulmonaire (A549), comparée à une lignée cellulaire hautement invasive (H460), induisant l'adhésion cellulaire, et réduisant l'invasion cellulaire (Campbell *et al.*, 2013).

De façon contradictoire, le niveau d'ARNm (ARN messager) et protéique de la sous-unité Na$_V$β1 a été investigué dans les biopsies de cancer du sein et il a été montré que cette sous-unité est plus abondante dans le cancer que dans les tissus non cancéreux (Nelson *et al.*, 2014 ; Bon *et al.*, 2016). *In vivo*, l'implantation de cellules MDA-MB-231, surexprimant cette sous-unité, dans le coussin adipeux mammaire de souris immunodéficientes, augmente la taille de la tumeur primaire, sa vascularisation par la régulation positive de la sécrétion du VEGF (vascular endothelial growth factor) et réduit l'apoptose cellulaire intratumorale. Ces résultats suggèrent que cette sous-unité est pro-invasive (Nelson *et al.*, 2014). Ces phénomènes sont amplifiés par l'expression des sous-unités Na$_V$α et de l'activité de la kinase fyn (Brackenbury *et al.*, 2008 ; Brackenbury *et al.,* 2010). Par ailleurs, l'invasion des cellules cancéreuses MDA-MB-231 est réduite par l'utilisation d'un siARN Na$_V$β1 (Bon *et al.*, 2016).

Par ailleurs, comme pour les biopsies cancéreuses mammaires, l'ARNm de *SCN1B* est plus exprimé dans les celles du cancer du col de l'utérus en comparaison des biopsies non-cancéreuses appariées (Hernandez-Plata *et al.*, 2012). Dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus, la sous-unité Na$_V$β1 module la proportion de cellules en phase G0/G1, altérant de ce fait le cycle cellulaire et la prolifération (Sanchez-Sandoval et Gomora, 2019). L'ARNm de cette sous-unité est plus exprimé dans les lignées cellulaires cancéreuses prostatiques fortement invasives (PC-3), comparé à une lignée cellulaire du même type cancéreux faiblement invasive (LNCaP), et semble corrélée avec l'activité métastatique (Diss *et al.*, 2008). Ces résultats sont donc en contradiction avec ceux obtenus par Chioni

et al., en 2009, mais semblent plus cohérents du fait de la confirmation avec le modèle *in vivo*.

Certaines mutations ont été trouvées sur le gène *SCN1B,* en particulier la mutation C121W qui pourrait moduler l'adhésion cellulaire (Brackenbury and Isom, 2011).

b) Na$_V$β2

Dans une lignée cellulaire cancéreuse prostatique (LNCaP), la surexpression expérimentale de la sous-unité Na$_V$β2 donne un phénotype allongé aux cellules, ce qui contribue à l'augmentation de la motilité cellulaire et l'invasion. Ce phénotype allongé a aussi été observé dans des biopsies cancéreuses du col de l'utérus, où la sous-unité Na$_V$β2 est exprimée (Jansson *et al.*, 2012 ; Hernandez *et al.*, 2012). Toujours dans les cellules cancéreuses prostatiques, sa surexpression expérimentale induit l'invasion dans des expériences contenant une matrice extracellulaire de Matrigel^{TM} (Jansson *et al.*, 2012). Cette sous-unité a également été montrée pour induire la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion lorsqu'elle est surexprimée dans des cellules LNCaP, co-cultivées avec des coupes *ex vivo* de moelle épinière. Ces résultats pourraient suggérer que cette sous-unité Na$_V$β2 pourrait promouvoir la progression cancéreuse et permettre la dissémination métastatique (Jansson *et al.*, 2014).

Des expériences *in vivo* ont montré une tumeur réduite avec un volume tumorale plus faible par l'injection sous-cutanée de la lignée cellulaire LNCaP surexprimant Na$_V$β2 sur des souris immunodéprimées. Ces résultats semblent en contradiction avec ceux obtenus *in vitro* ; cependant, cela pourrait s'expliquer par le fait qu'il y ait un rôle différent de la sous-unité Na$_V$β2 dans la formation tumorale et dans le processus métastatique (Jansson *et al.*, 2012).

c) $Na_V\beta3$

La sous-unité $Na_V\beta3$ pourrait aussi être impliquée dans le processus cancéreux, mais contrairement aux sous-unité $Na_V\beta1$ et $Na_V\beta2$, cette sous-unité pourrait avoir une fonction suppresseur de tumeurs.

La sous-unité $Na_V\beta3$ n'est pas exprimée dans les cellules cancéreuses hautement métastatiques MDA-MB-231, ni dans les MCF7. Elle est exprimée à de très faibles niveaux dans les cellules du cancer du col de l'utérus, de la prostate et le cancer pulmonaire (Gillet *et al.*, 2009 ; Chioni *et al.*, 2009 ; Diss *et al.*, 2008 ; Hernandez-Plata *et al.*, 2012 ; Roger *et al.*, 2007 ; Campbell *et al.*, 2013). Dans des biopsies de cancer du col de l'utérus, l'expression de *SCN3B* est diminuée en comparaison avec les tissus non cancéreux (Hernandez-Plata *et al.*, 2012). Dans des biopsies colorectales métastatiques de haut grade, le gène *SCN3B* a été montré pour subir deux mutations faux-sens : Q89K et A195T (Sjoblom *et al.*, 2006).

Dans les lignées cellulaires cancéreuses, il a été démontré que cette sous-unité est surexprimée lors d'un dommage de l'ADN ou après la surexpression de la protéine p53, à cause de deux éléments de réponse à cette protéine sur le gène *SCN3B*. La protéine p53 régule alors de manière positive les transcrits de la sous-unité $Na_V\beta3$ et conduit à l'activation de voies de signalisation apoptotiques (Adachi *et al.*, 2004). Dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus, l'oncogène E6, qui est exprimé suite à l'infection par le papillomavirus humain, induit l'ubiquitination et la dégradation de la protéine p53 et empêche alors la sous-unité $Na_V\beta3$ d'exercer son effet pro-apoptotique (Scheffner et al., 1993).

d) $Na_V\beta4$

La sous-unité $Na_V\beta4$ est la moins étudiée et décrite à ce jour. Il est alors difficile de déterminer ses potentielles interactions et son rôle dans la progression cancéreuse.

L'expression du gène *SCN4B* est fortement diminué dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus comparée aux cellules non-cancéreuses provenant de cultures primaires, induisant l'invasion des cellules cancéreuses, alors que des observations opposées ont été faites dans les biopsies (Hernandez-Plata *et al.*, 2012 ; Sanchez-Sandoval et Gomora, 2019). Il a également été montré que cette sous-unité est sous-exprimée dans les tissus cancéreux colorectaux, pulmonaires et prostatiques, comparés aux tissus sains appariés (Bon *et al.*, 2016), ainsi que dans les tissus du cancer de la thyroïde papillaire comparé aux tissus normaux (Gong *et al.*, 2018).

Il a récemment été démontré, par immunohistochimie, que la sous-unité $Na_V\beta4$ est fortement exprimée dans des tissus mammaires non cancéreux et les biopsies cancéreuses mammaires de premier grade mais diminuée dans celles de haut grade pour être presque absente dans les métastases (Gillet *et al.*, 2009 ; Bon *et al.*, 2016). Cette observation a été confirmée par des analyses en qPCR et western blot dans une lignée cellulaire mammaire non cancéreuse (MCF10A) comparée à des lignées cellulaires mammaires cancéreuses (MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-435s, and MDA-MB-231). L'expression du gène *SCN4B* est la plus dérégulée dans les cellules cancéreuses comparé aux autres sous-unités (Bon *et al.*, 2016).

Dans les cellules cancéreuses mammaires, la sous-expression de $Na_V\beta4$ conduit à une augmentation de l'invasion cellulaire, indépendamment des sous-unités $Na_V\alpha$, en particulier $Na_V1.5$. Cette dernière est la sous-unité $Na_V\alpha$ la plus exprimée dans les cellules cancéreuses mammaires et a été montré pour induire

l'invasivité cellulaire (Roger *et al.*, 2015 ; Bon *et al.*, 2016). La perte de la sous-unité Naᵥβ4 est alors responsable de l'induction de la migration et de l'invasivité cellulaire, observées par des expériences de suivi de cellule en time-lapse (Bon *et al.*, 2016). Dans des cellules n'exprimant pas la sous-unité Naᵥβ4 par une stratégie shARN (petit ARN en épingle à cheveux), une diminution du nombre de structures cellulaires similaires aux filopodes et de la taille cellulaire est observée. Ce changement peut être la conséquence à une adaptation d'un phénotype amœboide pour être capable de migrer par petits intervalles de la matrice extracellulaire (Bon *et al.*, 2016). Par ailleurs, une analyse de l'activité des RhoGTPases (qui sont connues pour être impliquées dans le mouvement amœboide), dans les mêmes lignées cellulaires, a déterminé que la perte de la sous-unité Naᵥβ4 conduit à une augmentation de la forme active de RhoA (forme liée au GTP). Il a été montré par une expérience de proximité (PLA - proximity ligation assay) que les protéines RhoA et Naᵥβ4 sont en proche association dans les cellules MDA-MB-231 (Bon *et al.*, 2016). Enfin, il est important de signaler que ces fonctions sont induites par le domaine intracellulaire de Naᵥβ4, et non par la fonction CAM de la protéine. En effet, des formes tronquées de Naᵥβ4, dépourvues du domaine intra- ou extra-cellulaire ont été surexprimées dans les cellules MDA-MB-231 sh*SCN4B.* La surexpression de la forme dépourvue de l'extrémité extracellulaire entraîne une diminution de l'invasion, de la vitesse de migration et de l'activité RhoA de façon similaire à celle obtenue par la réintroduction de la forme entière de Naᵥβ4. La forme dépourvue de l'extrémité intracellulaire n'a, quant à elle, pas eu d'effets sur ces mêmes caractéristiques, en comparaison avec la condition contrôle des cellules MDA-MB-231 sh*SCN4B* (Bon *et al.*, 2016). De plus, la colonisation métastatique des organes par les cellules cancéreuses est amplifiée par la perte de la sous-unité Naᵥβ4 (Bon *et al.*, 2016). Ainsi, cette étude dévoile la fonction de *SCN4B*/Naᵥβ4 comme un gène suppresseur de métastases (Bon *et al.*, 2016).

Très récemment, deux nouvelles études des cancers de la prostate (Huang *et al.*, 2020) et colorectal (Dai *et al.*, 2020) ont montré que la sous-expression de

Na$_V$β4, due à des microARN, augmente la croissance cellulaire, la migration, l'invasion, l'expression de la N-cadhérine et diminue celle de la E-cadhérine ainsi que la prolifération cellulaire et la progression métastatique *in vivo* (Huang *et al.*, 2020, Dai *et al.*, 2020).

e) Conclusion sur les sous-unités Na$_V$β dans le cancer

Ainsi, il a été démontré que le niveau d'expression des sous-unités Na$_V$β est différent selon le type de cancer, le grade cancéreux, ainsi que dans les lignées cellulaires cancéreuses (Tableau 2). L'étude des causes de l'augmentation ou de la diminution de l'expression des sous-unités Na$_V$β devrait être réalisée.

Leur rôle pour la modulation des canaux ioniques Na$_V$α a été démontré depuis longtemps, mais leur implication sur l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire est de plus en plus évidente. Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre toutes leurs fonctions et leurs liens avec les voies de signalisation pour trouver des stratégies adéquates pour une thérapie anti-cancéreuse. Ainsi, leurs potentielles interactions protéiques et leurs voies de signalisation cancéreuses devraient être mises en évidence.

Tableau 2 : Les sous-unités Naᵥβ dans les cancers

Protéine	Gène	Type de cancer	Observations dans cancer	Références
Naᵥβ1	*SCN1B*	Sein	Forte expression transcriptionnelle : lignée cellulaire cancéreuse faiblement métastatique (MCF7). siARN Naᵥβ1 (MCF7) : → Migration cellulaire → Diminution de l'adhésion cellulaire	Chioni *et al.*, 2009
			Faible expression : lignée cellulaire cancéreuse fortement métastatiques (MDA-MB-231). Surexpression stable Naᵥβ1 (MDA-MB-231) : → Adhésion cellule-cellule et cellule-substrat → Réduction migration cellulaire	Yang *et al.*, 2012
			Forte expression : tissus cancéreux siARN Naᵥβ1 (MDA-MB-231) : ➔ Réduction invasion cellulaire	Nelson *et al.*, 2014
			Implantation dans le coussin adipeux mammaire de souris immunodéficientes (MDA-MB-231 surexprimant Naᵥβ1) : → Augmentation taille tumeur → Vascularisation → Réduction apoptose cellulaire intratumorale	Bon *et al.*, 2016
		Poumon	Forte expression : lignée cellulaire cancéreuse A549 Faible expression : lignée cellulaire cancéreuse hautement invasive H460 → Adhésion cellulaire → Réduction invasion cellulaire	Campbell *et al.*, 2013

Protéine	Gène	Type de cancer	Observations dans cancer	Références
Navβ1	*SCN1B*	Col de l'utérus	Forte expression : tissus cancéreux Cellules cancéreuses : → Modulation cycle et prolifération cellulaire	Hernandez-Plata *et al.*, 2012 Sanchez-Sandoval et Gomora, 2019
		Prostate	Faible expression : lignée cellulaire cancéreuse faiblement invasive (LNCaP) Forte expression : lignée cellulaire cancéreuse fortement invasive (PC-3) : → Activité métastatique	Diss *et al.*, 2008
Navβ2	*SCN2B*	Col de l'utérus	Forte expression : tissus cancéreux → Phénotype allongé	Hernandez *et al.*, 2012
		Prostate	Surexpression expérimentale (LNCaP) : → Phénotype allongé → Motilité et invasion cellulaire Injection sous-cutanée (LNCaP surexprimant Navβ2) sur des souris immunodéprimées : → Tumeur réduite avec volume tumorale plus faible	Jansson *et al.*, 2012 Jansson *et al.*, 2014

Protéine	Gène	Type de cancer	Observations dans cancer	Références
Naᵥβ3	*SCN3B*	Sein	Pas d'expression : lignées cellulaires cancéreuses MCF7 et MDA-MB-231	Gillet *et al.*, 2009 Chioni *et al.*, 2009
		Colon-rectum	Deux mutations faux-sens (Q89K et A195T) : tissus métastatiques de haut grade	Sjoblom *et al.*, 2006
		Poumon	Faible expression : tissus cancéreux	Roger *et al.*, 2007
		Col de l'utérus	Faible expression : cellules et tissus cancéreux	Hernandez-Plata *et al.*, 2012
		Prostate	Faible expression : tissus cancéreux	Diss *et al.*, 2008

Protéine	Gène	Type de cancer	Observations dans cancer	Références
Na$_V$β4	*SCN4B*	Sein	Faible expression : tissus cancéreux haut grade et métastases	
			Faible expression : lignées cellulaires MCF7, MDA-MB-468, MDA-MB-435s, and MDA-MB-231 → Invasion cellulaire → Augmentation activité RhoA (domaine intracellulaire de Na$_V$β4)	Gillet *et al.*, 2009 Bon *et al.*, 2016
		Colorectal	Faible expression : tissus cancéreux → Prolifération cellulaire *in vitro* → Progression métastatique *in vivo*	Bon *et al.*, 2016 Dai *et al.*, 2020
		Col de l'utérus	Faible expression : cellules de culture primaire	Hernandez-Plata *et al.*, 2012
			Cellules cancéreuses : → Invasion cellulaire	Sanchez-Sandoval et Gomora, 2019
			Forte expression : tissus cancéreux	Hernandez-Plata *et al.*, 2012
		Prostate	Faible expression : tissus cancéreux	
			Cellules cancéreuses : → Croissance cellulaire → Migration, invasion cellulaire → Expression de N-cadhérine → Diminution expression de E-cadhérine	Bon *et al.*, 2016 Huang *et al.*, 2020

Objectifs de la thèse

La sous-unité Naᵥβ4 est une protéine transmembranaire, essentiellement étudiée pour son rôle « auxiliaire » des canaux sodiques dépendants du voltage (Naᵥ). Le rôle de cette sous-unité n'a été que très peu étudiée dans les cancers, mais son rôle anti-invasif dans les cellules cancéreuses mammaires a récemment été mis en évidence (Bon *et al.*, 2016). Par ailleurs, ses fonctions, indépendamment des Naᵥα, notamment dans les tissus épithéliaux non cancéreux, ne sont pas connues.

Les objectifs de ce projet de thèse ont donc été 1) de comprendre le rôle de la sous-unité Naᵥβ4 dans une lignée cellulaire épithéliale mammaire non cancéreuse, notamment sur la polarité épithéliale et la transition épithélio-mésenchymateuse, 2) d'étudier le rôle de sa perte d'expression dans les étapes précoces de la carcinogenèse mammaire et enfin 3) d'étendre son implication dans d'autres types de cancer tels que le cancer colorectal.

Pour répondre à ces questions, nous avons d'abord mis au point des modèles cellulaires inhibant de manière stable l'expression de la protéine Naᵥβ4 dans les lignées cellulaires mammaires non cancéreuse MCF10A, et cancéreuse MDA-MB-231 par la technologie CRISPR/Cas9, et dans la lignée cellulaire colorectale cancéreuse HCT116-Luc, par la technologie shARN. Nous avons aussi réduit l'expression de Naᵥβ4 de façon transitoire par l'utilisation de siARN spécifique afin de vérifier certains de nos résultats obtenus avec la technologie CRISPR/Cas9. Une surexpression de la sous-unité Naᵥβ4 a aussi été réalisée dans ces cellules afin de confirmer son rôle dans les différents paramètres étudiés.

Nous avons étudié l'organisation épithéliale et l'invasivité cellulaire par la réalisation de structures cystiques tridimensionnelles dans un environnement matriciel. Nous avons également étudié la motilité, la migration et l'invasion cellulaires, qui sont des caractéristiques de cellules cancéreuses, par le suivi de

cellules en time-lapse et par l'utilisation d'inserts recouverts ou non d'une couche de matrice extracellulaire. L'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse a été réalisée par l'analyse de l'expression transcriptionnelle et protéique de différents acteurs entrant en jeu dans ce processus. Une étude toute particulière s'est portée sur la protéine β-caténine.

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires humaines utilisées pour mener à bien ce projet de thèse étaient :

- La lignée cellulaire épithéliale mammaire non-cancéreuse MCF10A, dérivée d'une population de cellules adhérentes d'une femme caucasienne de 36 ans, ne montrant pas de signe de différenciation ou de sénescence. Ces cellules expriment entre autres des cytokératines épithéliales et répondent à l'insuline, glucocorticoïdes, la toxine cholérique et la facteur de croissance épidermique (EGF). Elles sont également capables de croître en trois dimensions dans un environnement collagénique (Soule *et al.*, 1990).
- La lignée cellulaire cancéreuse mammaire MDA-MB-231, dérivée d'un site métastatique, un épanchement pleural, d'un adénocarcinome de la glande mammaire d'une femme caucasienne de 51 ans. Ces cellules expriment les récepteurs à l'EGF et au TGFα (transforming growth factor). Injectées *in vivo*, ces cellules provoquent un adénocarcinome de grade III (Cailleau *et al.*, 1974).
- Et la lignée cellulaire cancéreuse colorectale HCT116, dérivée d'un carcinome colorectal d'un homme. Ces cellules expriment la kératine et les TGFβ1 et 2, et produisent un effet *in vivo* injectées dans des souris immunodéprimées (Brattain *et al.*, 1981).

L'ensemble de ces lignées cellulaires provenait de l'American Type Culture Collection (ATCC, LGC promochem, France).

Les lignées cellulaires mammaires MCF10A ont été cultivées dans un milieu DMEM-F12 (Gibco™ 11330) supplémenté de 5% de sérum de cheval (Dutscher S0900-500), 20 ng/mL EGF (Sigma E9644), 500 ng/mL hydrocortisone (Sigma H0888), 100 ng/mL toxine cholérique (Sigma C8052) et 10 µg/mL insuline (Sigma I9278).

Les lignées cellulaires cancéreuses mammaire MDA-MB-231 et colorectale HCT116 ont été cultivées dans un milieu DMEM à haute teneur en glucose (4,5g/L) (Gibco™ 41966) supplémenté de 5 et 10% de sérum de veau fœtal (Hyclone SV30160.03) respectivement. Les cellules colorectales ont été transformées génétiquement pour exprimer de façon stable le gène de la luciférase. Celui-ci permet de suivre l'évolution tumorale lorsque des expériences *in vivo* sont réalisées par imagerie de bioluminescence.

Les cellules ont été placées dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO_2.

II. Sélection des lignées cellulaires CRISPR/Cas9 $Na_V\beta4$

Afin de réaliser ce projet de thèse, il était essentiel d'obtenir des lignées cellulaires mammaires dépourvues ou présentant une sous-expression du gène *SCN4B*, codant pour la protéine $Na_V\beta4$. De ce fait, un plasmide (Santa Cruz sc-411001), contenant notamment des ARN guides reconnaissant l'ARN cible, a été transfecté dans les cellules MCF10A et MDA-MB-231 par l'utilisation de lipofectatime 2000 (Invitrogen 11668-019). Ce plasmide, pourvu d'un gène de résistance à la puromycine procure une résistance à cet antibiotique pour les cellules transfectées. Ainsi, 10 µg/mL de puromycine ont été ajoutés au milieu des cellules, ce qui a eu pour conséquence de sélectionner les cellules transfectées. Après deux jours de traitement à la puromycine, le milieu de ces cellules a été remplacé par un milieu de culture cellulaire normal, sans plasmide, lipofectamine et sans antibiotique.

Cinq jours après la transfection, le milieu a été retiré et les cellules ont été lavées au PBS sans calcium ni magnésium (PBS, Dutscher L0615) et décollées par l'utilisation de trypsine (Gibco™ 25300054). Toutes les cellules restantes ont été récupérées et ensemencées dans un puits de plaque 24 puits pour permettre

l'amplification cellulaire. Le milieu de ces cellules a été changé tous les trois jours environ.

Les cellules ont été triées par cytométrie en flux (BD biosciences BD FACS Melody) afin d'ensemencer une cellule par puits dans une plaque 96 puits à fond incurvée (Falcon 353077) et ainsi obtenir un clone cellulaire. Une trentaine de clones cellulaires différents par lignée cellulaire ont été sélectionnés. Afin d'obtenir différents clones et ainsi maximiser les chances d'obtenir un clone cellulaire présentant une bonne sous-expression de Naᵥβ4, plusieurs clones de morphologie différente et de colonie de taille différente (croissance/prolifération cellulaire plus ou moins rapide) ont été sélectionnés et ensemencés chacun dans un puits de plaque 48 puits, puis amplifiés.

Ensuite, l'expression protéique de Naᵥβ4 a été évaluée pour chacun des clones cellulaires des lignées cellulaires MCF10A et MDA-MB-231 par western blot pour la validation de la sous-expression de Naᵥβ4. Les clones sous-exprimant Naᵥβ4 de façon stable ont été testés plusieurs fois par RT-qPCR et western blot afin de confirmer la sous-expression stable de *SCN4B* et Naᵥβ4.

III. Lignées cellulaires shARN Naᵥβ4

De la même façon que pour les lignées cellulaires mammaires, il a été nécessaire d'obtenir des cellules cancéreuses colorectales HCT116-Luc, possédant le gène de la luciférase, qui sous-expriment de manière stable de Naᵥβ4 afin de comprendre le rôle de cette protéine dans la progression tumorale colorectale.

Différentes séquences cibles de shARN pour Naᵥβ4 ont été utilisées (sh Naᵥβ4 #1 : 5'-GTTCAGCGACACGGGCAAATACTCGAGTATTTGCCCGTGTCGCTGAAC-3', sh Naᵥβ4 #2 : 5'-AGAGGAGAAACCACCTTCAAACTCGAGTTTGAAGGTGGTTTCTCCTCT-3', sh

Na$_V$β4 #R : 5'-CAGCAGTGACGCATTCAAGATTCCTCGAGGAATCTTGAATGCGTCACTGCTG-3'). Cette procédure a été effectuée par une plateforme de l'Université de Liège en Belgique (Giga Viral Vectors Platform).

Les lignées cellulaires obtenues ont ensuite été testées par RT-qPCR et western blot afin de contrôler le niveau d'expression de *SCN4B* et Na$_V$β4 respectivement.

IV. Production de « cystes »

La production de « cystes » est une technique de culture cellulaire en trois dimensions permettant d'étudier les voies de signalisation impliquées dans l'organisation, l'orientation et la polarité des cellules épithéliales, *in vitro*. Cette méthodologie a notamment permis de déterminer l'effet de la réduction d'expression de Na$_V$β4 sur l'organisation cellulaire. Une mobilité d'un mois dans le laboratoire de la Professeure Stine H. F. Pedersen à l'Université de Copenhague (Danemark) m'a permis d'être formée à cette technique.

Une couche de 40 µL de Geltrex (Sigma A1413202), mimant la matrice extracellulaire, a été ajoutée au fond des puits du système de chambre de culture sur lame Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Thermo Scientific lame de 8 puits 154534). Celle-ci a ensuite été placée à 37°C pendant 20 minutes afin de permettre la gélification de la couche de Geltrex. Pendant cette incubation, les cellules ont été lavées, trypsinnées et comptées. Une solution de 25 000 cellules/mL contenant 25 µL de Geltrex/mL a alors été préparée. Un volume de 400 µL de cette solution cellulaire, soit 10 000 cellules/puits, a été placé sur la couche de Geltrex préalablement gélifiée dans chacun des puits de la chambre Lab-Tek^{TM}. La lame a ensuite été replacée à l'incubateur. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours, en rajoutant, à chaque fois, 25 µL de Geltrex/mL.

Après deux ou trois jours de croissance cellulaire, des « cystes » s'étaient formés et pouvaient d'ores et déjà être observés au microscope optique à lumière blanche (Invitrogen Evos M7000). Une image en contraste de phase a été prise avant les changements de milieu afin de suivre la croissance, la circularité et la présence de « cystes » (Figure 12).

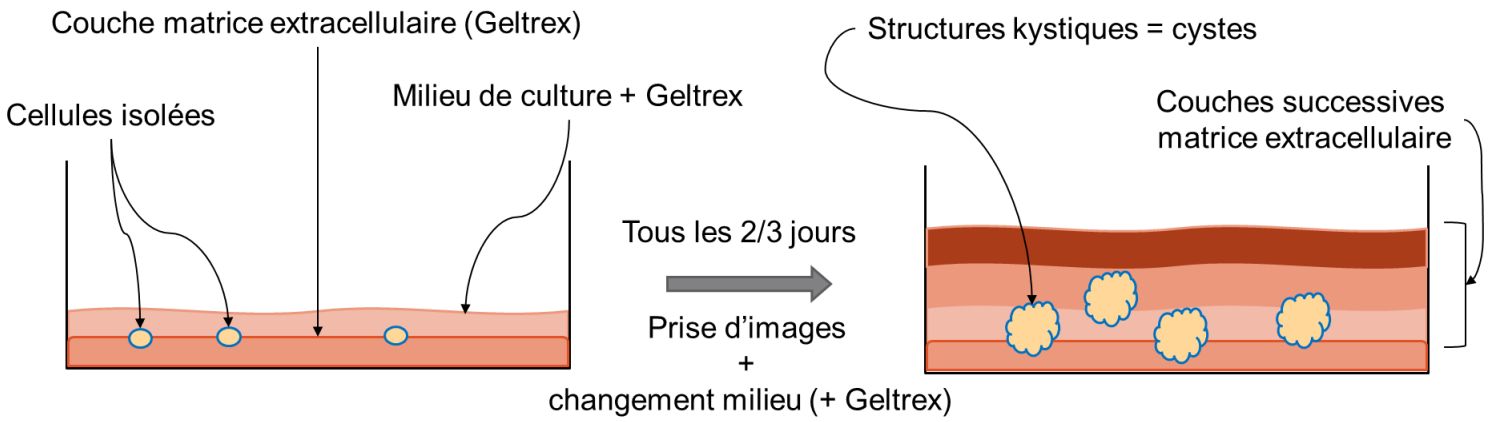


Figure 12 : Représentation schématique de la culture cellulaire tridimensionnelle de cystes.

Les cellules sont ensemencées sur une couche de matrice extracellulaire Geltrex®, puis recouvertes de milieu de culture contenant également la matrice extracellulaire. Tous les deux à trois jours, des images en contraste de phase sont prises et un changement de milieu est aussi effectué, ce qui créé des couches successives de matrice extracellulaire, enrobant les structures formées appelées cystes.

A l'issue de trois semaines de culture, le milieu de chacun des puits a été retiré et ces derniers ont été lavés deux fois avec du PBS. Puis, les « cystes » ont été fixées avec 4% de PFA (paraformaldéhyde, Invitrogen FB002) pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les « cystes » ont été lavés trois fois pendant 10 minutes avec une solution de Glycine (Sigma G8898) à 100 mM diluée dans du PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées pendant 5 minutes avec

une solution de 0,5% de Triton X-100 (Sigma T-9284) diluée dans du PBS, pour permettre l'incorporation des anticorps dans les cellules pour les marquages cytoplasmiques ou nucléaires. Les cellules ont de nouveau été lavées trois fois pendant 10 minutes avec du PBS. Une solution contenant 5% de BSA (bovine serum albumin, Sigma A4737) dans du PBS a été ajoutée dans les puits empêchant la fixation aspécifique des IgG sur les cellules pour 1h. Après le blocage des sites non spécifiques, un immunomarquage de la β-caténine (1/200, Cell Signaling Technology D10A8), de la E-cadhérine (1/1,000, Invitrogen 13-1700) et de la vimentine (1/100, ab92547) ont été réalisé par l'incubation des anticorps respectifs dans 150 µL d'une solution 5% BSA dans du PBS à 4°C toute la nuit. Les cellules ont été lavées deux fois au PBS puis les cellules ont été incubées une heure avec 150 µL d'une solution contenant du Hoechst (1/1000, Invitrogen H3569), permettant le marquage des noyaux, ainsi qu'une solution de DyLight™ 554 Phalloïdin (1/200, Cell Signaling Technology 13054S), servant à marquer les filaments d'actine, composant une partie du cytosquelette cellulaire, ainsi que les anticorps secondaires adéquats (1/600, A11008 ou A21238) dans une solution de PBS 5% de BSA. Après cette incubation, les cellules formant les « cystes » ont de nouveau été lavées quatre fois pendant 10 minutes avec du PBS. La lame Lab-Tek a été conservée à 4°C avant la prise des photographies réalisées au microscope confocal à l'objectif x20 (LEICA SP8 STED).

V. Etude de la dégradation de la matrice extracellulaire

Afin d'étudier la dégradation de la matrice extracellulaire lors de la production de « cystes » des lignées cellulaires issues de MCF10A, un protocole a été mis en place. Ce dernier est quasiment identique que celui de la production de kystes mais la couche mise au fond des puits de la chambre Lab-Tek™ contenait en plus 25 µg/mL de DQ-Gelatine 488 (Molecular Probes D12054) mélangés au Geltrex. De plus, la solution cellulaire préparée, contenant 25 000 cellules pour 1 mL de milieu final a également été supplémentée de 25 µg/mL de DQ-Gelatine. Cette DQ-Gelatine émet une fluorescence à environ 515 nm lorsqu'elle est dégradée. Des images au microscope à fluorescence (Invitrogen Evos M7000) ont été prises tous les deux jours sur trois semaines à l'objectif x20. L'intensité de fluorescence a été mesurée et quantifiée par rapport à la surface des « cystes » observés.

VI. Time lapse – suivi de migration individuelle

Les cellules CRISPR développées à partir des lignées MCF10A, MDA-MB-231 ont été placées dans une plaque 24 puits à raison de 15 000 cellules par puits contenant 500 µL de milieu adéquat. Après 24h de culture, un changement de milieu a été effectué et la plaque a été mise dans la chambre incubée du microscope optique time lapse (microscope Nikon TI-S, 37°C, 5% CO_2). Une image a été prise toutes les 15 minutes pour une durée totale de 48h en lumière blanche pour chacune des conditions.

Les cellules ont ensuite été suivies, image par image, afin de déterminer leur localisation, retracer leur parcours et calculer la distance accumulée totale, permettant de rendre compte de la mobilité en 2D (deux dimensions) de ces cellules (logiciel ImageJ).

VII. Invasion / Migration cellulaire

Des inserts de migration ont été utilisés (Corning 353097), présentant des pores de 8 µm, placés dans une plaque 24 puits.

Une couche de 50 µL de Matrigel® (Corning 354230) à 0,3 µg/mL a été ajoutée au fond de ces inserts afin de mimer la matrice extracellulaire et donc étudier les capacités d'invasion cellulaire. La plaque contenant les inserts a été recouverte de parafilm (Bemis™ PM-996) pour éviter l'évaporation du Matrigel® et placée à 37°C. 24h après la préparation des inserts, 50 µL de milieu adéquat sans SVF a été ajouté sur la couche de Matrigel® pour la réhydrater pendant 1h à 37°C.

Que ce soit pour étudier la migration et l'invasion cellulaire, 700 µL de milieu adéquat contenant 10% de SVF a été ajouté au fond des puits de la plaque 24 puits. L'excès de milieu se trouvant au fond de l'insert a été retiré ; 100 000 cellules ont alors été ajoutées dans l'insert dans 400 µL de milieu adéquat contenant 0,1% de SVF, créant un gradient entre l'insert et le puits. L'expérience a été réalisée en triplicats. La plaque a de nouveau été placée à 37°C, dans une atmosphère humide à 5% de CO_2.

48h après incubation, les inserts ont été placés dans un bain de PBS avec Calcium et Magnésium (PBS Ca/Mg) (Gibco™™ 14040133) pour les rincer mais éviter de détacher les cellules. Ils ont ensuite été placés dans un bain de méthanol pur à -20°C (VWR 20846.292) pendant 10 minutes. Les inserts ont ensuite été lavés dans un bain d'eau distillée puis placés dans un bain d'une solution de PBS contenant du DAPI à 1 µg/mL (Invitrogen D1306) pendant 2 minutes afin de marquer le noyau des cellules. Puis, les inserts ont été lavés deux fois dans des bains d'eau distillée. L'intérieur des inserts a été gratté avec un coton-tige afin de retirer les cellules non invasives. De l'eau distillée a été ajoutée dans la plaque ainsi que dans les inserts.

Un microscope à fluorescence (Invitrogen Evos M7000) a été utilisé afin d'observer les noyaux marqués des cellules, pour une excitation à 405 nm. Cinq

photos par inserts ont été prises afin de recouvrir au maximum toute la surface de l'insert étudié.

Le nombre de noyaux ont été comptés sur chacune des photos. La somme des noyaux comptés a été effectuée pour les cinq photos prises par insert. Ensuite, une moyenne a été effectuée entre les triplicats. Cette moyenne a été ensuite comparée aux moyennes des autres conditions.

Ce protocole a été appliqué pour les lignées cellulaires dérivées des MCF10A, MDA-MB-231, ainsi que pour les lignées cellulaires colorectales dérivées des HCT116-Luc.

VIII. Test de mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité des lignées cellulaires mammaires MCF10A et les lignées cellulaires colorectales a été étudiée par un test MTT (sels de tétrazolium : 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide).

Les cellules ont été ensemencées, en duplicat, en plaque 24 puits à différentes densités par puits : 10^3, $5x10^3$, 10^4, $5x10^4$. La plaque a ensuite été incubée à 37°C, dans une atmosphère humide à 5% de CO_2 pendant 3 jours pour les lignées cellulaires colorectales et 4 jours pour les MCF10A avec un changement de milieu après 2 jours de culture. Le milieu de culture a été remplacé par un milieu de culture contenant 0,5 mg/mL de sels de tétrazolium (MTT, Sigma M2128) qui sont réduits en cristaux de formazan par des succinates déshydrogénases mitochondriales et cytosoliques des cellules vivantes. Après 1h d'incubation à 37°C et 5% de CO_2, le milieu est retiré et les cristaux de formazan violets ont été solubilisés dans 200 µL de DMSO (Fisher BP231-1). La plaque a été placée 30 minutes à température ambiante sous agitation. L'absorbance a ensuite été mesurée à 540 nm (BioTek EL800).

IX. Test de prolifération cellulaire – EdU

Une étude de prolifération a été réalisée sur les cellules mammaires non-cancéreuses MCF10A.

Les cellules ont été ensemencées à raison de 200 000 cellules dans un puits de plaque 6 puits. Après 72h, le milieu a été retiré et les cellules ont été incubées 2h dans du milieu frais contenant 10 µM d'EdU, selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont ensuite été décollées, lavées et l'incorporation d'EdU évaluée par marquage fluorescent grâce au kit Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen C10633), en suivant les instructions du fabricant. Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux (BD Facs Canto).

X. PLA (Proximity Ligation Assay)

Le test de PLA permet d'étudier la proximité de deux protéines dans une cellule. Pour ce faire, des coverslips ont été placés au fond de puits d'une plaque 24 puits. Un volume de 40 µL de solution de poly-L-lysine (1/200, Sigma P8920) a été ajoutée sur ces derniers pendant environ 20 minutes, puis lavés au PBS. Les cellules MCF10A ont été ensemencées à 25 000 cellules par puits. 72h après ensemencement, les cellules ont été lavées deux fois au PBS Ca/Mg, puis fixées avec du PFA 4% pendant 10 minutes sous faible agitation. Deux lavages au PBS ont été effectués pendant 5 minutes chacun, puis un lavage avec une solution de Glycine (100 mM) pendant 5 minutes. Les cellules ont été perméabilisées par l'ajout d'une solution contenant du Triton X-100 pendant 15 minutes. Puis, le protocole du kit DuoLink® (Sigma DUO92004, DUO92002, DUO92008 et DUO82040) a été appliqué. Brièvement, les anticorps polyclonal anti- Na$_V$β4 (de lapin, 1/100, Sigma HPA017293) et monoclonal anti-β-caténine (de souris, 1/200, Cell Signaling Technology L54E2) vont se fixer à ces protéines. Les sondes PLA, comme des anticorps secondaires, reconnaissent alors les espèces (lapin et souris) et sont conjugués à des oligos. Une étape d'hybridation est effectuée, si les deux protéines

interagissent, les sondes PLA se lient. Ensuite, une étape de ligation est nécessaire afin de générer un modèle d'ADN et d'amplifier par la suite les sondes PLA en simple brin par une polymérase. Des sondes de détection sont ensuite hybridées, par séquence complémentaire, sur l'amplicon et permet la localisation du signal par microscopie optique à fluorescence (594 nm dans notre étude, Invitrogen Evos M7000). Le nombre de points a alors été compté et rationalisé par cellule.

XI. Génération de plasmides de surexpression de *SCN4B*

Différents plasmides pcDNA3.1 contenant la séquence du gène *SCN4B* ont été créés par notre laboratoire et synthétisés par la société Synbio Technologies (Figure 13).

Un premier plasmide contient uniquement la forme entière de ce gène.

Un second plasmide, nommé p*SCN4B* dans le reste du manuscrit, contient la même séquence avec un tag GFP sur l'extrémité N-terminale et un tag Histidine (His) sur l'extrémité C-terminale ; ces tags nous permettent de vérifier la qualité de la transfection et de la traduction du plasmide par la fluorescence de la GFP. Le tag His a pour objectif de faciliter l'immunomarquage de la protéine en western blot ou son immunoprécipitation pour d'autres application.

Un troisième plasmide contient la séquence entière du gène *SCN4B* avec certains acides aminés mutés. En effet, la protéine Naνβ4 contient des sites putatifs de clivage par les gamma-sécrétases, au niveau de deux lysines en position 184 et 185, après le domaine transmembranaire, car la charge positive de la lysine ou l'arginine a été identifié comme étant responsable de la reconnaissance par le complexe de gamma-secretases dans les huit premiers acides aminés dans le compartiment cytoplasmique (Xu *et al*., 2016). De ce fait, la lysine en position 184 a été remplacée par un acide aspartique (K184D) et celle en position 185 remplacée par une thréonine (K185T) afin de perdre la charge positive. L'intérêt de cette construction est de déterminer si la protéine Naνβ4 exerce son effet anti-invasif

après clivage par les gamma-sécrétases er la libération d'un fragment intracellulaire.

Un quatrième et dernier plasmide a été créé, codant pour un fragment soluble intracellulaire de Navβ4. Celui-ci contient la séquence intracellulaire de Navβ4, après clivage par le complexe des gamma-secretases, avec un tag GFP sur l'extrémité N-terminale et un tag histidine sur l'extrémité C-terminale.

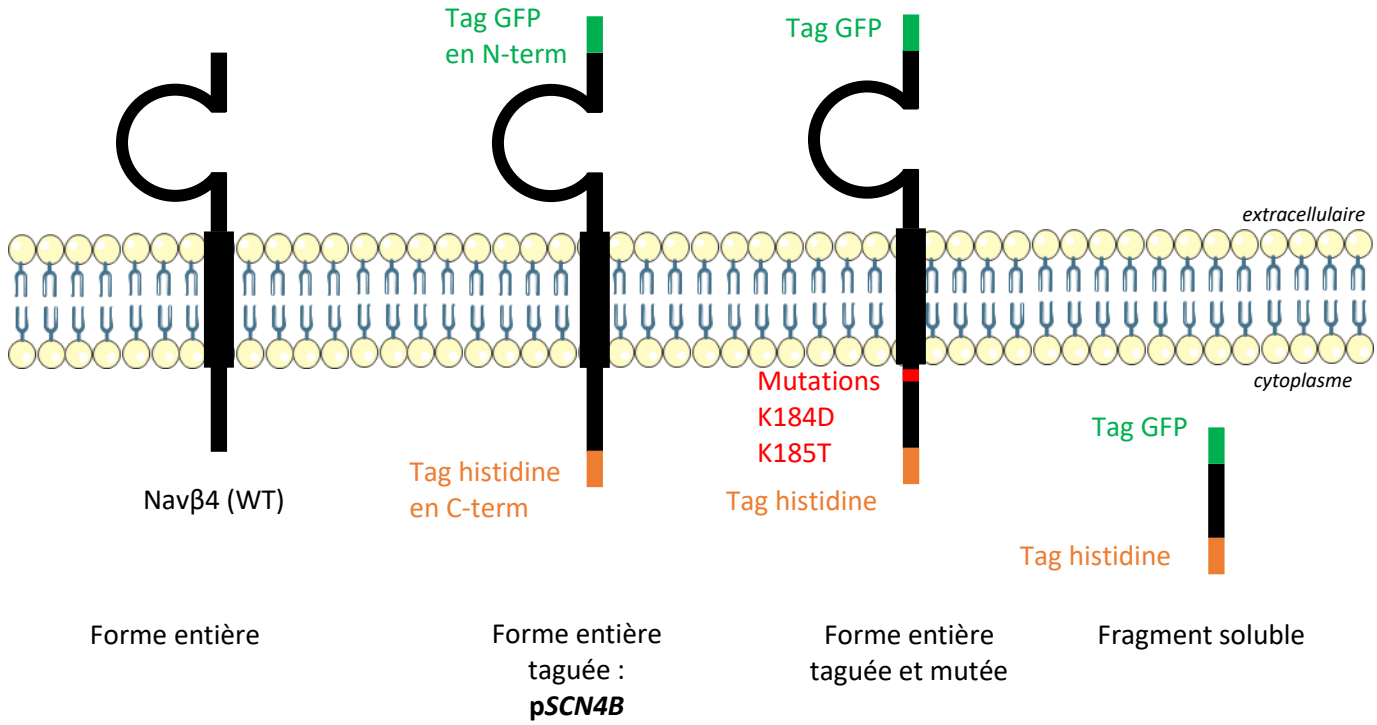


Figure 13 : Représentation schématique des différentes constructions réalisées pour le gène *SCN4B*.

XII. Transfection – siARN et surexpression de $Na_V\beta4$

Les cellules mammaires non cancéreuses issues de la lignée MCF10A et les clones CRISPR ont été transfectées afin de sous-exprimer ou sur-exprimer la protéine $Na_V\beta4$.

Tout d'abord, les cellules ont été ensemencées à une densité de 600 000 cellules par puits de plaque 6 puits et sont laissées 24h dans l'incubateur.

Pour la sous-expression, le milieu de culture des cellules est retiré et remplacé par 1 mL de milieu de culture frais et la plaque est replacée à l'incubateur pour environ 1h. Pendant ce temps, le siARN $Na_V\beta4$ (SMARTpool ON TARGETplus *SCN4B* siRNA L-017875-00-0005) et siCTL (ON TARGETplus non-targeting siRNA #1 D-001810-01-05) ont été mélangés indépendamment à un mix contenant la solution de transfection et l'agent de transfection (Pepmute™ SL100566) selon les recommandations du fournisseur. Deux concentrations de siARN peuvent être utilisées (5 ou 30 nM) et ont toutes les deux été testées. Cependant, seule la concentration de 30 nM a été sélectionnée pour nos expériences.

Pour la surexpression de $Na_V\beta4$ dans les cellules MCF10A ou les clones CRISPR, le milieu de culture des cellules a été retiré et remplacé par 2 mL de milieu de culture frais. 2 µg de plasmide pcDNA3.1 *SCN4B* FL+GFP+His ou pcDNA3.1 eGFP, utilisé pour le contrôle, ont été mélangés avec du milieu de culture dépourvu de sérum ainsi que l'agent de transfection lipofectamine 2000 (Invitrogen 11668-019) selon les recommandations du fournisseur.

Les plaques ont été placées à l'incubateur pour 48h avant de procéder aux analyses.

XIII. Extraction ARN et RT-qPCR

Afin d'étudier l'expression transcriptionnelle de différents gènes des lignées cellulaires étudiées, des expériences de RT-qPCR (rétro-transcription et réaction en chaîne par polymérase en temps réel) ont été effectuées après avoir extrait l'ARN des cellules.

Tout d'abord, de la même façon que pour l'expérience de western blot, les cellules mammaire non cancéreuses MCF10A ont été ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 600 000 cellules par puits et laissées 48h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ont été ensemencées à une densité de 300 000 cellules par puits. Les cellules cancéreuses colorectales HCT116-Luc ont été ensemencées à une densité de 400 000 cellules par puits.

Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS Ca/Mg, puis, pour extraire les ARN totaux contenu dans les cellules, une solution de Trizol™ (Invitrogen 15596018) a été utilisée, selon le protocole du fabricant. Les échantillons ont ensuite été dosés afin de déterminer la concentration d'ARN avec le NanoDrop 2000 (ThermoFisher) par une mesure d'absorbance à 260 nm. Les absorbances à 280 et 230 nm ont également été mesurées afin d'évaluer la contamination éventuelle des échantillons par les protéines et les solvants ou sels de guanidine, respectivement.

Les ARN totaux purifiés sont ensuite rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) grâce au kit PrimeScript™ RT reagent kit (RR037A, TAKARA), selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons d'ADNc obtenus étaient concentrés à 50 ng/µL.

Les ADNc ainsi obtenus ont été utilisés pour une étude par PCR en temps réel, (qPCR), grâce au kit TB green SybrGreen (RR420L), selon les

recommandations du fournisseur. Les amorces sens et anti-sens des gènes d'intérêt étudiés utilisées sont répertoriées dans le tableau 3. L'amplification et la lecture de la fluorescence (λ 510 nm) ont été réalisées avec le LightCycler 384 puits (Roche).

Le ΔΔCt est ensuite calculé, ce qui correspond à la différence de ΔCt entre les échantillons et l'échantillon contrôle. Puis, les valeurs sont ramenées à la valeur de 1 pour pouvoir comparer les échantillons contrôles et les échantillons conditions par la formule : Puissance (2 ; - ΔΔCt), la valeur 2 correspondant à l'efficacité des couples d'amorces sens et anti-sens utilisées, permettant alors d'obtenir l'expression transcriptionnelle relative.

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées en RT-qPCR.

Gène	Protéine corres-pondante	Amorce sens (5' – 3')	Amorce anti-sens (5' – 3')	Taille de l'ampli con (pb)
SCN5A	Na$_v$1.5	CACGCGTTCACTTTCCTTC	CATCAGCCAGCTTCTTCACA	208
SCN4B	Na$_v$β4	GAAGTCTGACCCCAAGGTGA	CACATGGCAGGTGTATTTGC	139
CTNNB1	β-caténine	CCCACTAATGTCCAGCGTTT	GCATGATAGCGTGTCTGGAA	214
CDH1	E-cadhérine	CGACCCAACCCAAGAATCTA	GGCTGTGCCTTCCTACAGAC	171
SNAI1	Snail	GGTTCTTCTGCGCTACTGCT	TAGGGCTGCTGGAAGGTAAA	157
SNAI2	Slug	GAGCATTTGCAGACAGGTCA	GCTTCGGAGTGAAGAAATGC	200
TWIST1	Twist1	CCACTGAAAGGAAAGGCATC	GCATTTTACCATGGGTCCTC	229
ZEB1	Zeb1	GCACCTGAAGAGGACCAGAG	GTGTAACTGCACAGGGAGCA	200
VIM	Vimentine	GTTTCCAAGCCTGACCTCAC	TTCCAGGGACTCATTGGTTC	246
ACTA2	α-SMA	ACCCGATAGAACATGGCATC	CATACATGGCTGGGACATTG	195

Gène	Protéine corres-pondante	Amorce sens (5' – 3')	Amorce anti-sens (5' – 3')	Taille de l'ampli con (pb)
CDH2	N-cadhérine	GGTGGAGGAGAA GAAGACCAG	GGCATCAGGCTCC ACAGT	72
HPRT1	Hprt1	TTGCTGACCTGCT GGATTAC	TATGTCCCCTGTTG ACTGGT	119

XIV. Inhibition du protéasome

Les cellules ont été ensemencées à une densité de 300 000 cellules par puits dans une plaque 6 puits et placées à l'incubateur pour 48h. Une solution contenant l'inhibiteur de protéasome MG132 (Sigma M7449) dans du milieu de culture a été préparée à 10 µM, selon les recommandations du fournisseur. Une solution contrôle a également été préparée contenant, dans les mêmes proportions, du DMSO dans le milieu de culture, dont la dilution finale est inférieure à 1/1000. Ces solutions ont alors été ajoutées aux cellules 24h, 12h, 6h et 3h avant arrêt de l'expérience, par le lavage des cellules au PBS, suivi de l'analyse par western blot.

XV. Etude de l'activité de la RhoGTPase RhoA

Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ont été ensemencées à 150 000 cellules dans une plaque 6 puits. Un traitement au DHA (acide docosahexaénoïque, D2534, Sigma Aldrich) à 10 µM a été appliqué selon une cinétique de 24 à 72h. L'utilisation d'éthanol (EtOH) a été utilisée pour la condition contrôle. L'expression protéique de Na$_V$β4 a été étudiée par western blot après

traitement au DHA. L'activité de la RhoGTPase RhoA a été quantifiée par l'utilisation du kit G-LISA® RhoA Activation Assay (BK124, Cytoskeleton) selon les recommandations du fournisseur. L'absorbance de la condition DHA a été lue à 490 nm et a été normalisée par rapport à celle de la condition EtOH.

XVI. Western blot

La technique de western blot a été utilisée pour observer et quantifier l'expression de diverses protéines d'intérêt dans les lignées cellulaires utilisées pour ce projet, en fonction des différentes conditions expérimentales.

Pour ce faire, les cellules MCF10A sont ensemencées dans des plaques 6 puits à une densité de 600 000 cellules par puits et sont laissées 48h à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO_2. Les cellules MDA-MB-231 et les CRISPR associées sont ensemencées à une densité de 300 000 cellules par puits.

La plaque est laissée à l'incubateur jusqu'à atteindre 80% de confluence cellulaire, soit 48h après ensemencement. Les cellules sont alors lavées avec de PBS Ca/Mg, puis lysées avec un tampon de 5% de SDS (Bio-Rad 1610301) et d'inhibiteurs de protéases (Sigma P8340) ; le volume ajouté est ajusté en fonction du type cellulaire et de la confluence et est compris entre 25 et 50 µL par puits de plaque 6 puits. Les cellules subissent ensuite une lyse mécanique par l'action d'un grattoir dans le puits. Le lysat cellulaire, visqueux suite à la destruction du noyau et de la libération de l'ADN, est passé au travers une seringue 26G pour le rendre plus fluide.

Ce lysat cellulaire est ensuite dosé afin de connaître sa concentration protéique par un dosage à l'acide bicinchoninique (BCA, Thermoscientific 23225), en comparaison d'une gamme étalon à l'albumine, selon les recommandations du fournisseur. L'absorbance des échantillons a ensuite été lue à 540 nm grâce à un lecteur de plaque (BioTek EL800) et logiciel Gen5. 30 µg de lysat protéique sont

utilisés et préparés dans un tampon réducteur de Laemmli (Alfa Aesar J61337, dilué au 1/6ème). Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 95°C juste avant ensemencement dans les puits du gel de western blot.

Les protéines ont été séparées par électrophorèse d'un gel polyacrylamide à 10% et leur transfert a ensuite été effectué sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare 10600001) avec le système de transfert rapide semi-sec (Transfert Turbo, Bio-Rad). La membrane a ensuite été placée dans une solution de blocage composée de lait écrémé à 5% dilué dans du TTBS (Tris-Buffered Salin (TBS) 50 mM Tris-Cl, pH 7.6; 150 mM NaCl, 0,1% Tween) pendant 1h à température ambiante sous agitation. Après incubation, la membrane a été placée dans une solution de TTBS- lait écrémé 5% et contenant les anticorps primaires d'intérêt (Tableau 4) à 4°C pendant une nuit sous agitation. La membrane a ensuite été lavée trois fois pendant 10 minutes sous agitation avec du TTBS puis placée 1h à température ambiante sous agitation en présence d'une solution de TTBS-lait écrémé 5% et contenant les anticorps secondaires d'intérêt (Tableau 4). La membrane a été de nouveau lavée trois fois pendant 10 minutes sous agitation.

Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude des protéines d'intérêt.

Anticorps (anti-)	Description	Dilution	Référence
Naνβ4	Lapin polyclonal	1/5000	Sigma HPA017293
β-caténine	Lapin monoclonal	1/2000	Cell Signaling Technology D10A8
E-cadhérine	Souris monoclonal	1/2000	Cell Signaling Technology 4A2
Vimentine	Lapin monoclonal	1/2000	Cell Signaling Technology D21H3
α-SMA	Lapin monoclonal	1/2000	Cell Signaling Technology D4K9N
N-cadhérine	Lapin monoclonal	1/2000	Cell Signaling Technology D4R1H
HSC70	Souris monoclonal	1/10000	Santa Cruz sc-7298
β-actine-HRP	Souris monoclonal	1/1000	Santa Cruz sc-47778
Anticorps anti-lapin-HRP	Chèvre polyclonal	1/10000	Jackson ImmunoResearch 111-035-003
Anticorps anti-souris-HRP	Chèvre	1/5000	Bio-Rad 1706516

La révélation des protéines a été la dernière étape de cette expérience. Pour cela, la membrane a été incubée avec une solution de révélation ECL

(Thermoscientific 34580 et GE Healthcare RPN2235) pendant 2 minutes. Dans une chambre noire, un film X-Ray (Thermoscientific 34089) a été exposé par la membrane et laissé plusieurs secondes ou minutes selon l'ECL utilisé et la présence importante ou non des protéines sur la membrane. Le film a ensuite été placé dans différents bacs contenant une solution de révélation et de fixation (Kodak® READYMATIC 502 3866 et 515 8639). Les films ont ensuite été scannés pour être par la suite analysés numériquement par le logiciel ImageJ.

XVII. Analyse des images et statistiques

L'analyse des images obtenues des « cystes », de migration et d'invasion, des films de time lapse ainsi que les western blot a été faite avec le logiciel ImageJ.

Tous les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad. Celui-ci a aussi été utilisé pour réaliser les tests statistiques (Mann-Whitney, Wilcoxon et ANOVA). L'expression des résultats a été faite soit par la médiane avec plus ou moins l'écart interquartile (25%-75%), soit par la moyenne avec plus ou moins l'erreur standard de la moyenne lorsque les résultats suivent une distribution normale.

Résultats

I. Lignée épithéliale mammaire non cancéreuse MCF10A

A. Article scientifique soumis dans la revue Cells.

La protéine Na$_V$β4 est surtout connue pour son rôle de sous-unité auxiliaire des canaux sodiques dépendants du voltage (Na$_V$α). De façon intéressante, il a été rapporté que de nombreux tissus cancéreux humains sous-expriment le gène *SCN4B* par rapport aux tissus non cancéreux appariés (Bon *et al.*, 2016). La réduction de l'expression de Na$_V$β4, au moyen de si ou shARN, dans les cellules cancéreuses mammaires favorise la croissance tumorale et sa propagation métastatique (Bon *et al.*, 2016). Par ailleurs, les auteurs ont montré que ces effets anti-invasifs étaient indépendants de la régulation des sous-unités principales des canaux sodiques (Bon *et al.*, 2016).

A ce jour, les fonctions de Na$_V$β4, indépendamment des Na$_V$α, dans les tissus non cancéreux, sont inconnues. Ainsi, nous avons décidé d'étudier les rôles de cette protéine dans une lignée de cellules épithéliales mammaires non cancéreuse.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse font l'objet d'un article soumis dans la revue Cells.

Le gène *SCN4B*, codant pour la sous-unité Na$_V$β4 des canaux sodiques voltage-dépendants, s'est récemment révélé être exprimé dans les cellules épithéliales normales et sous-régulé dans plusieurs cancers. Cependant, sa fonction dans les cellules épithéliales normales n'est pas caractérisée. Dans cette étude, nous démontrons que la réduction de l'expression de Na$_V$β4 dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses MCF10A génère des changements morphologiques importants observés à la fois dans des cultures bidimensionnelles et dans des cystes tridimensionnels. Plus particulièrement, la perte de Na$_V$β4 induit une perte complète de l'organisation épithéliale des cystes et augmente l'activité protéolytique vis-à-vis de la matrice extracellulaire. La perte de la morphologie épithéliale est associée à une dégradation accrue de la β-caténine, à une réduction de l'expression de la E-cadhérine et à l'induction de marqueurs mésenchymateux de la N-cadhérine, de la vimentine, de l'expression de l'α-SMA. Globalement, nos résultats suggèrent que Na$_V$β4 peut participer au maintien du phénotype épithélial dans les cellules mammaires et que sa sous-expression pourrait être une étape déterminante dans la carcinogenèse précoce.

Click here to view linked References

Title page

THE VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL BETA4 SUBUNIT MAINTAINS EPITHELIAL PHENOTYPE IN MAMMARY CELLS

Adélaïde DORAY[1], Roxane LEMOINE[1], Marc SEVERIN[2], Stéphanie CHADET[1], Osbaldo LOPEZ-CHARCAS[1], Audrey HÉRAUD[1], Christophe BARON[1], Pierre BESSON[1], Arnaud MONTEIL[3], Stine Falsig PEDERSEN[2] & Sébastien ROGER[1,4§]

[1] University of Tours, EA4245 Transplantation, Immunology, Inflammation, Tours, France

[2] Section for Cell Biology and Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

[3] IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

[4] Institut Universitaire de France, Paris, France

[§]Correspondence: Dr. Sébastien Roger,
EA4245 Transplantation, Immunology, Inflammation, 10 Bd Tonnellé, 37032 Tours, France
Tel: (+33) 2 47 36 61 30, Email: sebastien.roger@univ-tours.fr

Running head: $Na_V\beta4$ as a gatekeeper of epithelial phenotype

Summary

The *SCN4B* gene, encoding for the $Na_V\beta4$ subunit of voltage-gated sodium channels, was recently found to be expressed in normal epithelial cells and down-regulated in several cancers. However, its function in normal epithelial cells is not characterized. In this study, we demonstrate that reducing $Na_V\beta4$ expression in MCF10A non-cancer mammary epithelial cells generates important morphological changes observed both in two-dimensional cultures and in three-dimensional cysts. Most notably the loss of $Na_V\beta4$ induces a complete loss of epithelial organisation in cysts and increases proteolytic activity towards the extracellular matrix. Loss of epithelial morphology was associated with an increased degradation of β-catenin, reduced E-cadherin expression and induction of mesenchymal markers N-cadherin, vimentin, α-SMA expression. Overall, our results suggest that Navβ4 may participate in the maintenance of the epithelial phenotype in mammary cells and that its down regulation might be a determining step in early carcinogenesis.

Key words: $Na_V\beta4$, epithelial phenotype, β-catenin, Epithelial-to-Mesenchymal Transition, mammary cells

Introduction

Voltage-gated sodium channels β ($Na_V\beta$) proteins, encoded by *SCNxB* genes, define a family of four transmembrane proteins with a short C-terminal intracellular domain and a large N-terminal Immunoglobulin (Ig)-like extracellular domain (Brackenbury and Isom, 2011). These proteins have initially been characterized as auxiliary subunits of sodium channels (Messner and Catterall, 1985). Indeed, they were isolated along with pore-forming voltage-gated sodium channel ($Na_V\alpha$) isoforms, which they interact with through covalent or non-covalent associations (McCormick et al., 1998, Meadows et al., 2001, Chen et al., 2012, Gilchrist et al., 2013). Hence, $Na_V\beta$ proteins regulate $Na_V\alpha$ membrane trafficking as well as their biophysical (Calhoun and Isom, 2014) and pharmacological properties (Lenkowski et al., 2003, Zhang et al., 2013, Wilson et al., 2011). Along with these roles as sodium channel activity modulators, $Na_V\beta$ proteins have also been proven to conduct other specific cellular functions in excitable cells (Isom, 2001), such as an important role as cell adhesion molecules (CAMs), allowing for both *trans*-homophilic and *trans*-heterophilic cell-cell and cell-matrix adhesions in cells expressing $Na_V\alpha$ isoforms (Isom, 2002). Therefore, the expression and roles of $Na_V\beta$ are best known in excitable cells such as in neurons in which they participate in the regulation of Na^+ influx but also control neurite outgrowth, axonal fasciculation and interaction with glial cells (O'Malley and Isom, 2015).

The most recently identified $Na_V\beta4$ subunit, encoded by the *SCN4B* gene, is the least characterized member of the family. It was initially demonstrated to be expressed in the nervous system (dorsal root ganglia, spinal cord and restricted areas or nuclei in the brain), in skeletal and cardiac muscle cells (Yu et al., 2003). It shares sequence similarity with the $Na_V\beta2$ subunit and engages in covalent interactions with $Na_V\alpha$ in the extracellular Ig domain (Yu et al., 2003, Gilchrist et al., 2013). $Na_V\beta4$ was demonstrated to control $Na_V\alpha$ activity and particularly the generation of resurgent (Grieco et al., 2005, Miyazaki et al., 2014, White et al., 2019) or persistent (Aman et al., 2009, Bant and Raman, 2010) sodium currents in neurons. $Na_V\beta4$ was also identified to participate in cell-cell adhesion (Shimizu et al., 2017) and neurite extension (Miyazaki et al., 2007). Evidence is shown that $Na_V\beta4$

dysregulation is involved in epilepsy (Sheilabi et al., 2020), in Rett Syndrome (Oginsky et al., 2017) and mutations in the *SCN4B* gene have been linked to cardiac arrythmia (Li et al., 2013, Yang et al., 2019, Xiong et al., 2019, Medeiros-Domingo et al., 2007) and sudden death syndromes (Tan et al., 2010).

Recently, we identified a critical role for $Na_V\beta4$ in cancer progression (Bon et al., 2016). Specifically, we have shown that $Na_V\beta4$ was strongly expressed in normal epithelial cells and tissues from breast, colon, rectum, lung and prostate but consistently downregulated in cancer samples, to be almost absent in high-grade primary and metastatic tumours (Bon et al., 2016). In mammary cancer cells, reducing $Na_V\beta4$ expression potentiated cell migration and invasiveness through the acquisition of a hybrid mesenchymal-amoeboid aggressive phenotype which resulted in an increase in mammary tumour growth and a higher metastatic colonisation. This effect was independent of $Na_V\alpha$ channel activity (Bon et al., 2016). Later on, similar results were obtained in cervical cancer cells (Sanchez-Sandoval and Gomora, 2019) and the preserved expression of *SCN4B* in papillary thyroid cancer was proposed to be a favourable indicator of recurrence-free survival (Gong et al., 2018). It was therefore suggested that the *SCN4B* gene might be considered as a metastasis-suppressor gene (Bon et al., 2016). Nevertheless, the function of $Na_V\beta4$ in normal epithelial cells is not known. We therefore hypothesized that $Na_V\beta4$ is important for epithelial phenotype. To test this, we explored the consequences of reducing $Na_V\beta4$ expression in non-cancer MCF10A mammary cells. We show that knocking-down $Na_V\beta4$ induced a loss of epithelial phenotype that is reminiscent to early stages of carcinogenesis.

Results

Bioinformatics gene expression analyses, using The Cancer Genome Atlas (TCGA) and the UCSC Xena browser (https://xenabrowser.net), confirmed initial studies (Bon et al., 2016) indicating that the *SCN4B* gene, encoding for $Na_V\beta4$, is significantly down-regulated in all breast cancer stages compared to adjacent non-tumoral breast tissues (Fig. 1a). A lower expression of *SCN4B* was even identified in stage IIA compared to stage I (Fig. 1a). In line with these initial results, $Na_V\beta4$ protein expression was almost 10 times lower in human mammary cancer MDA-MB-231 compared to non-cancer MCF10A cells (Fig. 1b). In order to assess the potential role of $Na_V\beta4$ in non-cancer mammary cells we developed, using the CRISPR/Cas9 technique, a cell line derived from the parental MCF10A with a permanent knockdown of $Na_V\beta4$, named MCF10A Cr$\beta4$, as well as a control cell line MCF10A CTL. The efficiency of $Na_V\beta4$ knock-down was verified by western blotting indicating a median reduction of protein expression of 85% (Fig. 1c). Reduction of $Na_V\beta4$ had important effects on MCF10A cell morphology, as observed in conventional 2-dimensional cultures (Fig. 1d). Particularly, MCF10A Cr$\beta4$ showed an elongated morphology characterised by an increased cell length as compared with MCF10A CTL (Fig. 1e, 89.9 ± 5.1 *vs*. 33.1 ± 1.7 µm, respectively). Furthermore, while MCF10A CTL cells showed a tendency for being closely associated in clusters, as epithelial cells do, MCF10A Cr$\beta4$ were more scattered and established less intercellular interactions (Fig. 1f). These morphological changes were also identified by epifluorescence imaging in fixed cells labelled to visualize cell nuclei and F-actin network (Fig. 1g). Image analysis demonstrated that MCF10A Cr$\beta4$ showed a greater cell surface than MCF10A CTL cells (Fig. 1h, 2,318 ± 123 *vs*. 1,062 ± 52 μm^2, respectively). Interestingly, MCF10A Cr$\beta4$ also appeared to have a stronger intensity of F-actin labelling (Fig. 1i), characterised by the presence of actin stress fibres (Fig. 1g).

These initial data suggested that the loss of $Na_V\beta4$ expression affected epithelial cell phenotype and intercellular organization. We next investigated how the loss of $Na_V\beta4$ affected cell polarisation in 3 dimensions, using a cyst forming assay in a 3D extracellular matrix (Jensen et al., 2018). We found

that, in 3D cultures, MCF10A CTL cells formed regular cysts with a general spheroid morphology (Fig. 2a), characterized by a circularity index (calculated from pictures) approaching 0.9, maintained during the 3 weeks of the experiment (Fig. 2b). MCF10A CTL cysts demonstrated a regular growth that was slightly slowed after 14 days culture (Fig. 2c). After this time, the number of remaining individualized cysts tended to decrease, mostly due to the dispersion of some cells into the extracellular matrix (Fig. 2d). MCF10A Crβ4 cysts also exhibited a generally spheroid shape, albeit demonstrating a lower circularity index (Fig. 2a, b), but their growth was slower compared to MCF10A CTL cysts (Fig. 2c). This could be partly due to a reduced cell proliferation rate. Indeed, loss of $Na_V\beta4$ expression slightly reduced MCF10A cell viability after 5 days of culture (Suppl. Fig. 1a) which appeared to be due to a slower DNA synthesis (Suppl. Fig. 1b, c). However, it also appeared that cells evaded from MCF10A Crβ4 cysts to invade the 3D extracellular matrix (Fig 2a, arrows), thus resulting in the complete disorganisation of cysts and in the reduction of the number of individualized cysts with time (Fig. 2a, d). We thus characterized cysts ultrastructure. Cysts were fixed and stained in order to visualise cell nuclei, vimentin expression and F-actin network by fluorescence imaging. MCF10A CTL cysts demonstrated a typical and regular epithelial organisation with compacted cell nuclei uniformly distributed within the structure, the expression of vimentin at the external periphery of the cyst (equivalent to the basal side of the epithelial layer), contiguous cells displaying a cortical submembrane F-actin network, and the appearance of a central lumen (Fig. 2e). By contrast, MCF10A Crβ4 cysts were completely disorganized, lacked a central lumen and did not show any apico-basal polarisation (Fig. 2e). Cell nuclei appeared to be less compacted, vimentin expression was more intense and diffuse, and cortical F-actin network was disrupted to be more diffuse inside the cytosol. Furthermore, multiple cells detached from the cyst to invade the extracellular matrix. Because this property might require proteolytic activities, we explored the capacity of MCF10A cysts to degrade the fluorogenic substrate DQ-Gelatin when incorporated into the extracellular matrix, after 7 days growing (Fig. 2f). MCF10A CTL cysts demonstrated almost undetectable proteolytic activity. By contrast MCF10A Crβ4 cysts showed a strong proteolytic

activity towards the extracellular matrix (green fluorescence) and a strong invasion by cells originating from the cyst (Fig 2f, g). Because cell-cell junctions appeared to be disrupted in MCF10A Crβ4 cysts, we then analysed the expression of adherens junction proteins β-catenin and E-cadherin. While MCF10A CTL cysts were characterized by a strong colocalization of β-catenin and E-cadherin at the plasma membrane of cells, MCF10A Crβ4 cysts demonstrated a weaker and diffuse expression of both proteins with no colocalization (Fig. 3a). These observations prompted us to investigate the expression of β-catenin depending on that of $Na_V\beta4$. Consistent with the more mesenchymal phenotype, the mRNA level of gene encoding for β-catenin, *CTNNB1*, was significantly higher in MCF10A Crβ4 compared to MCF10A CTL cells (40% median increase, Fig. 3b). In contrast, β-catenin protein level was down-regulated in MCF10A Crβ4 compared to MCF10A CTL cells (52% median decrease, Fig. 3c). A possible explanation for this apparent discrepancy could be an increased recycling of β-catenin in MCF10A Crβ4 cells. Therefore, we incubated MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells with the proteasome inhibitor MG132 for different time durations and assessed levels of β-catenin (Fig. 3d). These led to an increased immunodetection of β-catenin in both cell lines. Nevertheless, the increase in β-catenin protein expression was significantly higher in MCF10A Crβ4 than in MCF10A CTL cells (Fig. 3e). Similarly, MCF10A cells transfected with specific silencing RNA targeting $Na_V\beta4$ (siβ4, Fig. 3f) also displayed a reduced expression of β-catenin compared to scramble siRNA (siCTL, Fig. 3g) and this expression was restored upon treatment with MG132 (Fig. 3h). These results suggested that the loss of the plasma membrane $Na_V\beta4$ leads to the disruption of intercellular junctions and to a reduced half-life of β-catenin. Together with the loss of the epithelial morphology in individual cells, the disorganisation and the increased extracellular invasiveness of cysts, the disruption of adherens junctions argued in favour of a transition towards a mesenchymal-like phenotype. Therefore, we next examined the expression of genes associated with either epithelial phenotype (*CDH1*, encoding for E-cadherin) or with mesenchymal phenotype (*CDH2*, encoding for N-cadherin; *SNAI1, SNAI2, TWIST, ZEB1* encoding for transcription factors promoting epithelial-to-mesenchymal transition, *VIM*, encoding for vimentin, and *ACTA2*, encoding for α-SMA). The loss of

$Na_V\beta4$ expression was associated with a significant reduction in the epithelial marker *CDH1* expression, and an increase in the expression of mesenchymal markers *CDH2*, *SNAI2, TWIST, ZEB1*, *VIM* and *ACTA2* (Fig. 4a). Only *SNAI1* expression was not modified. These changes observed at the transcriptional level were confirmed at the protein level for E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin and α-SMA (Fig. 4b). Finally, we explored the possibility to rescue the epithelial phenotype in MCF10A Cr$\beta4$ by overexpressing $Na_V\beta4$ (Fig. 4c). This partially restored *CDH2*, *VIM* and *ACTA2* expression (Fig. 4d).

Discussion

Pore-forming $Na_V\alpha$ and auxiliary $Na_V\beta$ proteins of voltage-gated sodium channels were initially characterized in excitable cells in which they are responsible for the triggering and the propagation of action potentials. However, over the past years it has been shown that both $Na_V\alpha$ and $Na_V\beta$ subunits are dysregulated in cancers, in which they have non-excitable roles. Most of the time, their overexpression in carcinoma cells has been associated with cancer progression, and their activity was shown to promote pro-cancerous properties (Lopez-Charcas et al., 2021). Pore-forming $Na_V1.5$, $Na_V1.6$ and $Na_V1.7$ appear to be specifically up-regulated in cancer cells and their activity, through an inward sodium current, has been shown to promote invasive properties (Roger et al., 2015). It has also been found that some $Na_V\beta$ subunits are up-regulated in cancer and that they bear important roles in cancer cell biology and in cancer progression (Lopez-Charcas et al., 2021). In contrast, the $Na_V\beta4$ subunit has recently been identified as being expressed at high levels in normal epithelial tissues, but consistently down-regulated in cancer samples. This was identified in breast, lung, prostate and colorectal cancer (Bon et al., 2016), in cervical cancer (Sanchez-Sandoval and Gomora, 2019) and in papillary thyroid cancer (Gong et al., 2018). In these studies, the preserved expression of the *SCN4B* gene was considered as a favourable biomarker of metastasis-free survival suggesting that it could be a metastasis-suppressor gene.

The expression of the *SCN4B* gene was shown to be lower in highly invasive cancer as compared to weakly invasive or to non-cancer cells (Bon et al., 2016, Sanchez-Sandoval and Gomora, 2019, Roger et al., 2007). Both *in vitro* and *in vivo* experiments, performed with different human cancer cell lines, demonstrated that reducing $Na_V\beta4$ expression potentiated cell migration, invasiveness and tumour progression, while overexpressing it had opposite effects (Bon et al., 2016, Sanchez-Sandoval and Gomora, 2019, Diss et al., 2008). In breast cancer cells, the loss of $Na_V\beta4$ promoted RhoA activity and the acquisition of a hybrid mesenchymal-amoeboid phenotype associated with highly invasive capacities (Bon et al., 2016). However, the role of $Na_V\beta4$ in normal epithelial cells is not known, and whether its loss might participate to events of early carcinogenesis has never been characterized.

In this study, we confirmed that *SCN4B* / $Na_V\beta4$ is down-regulated in cancer compared to non-cancer cells and tissues. Furthermore, we demonstrated that its repression in non-cancer mammary epithelial cells induced dramatic morphological and functional changes associated with a loss of epithelial polarisation, a disruption of epithelial junctions, the overexpression of genes associated with a mesenchymal phenotype and the acquisition of pro-invasive capacities. Consequently, loss of $Na_V\beta4$ completely abrogated the establishment of 3D epithelial structures (cysts). The loss of $Na_V\beta4$ favoured the degradation of β-catenin, thus reducing its half-life and leading to the disruption of adherens junctions. It can be speculated that the $Na_V\beta4$ subunit, expressed at the plasma membrane of epithelial cells, stabilizes β-catenin in proximity with E-cadherin. Loss of $Na_V\beta4$ might lead to cytosolic release of β-catenin which could, for one part translocate to the nucleus and induce the expression of EMT-related genes, and for a second part undergo proteasomal degradation. These cellular events might be critical during carcinogenesis.

However, what could trigger the repression of *SCN4B* during cancer transformation is still unknown. Interestingly, recent studies pointed out the involvement of several miRNAs that are dysregulated in some cancers, as important regulators of *SCN4B* expression. In colorectal cancer, the increased expression of miR-424-5p in tumour samples was associated with poor prognosis (Dai et al., 2020). In this study, the authors demonstrated that *SCN4B* was directly inhibited by miR-424-5p thus promoting colon cancer cell proliferation, migration and invasion (Dai et al., 2020). Another miRNA, miR-3175, has recently been shown to be overexpressed in prostate cancer and to participate in cancer cell growth and invasion. Knocking down miR-3175 in prostate cancer cells increased *SCN4B* and E-cadherin expression, inhibited N-cadherin expression, and importantly reduced cell proliferation, migration and invasion (Huang et al., 2021). Together, these recent studies brought new elements on the involvement of miRNA in the promotion of cancer progression through the regulation of *SCN4B* expression in tumours. As such, exploring the expression of these miRNAs during carcinogenesis might be of importance.

In conclusion, this study demonstrates the critical role played by $Na_V\beta4$ in the maintenance of an epithelial phenotype in normal cells, and how its repression might contribute to cellular dysplasia and early carcinogenesis. In this context, maintaining its expression level in epithelial cells would be determinant in order to prevent, or delay, tumour transformation.

Acknowledgements

This work was supported by the "Ministère de la Recherche et des Technologies", the "Ligue Nationale Contre le Cancer – Interrégion Grand-Ouest – comités 29, 36, 86, 37" to S.R., the Région Centre-Val de Loire (grant "NavMetarget"). S.R. was recipient of a prize "Prix Ruban Rose Avenir 2017" from the charity "le Cancer du sein: parlons-en!". A.D. obtained a PhD fellowship from the University of Tours, and a mobility grant from the Doctoral School ED549. O.L.-C. was recipient of a post-doctoral funding from the "Fondation pour la Recherche Médicale (FRM)" (SPF201909009198). R.L. was funded by a grant from the Région Centre-Val de Loire (grant "CanalEx") to S.R. We thank Mrs Carole Desplanches for secretary and administrative assistance. Our confocal microscopy data were obtained with the assistance of the IBiSA Electron Microscopy Facility of the University of Tours, and we are grateful to M. Julien Burlaud-Gaillard for his help.

Author contributions

All authors contributed extensively to the work presented in this study. A.D. performed cell culture, molecular and cellular biology experiments, immunofluorescence/confocal imaging. R.L. performed cell culture and flow cytometry experiments. M.S. performed cell culture, molecular and cellular biology experiments, and confocal imaging. S.C. and O.L-C. participated in cell culture, imaging, and bioinformatics analyses. A.H. participated to cell culture and EdU assays. C.B. and P.B. participated to scientific discussions and critical reading of the manuscript. A.M. designed overexpression plasmids. S.F.P. directed the work on cysts and associated imaging. S.R. obtained funding, directed the research, designed the study, analysed the data, and wrote the manuscript.

Declaration of Interest

The authors declare no competing interests.

Figure legends

Figure 1: Na$_V$β4 downregulation induces morphological changes in non-cancer mammary cells

a, The expression level of the *SCN4B* gene, encoding for Na$_V$β4, was analysed from datasets coming from the "The Cancer Genome Atlas" (http://cancergenome.nih.gov) from the US National Cancer Institute in non-tumoral adjacent tissue (n=178), and in the different stages of primary breast tumours : I (n=125), IIA (n=243), IIB (n=115), IIIA (n=85), IIIB (n=10), IIIC (n=31), IV (n=4). For each array, data were log2-transformed and centred to the median. *** statistically different at $p<0.001$ (Mann-Whitney rank sum test) when comparing to adjacent non-tumoral tissue, and * at $p<0.05$ when comparing Stage I to stage IIA. **b**, Na$_V$β4 protein expression level was assessed by western blotting in non-cancer MCF10A human mammary epithelial cells and in human breast cancer MDA-MB-231 cells. The upper section shows a WB representative of 5 independent experiments. HSC70 immunodetection was used as a loading control. The lower section shows a quantification of Na$_V$β4 protein expression in the two cell lines expressed relatively to that of MCF10A. * Statistically different at $p<0.05$ (Mann-Whitney rank sum test). **c**, Na$_V$β4 protein expression level was assessed by western blotting in control MCF10A cells and in cells stably knocked-down for the expression of *SCN4B* gene (MCF10A Crβ4). The upper section shows a WB representative of 8 independent experiments. HSC70 immunodetection was used as a loading control. The lower section shows a quantification of Na$_V$β4 protein expression in the two cell lines expressed relatively to that of MCF10A CTL (n=8). * Statistically different at $p<0.05$ (Mann-Whitney rank sum test). **d**, Representative images of MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells in phase contrast microscopy. Scale bar, 50 μm. **e**) Maximal cell length (n=31 MCF10A CTL and n=20 MCF10A Crβ4) and, **f**, Number of intercellular contacts per cell (n=60 MCF10A CTL and n=57 MCF10A Crβ4), assessed from images taken as in (d). *** Statistically different at $p<0.001$ (Students t-test). **g**, MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells were stained for the identification of nuclei (DAPI, blue staining) and F-actin (phalloidin-594, red staining). Scale bar, 50 μm. **h**, Mean cell area (n=40 MCF10A CTL and n=

40 MCF10A Crβ4), and **i)** F-actin fluorescence intensity per cell surface (n=100 MCF10A CTL and n= 100 MCF10A Crβ4) were calculated From images taken as in (g). *** Statistically different at $p<0.001$ (Students t-test).

Figure 2: Navβ4 sustains epithelial polarity in 3-dimensional MCF10A cysts.

a, MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells were grown as cysts for 21 days in a 3D matrix. Representative images at days 2, 7, 14 and 21 are shown. Black arrows show cells evading from cysts and invading the extracellular matrix. Scale bar, 150 μm. **b**, A cyst circularity index was calculated from same cysts that in (a). Statistically different from MCF10A CTL at *, $p<0.05$ (ANOVA test). **c**, The perimeter of individual cysts was measured as a function of time from same cysts than in (a). Statistically different from MCF10A CTL at *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ (ANOVA test). **d**, The number of individualized cysts was assessed as a function of time and expressed relatively to the initial number at day 1 (n= 50 and 83 MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cysts, respectively, from 6 independent experiments). Statistically different from MCF10A CTL at *, $p<0.05$ and **, $p<0.01$ (ANOVA test). **e**, MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cysts were then fixed and stained with Hoechst 33342 to visualize cell nuclei (blue staining), as well as with phalloidin-594 to visualize F-actin network (red staining). Cysts were also immunostained with a primary rabbit anti-vimentin antibody and a secondary AF488-coupled anti-rabbit antibody (green staining). The white asterisk indicates the presence of a lumen inside MCF10A CTL cysts. Representative images from 6 independent experiments. Scale bar, 25 μm. **f**, Proteolytic activity of cysts was assessed by including DQ-gelatin, which emits green fluorescence when degraded, in the 3D matrix. Representative images from 8 independent experiments. Scale bar, 150 μm. **g**, An index of DQ-gelatin degradation was calculated from images as in (f) from 16 individualized MCF10A CTL and 21 MCF10A Crβ4 cysts at day 7. Statistically different from MCF10A CTL cysts at **, $p<0.01$ (Student t-test).

Figure 3: Navβ4 prevents β-catenin degradation

a, MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cysts were stained with Hoechst 33342 to visualize cell nuclei and immunostained to identify β-catenin and E-cadherin. Representative images from 6 independent experiments. Scale bar, 25 µm. **b**, Expression of the *CTNNB1* gene, encoding for β-catenin, was analysed in MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells (n=8 independent experiments). Statistically different from MCF10A CTL cysts at ***, $p<0.001$ (Mann-Whitney rank sum test). **c**, Left, β-catenin protein expression level was assessed by western blotting in MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells. Representative WB from 6 independent experiments. Right, quantification of β-catenin protein expression in MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells (n=6). * Statistically different at $p<0.05$ (Mann-Whitney rank sum test). **d**, β-catenin protein expression was assessed in untreated (Unt) MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells, or after the treatment with 10 µM MG132 for 3h, 6h, 12h or 24h, or the solvent DMSO. β-actin immunodetection was used as a loading control. **e**, Quantification of β-catenin protein expression in same conditions as in (d), from 5 independent experiments. Statistical difference at $p<0.001$ (Two-way ANOVA). **f**, $Na_V\beta4$ protein expression was assessed by western blotting in MCF10A transfected with control "irrelevant" siRNA (siCTL) or with *SCN4B*-specific siRNA (siβ4) at 5 and 30 nM. **g**, β-catenin protein expression was assessed in untreated MCF10A cells or in cells transfected with siCTL or siβ4 (30 nM). β-actin immunodetection was used as a loading control. Representative from 5 independent experiments. **h**, β-catenin protein expression was assessed in MCF10A cells transfected with siCTL or siβ4 (30 nM) after the treatment with 10 µM MG132 for 3h, 6h, 12h or 24h, or the solvent DMSO. β-actin immunodetection was used as a loading control.

Figure 4: $Na_V\beta4$ expression prevents mesenchymal transition in MCF10A epithelial mammary cells. a, Expression of genes associated with either epithelial (*CDH1*) or mesenchymal (*CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST*, *ZEB1*, *VIM*, *ACTA2*) phenotype by RT-qPCR in MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells (n=5-9 independent experiments). Results are expressed relatively to that of MCF10A CTL cells. "ns" stands for no statistical difference. Statistically different at * $p<0.05$, ** $p<0.01$ (Mann-

Whitney rank sum test). **b**, Representative western blots showing the protein expression of E-cadherin, N-Cadherin, Vimentin, α-SMA in MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells. Immunodetection of HSC70 was used as a loading control (n=4 independent experiments). **c**, $Na_V\beta4$ protein expression was assessed by western blotting in MCF10A Crβ4 cells transfected with empty pcDNA3.1 or *SCN4B* gene in pcDNA3.1 vector. Representative from 8 independent experiments. **d**, Expression of genes associated with either epithelial (*CTNNB1*, *CDH1*) or mesenchymal (*CDH2*, *SNAI1*, *SNAI2*, *TWIST*, *ZEB1*, *VIM*, *ACTA2*) phenotype by RT-qPCR in MCF10A Crβ4 cells transfected with empty pcDNA3.1 or *SCN4B* gene in pcDNA3.1 vector (n=8 independent experiments). Results are expressed relatively to that of cells transfected with the empty vector. Statistically different at * $p<0.05$ (Mann-Whitney rank sum test), otherwise no statistical difference.

STAR Methods

Bioinformatic analyses - Gene expression data were obtained from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and Genotype-Tissue Expression (GTEx) databases using the UCSC Xena Browser (https://xenabrowser.net)[49]. The IlluminaHiSeq (log2-normalized_count+1) files were downloaded from the "TCGA Breast Cancer (TCGA-BRCA)" cohort, in order to compare expressions between adjacent non-tumoral tissues and primary tumour. From the "TCGA TARGET GTEx" cohort, the RSEM norm_count (log2-normalized_count+1) files were downloaded, in order to compare expressions between adjacent non-tumoral tissues, primary tumour and metastases.

Inhibitors and chemicals - The proteasome inhibitor MG132 as well as all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (France). Fluorescent probes DQ™-Gelatin and Hoechst 33342 were purchased from Invitrogen (France), and Phalloidin-AF594 from Cell Signaling Technology (France). ProLong® Gold Antifade Mountant containing DAPI was purchased from Invitrogen, (France).

Cells and cell culture – The human breast cancer cell line MDA-MB-231 and non-cancer mammary epithelial MCF10A cells were acquired from the American Type Culture Collection (ATCC), through LGC Standards (France), and were grown at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. MDA-MB-231 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 5% foetal calf serum (FCS). The immortalized non-cancer mammary epithelial MCF10A cells were cultured in DMEM/Ham's F-12, 1:1 mix containing 5% horse serum (Dutscher, France), 10 µg/mL insulin, 20 ng/mL epidermal growth factor, 0.5 µg/mL hydrocortisone, and 100 ng/mL cholera toxin. A stable MCF10A cell line knocked-down for the expression of the *SCN4B* gene, encoding for $Na_V\beta4$, was generated using the CRISPR/Cas9 technique, as previously described (Brisson et al., 2020) by transfection with the *SCN4B* Double Nickase Plasmid (sc-411001, Santa Cruz, France). Transfection was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, France). Selection of a stable cell line called "MCF10A Cr$\beta4$" was performed using 10 µg/ml puromycin, and was compared to a control cell line, thereafter called "MCF10A CTL". Efficiency of the CRISPR-

mediated knock-down was assessed by western blotting and stability of cells was followed for a minimal duration of 6 weeks. Mycoplasma contamination tests were performed routinely (Lonza, MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit).

Small interfering RNA transfection – MCF10A mammary epithelial cells were transfected with siRNA directed against human *SCN4B* mRNA (siβ4) or scramble siRNA as a control (siCTL), both of which were purchased from ON-TARGETplus siRNA (Horizon Discovery, Cambridge, UK). Cells were transfected using Pepmute™ siRNA Transfection Reagent (SinaGen laboratories, USA). Experiments were performed 24h-48h after transfection and efficacy of silencing was assessed by western blotting.

Overexpression of SCN4B gene – MCF10A Crβ4 cells were transfected with 2 µg of a pcDNA3.1(+) plasmid containing the *SCN4B* gene (pc*SCN4B*, Synbio Technologies, USA) or with a pcDNA3.1(+) empty vector as a control. Transfection was realized using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, France).

RNA extraction, reverse transcription (RT) and quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) **–**Total RNA was extracted using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, France), quantified by measuring absorbance at 260 nm using Nanodrop 2000™ (Thermofisher, France) and reverse-transcribed with the PrimeScript™ RT Reagent Kit (Takara Bio Group, France). Quantitative PCR were performed using SYBR qPCR Premix Ex Taq (Takara Bio Group, France) and LightCycler 384 wells (Roche, France). Control gene was *HPRT1*. All primers sequences and corresponding efficiencies are described in Supplementary Table I.

Cell viability **–** cell viability was evaluated by the tetrazolium salt assay (MTT) as already described (Jelassi et al., 2011). Briefly, cells were seeded in different densities indicated in the figure and grown for 4 days at 37°C and 5% CO_2 in their normal culture medium. Cell viability was measured after incubation with 0.5 mg/mL MTT for 60 minutes at 37°C by measuring the absorbance at 540 nm.

Cell proliferation – Cells were seeded at a density of $2x10^5$ in wells of a 6-well plate. 72h after seeding, medium was removed and cells were incubated in a fresh culture medium containing 10 µM 5-Ethynyl-2'deoxyuridine (EdU). Cells were then washed in phosphate-buffered saline (PBS), trypsinized and the incorporation of EdU was monitored by flow cytometry (BD FACS Canto, Becton Dickinson, France) using the Click-iT™ Plus EdU Alexa Fluor488 kit (Invitrogen, France).

Cysts production and analyses - A 40 µL layer of Geltrex® (Sigma-Aldrich, France) was added into the wells of Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ (Thermo Scientific) mimicking the extracellular matrix. The chamber slide was incubated at 37°C for 20 min. MCF10A CTL or MCF10A Crβ4 cell suspensions were prepared in medium containing 25 µL/mL Geltrex® and seeded at 10,000 cells per 400 µL in the chamber slide wells. The culture medium of cells was replaced every 2 days by 400 µL containing 25 µL/mL Geltrex®. Pictures of cysts were taken in bright field before changing medium (Invitrogen EVOS M7000, Thermofisher, France) in order to monitor growth and circularity of cysts. After 3 weeks of culture, cysts were washed twice in PBS, then fixed in 4% paraformaldehyde (PFA, Invitrogen) for 30 min at room temperature. Cysts were washed three times for 10 min in 100 mM glycine solution. Cysts were permeabilised for 5 min in a 0.5% Triton X-100 solution, then washed three times for 10 min with PBS. Unspecific site blocking was be realized by incubating for 1h in 5% BSA solution. Primary antibodies in 150 µL of 5% BSA solution were added to the wells and incubated at 4°C overnight. Wells were washed twice for 10 min in PBS, then 150 µL of fluorescent secondary antibodies were added for 1h at room temperature. Hoechst 33342 (1/1,000, Invitrogen) was used to visualize cell nuclei and Phalloidin-AF594 to visualize the F-actin network. Wells were finally washed four times with PBS, and micrographs were obtained using confocal microscopy using a 20 x objective (LEICA SP8 STED). Primary antibodies used were dedicated to identify β-catenin (Cell Signalling Technology D10A8, 1/200), E-cadherin (Invitrogen 13-1700, 1/1,000), Vimentin (Abcam ab92547, 1/100). Growth and circularity of cysts were analysed using the ImageJ software.

Western Blotting – Cells were washed with PBS and lysed in presence of a lysis buffer (50 mM Tris, pH7, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% glycerol, 1 mM EDTA), containing 5% sodium dodecyl sulphate (SDS) and protease inhibitors (S8830, Sigma-Aldrich, France). Western blotting experiments were performed according to standard protocols. Total protein concentrations were determined using the Pierce® BCA Protein Assay Kit Thermoscientific (Fisher Scientific, France). Protein sample buffer was added and the samples were heated at 95°C for 5 min. Total protein samples were electrophoretically separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gels, and then transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Millipore, USA). $Na_V\beta4$ proteins were detected using anti-$Na_V\beta4$ rabbit polyclonal primary antibodies (1/5,000, HPA017293, Sigma-Aldrich). Other primary antibodies used were: rabbit monoclonal anti-β-catenin (Cell Signalling Technology D10A8, 1/2,000), mouse monoclonal anti-E-cadherin (Cell Signalling Technology, 4A2, 1/2,000), rabbit monoclonal anti-Vimentin (Cell Signalling Technology, D21H3, 1/2,000), rabbit monoclonal anti-αSMA (Cell Signalling Technology, D4K9N, 1/2,000), rabbit monoclonal anti-N-Cadherin (Cell Signalling Technology, D4R1H, 1/2,000). Secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse or goat anti-rabbit IgG secondary antibodies were obtained from BioRad (1/5,000) and from Jackson ImmunoResearch (1/10,000), respectively. HSC70 protein was used as a sample loading control using anti-HSC70 mouse primary antibody at 1/10,000 (Santa-Cruz). Also in some conditions, a β-actin-HRP mouse monoclonal antibody (1/1,000, SantaCruz) was used as a control for sample loading. Proteins were detected using electrochemiluminescence-plus kit (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Fisher Scientific, France) and captured on CL-XPosure Films (Thermoscientific, France). Densitometric analyses were performed using ImageJ software, and quantifications of proteins of interest are expressed relatively to that of the control protein used (either HSC70 or β-actin) and to the control condition. Full uncropped blots are shown in Supplementary Figure 2.

Epifluorescence experiments – MCF10A CTL and Crβ4 cells were grown for 48h in Lab-Tek™ chambers. In some cases, chambers were coated with a layer of Geltrex™ containing 25 µg/mL

of DQ-Gelatin 488. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min and then incubated with 5% BSA for 30 min. F-actin was visualized after staining the cells with phalloidin-AF594 (1/200, Cell Signaling Technology, France) for 1 h. Slides were mounted using ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI to visualize cell nuclei (Invitrogen, France). Epifluorescence microscopy was performed with an EVOS M7000 microscope (Thermofisher, France). Images were analysed using the ImageJ software.

Data presentation and statistical analysis - Data are displayed as mean ± sem when following a normal distribution, or as individual points centred by a diagram showing the median when not following a normal distribution. One-way ANOVA followed by a Dunn's Multiple Comparison Tests, two-way ANOVA, Mann-Whitney rank sum tests, paired Student t-tests were used to compare different conditions as indicated in the figure legends. Statistical significance is indicated as: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ and ***, $p < 0.001$, while "ns" stands for not statistically different.

Data availability –The authors declare that all other data supporting the findings of this study are available within the paper and its supplementary information files or available from the authors upon request.

References

AMAN, T. K., GRIECO-CALUB, T. M., CHEN, C., RUSCONI, R., SLAT, E. A., ISOM, L. L. & RAMAN, I. M. 2009. Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *J Neurosci,* 29**,** 2027-42.

BANT, J. S. & RAMAN, I. M. 2010. Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel beta4 in cultured cerebellar granule neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 107**,** 12357-62.

BON, E., DRIFFORT, V., GRADEK, F., MARTINEZ-CACERES, C., ANCHELIN, M., PELEGRIN, P., CAYUELA, M. L., MARIONNEAU-LAMBOT, S., OULLIER, T., GUIBON, R., FROMONT, G., GUTIERREZ-PAJARES, J. L., DOMINGO, I., PIVER, E., MOREAU, A., BURLAUD-GAILLARD, J., FRANK, P. G., CHEVALIER, S., BESSON, P. & ROGER, S. 2016. SCN4B acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer. *Nat Commun,* 7**,** 13648.

BRACKENBURY, W. J. & ISOM, L. L. 2011. Na Channel beta Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family. *Front Pharmacol,* 2**,** 53.

BRISSON, L., CHADET, S., LOPEZ-CHARCAS, O., JELASSI, B., TERNANT, D., CHAMOUTON, J., LERONDEL, S., LE PAPE, A., COUILLIN, I., GOMBAULT, A., TROVERO, F., CHEVALIER, S., BESSON, P., JIANG, L. H. & ROGER, S. 2020. P2X7 Receptor Promotes Mouse Mammary Cancer Cell Invasiveness and Tumour Progression, and Is a Target for Anticancer Treatment. *Cancers (Basel),* 12.

CALHOUN, J. D. & ISOM, L. L. 2014. The role of non-pore-forming beta subunits in physiology and pathophysiology of voltage-gated sodium channels. *Handb Exp Pharmacol,* 221**,** 51-89.

CHEN, C., CALHOUN, J. D., ZHANG, Y., LOPEZ-SANTIAGO, L., ZHOU, N., DAVIS, T. H., SALZER, J. L. & ISOM, L. L. 2012. Identification of the cysteine residue responsible for disulfide linkage of Na+ channel alpha and beta2 subunits. *J Biol Chem,* 287**,** 39061-9.

DAI, W., ZHOU, J., WANG, H., ZHANG, M., YANG, X. & SONG, W. 2020. miR-424-5p promotes the proliferation and metastasis of colorectal cancer by directly targeting SCN4B. *Pathol Res Pract,* 216**,** 152731.

DISS, J. K., FRASER, S. P., WALKER, M. M., PATEL, A., LATCHMAN, D. S. & DJAMGOZ, M. B. 2008. Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer: quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer Prostatic Dis,* 11**,** 325-33.

GILCHRIST, J., DAS, S., VAN PETEGEM, F. & BOSMANS, F. 2013. Crystallographic insights into sodium-channel modulation by the beta4 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 110**,** E5016-24.

GONG, Y., YANG, J., WU, W., LIU, F., SU, A., LI, Z., ZHU, J. & WEI, T. 2018. Preserved SCN4B expression is an independent indicator of favorable recurrence-free survival in classical papillary thyroid cancer. *PLoS One,* 13**,** e0197007.

GRIECO, T. M., MALHOTRA, J. D., CHEN, C., ISOM, L. L. & RAMAN, I. M. 2005. Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel beta4 as a mechanism for resurgent sodium current. *Neuron,* 45**,** 233-44.

HUANG, H., QING, X. Y., ZHOU, Q., LI, H. D. & HU, Z. Y. 2021. Silencing of microRNA-3175 represses cell proliferation and invasion in prostate cancer by targeting the potential tumor-suppressor SCN4B. *Kaohsiung J Med Sci,* 37**,** 20-26.

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

ISOM, L. L. 2002. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci,* 7**,** 12-23.

JELASSI, B., CHANTOME, A., ALCARAZ-PEREZ, F., BAROJA-MAZO, A., CAYUELA, M. L., PELEGRIN, P., SURPRENANT, A. & ROGER, S. 2011. P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene,* 30**,** 2108-22.

JENSEN, H. H., PEDERSEN, G. A., MORGEN, J. J., PARSONS, M., PEDERSEN, S. F. & NEJSUM, L. N. 2018. The Na(+) /H(+) exchanger NHE1 localizes as clusters to cryptic lamellipodia and accelerates collective epithelial cell migration. *J Physiol*.

LENKOWSKI, P. W., SHAH, B. S., DINN, A. E., LEE, K. & PATEL, M. K. 2003. Lidocaine block of neonatal Nav1.3 is differentially modulated by co-expression of beta1 and beta3 subunits. *Eur J Pharmacol,* 467**,** 23-30.

LI, R. G., WANG, Q., XU, Y. J., ZHANG, M., QU, X. K., LIU, X., FANG, W. Y. & YANG, Y. Q. 2013. Mutations of the SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in familial atrial fibrillation. *Int J Mol Med,* 32**,** 144-50.

LOPEZ-CHARCAS, O., PUKKANASUT, P., VELU, S. E., BRACKENBURY, W. J., HALES, T. G., BESSON, P., GOMORA, J. C. & ROGER, S. 2021. Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *iScience,* 24**,** 102270.

MCCORMICK, K. A., ISOM, L. L., RAGSDALE, D., SMITH, D., SCHEUER, T. & CATTERALL, W. A. 1998. Molecular determinants of Na+ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *J Biol Chem,* 273**,** 3954-62.

MEADOWS, L., MALHOTRA, J. D., STETZER, A., ISOM, L. L. & RAGSDALE, D. S. 2001. The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *J Neurochem,* 76**,** 1871-8.

MEDEIROS-DOMINGO, A., KAKU, T., TESTER, D. J., ITURRALDE-TORRES, P., ITTY, A., YE, B., VALDIVIA, C., UEDA, K., CANIZALES-QUINTEROS, S., TUSIE-LUNA, M. T., MAKIELSKI, J. C. & ACKERMAN, M. J. 2007. SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation,* 116**,** 134-42.

MESSNER, D. J. & CATTERALL, W. A. 1985. The sodium channel from rat brain. Separation and characterization of subunits. *J Biol Chem,* 260**,** 10597-604.

MIYAZAKI, H., OYAMA, F., INOUE, R., AOSAKI, T., ABE, T., KIYONARI, H., KINO, Y., KUROSAWA, M., SHIMIZU, J., OGIWARA, I., YAMAKAWA, K., KOSHIMIZU, Y., FUJIYAMA, F., KANEKO, T., SHIMIZU, H., NAGATOMO, K., YAMADA, K., SHIMOGORI, T., HATTORI, N., MIURA, M. & NUKINA, N. 2014. Singular localization of sodium channel beta4 subunit in unmyelinated fibres and its role in the striatum. *Nat Commun,* 5**,** 5525.

MIYAZAKI, H., OYAMA, F., WONG, H. K., KANEKO, K., SAKURAI, T., TAMAOKA, A. & NUKINA, N. 2007. BACE1 modulates filopodia-like protrusions induced by sodium channel beta4 subunit. *Biochem Biophys Res Commun,* 361**,** 43-8.

O'MALLEY, H. A. & ISOM, L. L. 2015. Sodium channel beta subunits: emerging targets in channelopathies. *Annu Rev Physiol,* 77**,** 481-504.

OGINSKY, M. F., CUI, N., ZHONG, W., JOHNSON, C. M. & JIANG, C. 2017. Hyperexcitability of Mesencephalic Trigeminal Neurons and Reorganization of Ion Channel Expression in a Rett Syndrome Model. *J Cell Physiol,* 232**,** 1151-1164.

ROGER, S., GILLET, L., LE GUENNEC, J. Y. & BESSON, P. 2015. Voltage-gated sodium channels and cancer: is excitability their primary role? *Front Pharmacol,* 6**,** 152.

ROGER, S., ROLLIN, J., BARASCU, A., BESSON, P., RAYNAL, P. I., IOCHMANN, S., LEI, M., BOUGNOUX, P., GRUEL, Y. & LE GUENNEC, J. Y. 2007. Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol,* 39**,** 774-86.

SANCHEZ-SANDOVAL, A. L. & GOMORA, J. C. 2019. Contribution of voltage-gated sodium channel beta-subunits to cervical cancer cells metastatic behavior. *Cancer Cell Int,* 19**,** 35.

SHEILABI, M. A., TAKESHITA, L. Y., SIMS, E. J., FALCIANI, F. & PRINCIVALLE, A. P. 2020. The Sodium Channel B4-Subunits are Dysregulated in Temporal Lobe Epilepsy Drug-Resistant Patients. *Int J Mol Sci,* 21.

SHIMIZU, H., TOSAKI, A., OHSAWA, N., ISHIZUKA-KATSURA, Y., SHOJI, S., MIYAZAKI, H., OYAMA, F., TERADA, T., SHIROUZU, M., SEKINE, S. I., NUKINA, N. & YOKOYAMA, S. 2017. Parallel homodimer structures of the extracellular domains of the

voltage-gated sodium channel beta4 subunit explain its role in cell-cell adhesion. *J Biol Chem,* 292**,** 13428-13440.

TAN, B. H., PUNDI, K. N., VAN NORSTRAND, D. W., VALDIVIA, C. R., TESTER, D. J., MEDEIROS-DOMINGO, A., MAKIELSKI, J. C. & ACKERMAN, M. J. 2010. Sudden infant death syndrome-associated mutations in the sodium channel beta subunits. *Heart Rhythm,* 7**,** 771-8.

WHITE, H. V., BROWN, S. T., BOZZA, T. C. & RAMAN, I. M. 2019. Effects of FGF14 and NaVbeta4 deletion on transient and resurgent Na current in cerebellar Purkinje neurons. *J Gen Physiol,* 151**,** 1300-1318.

WILSON, M. J., ZHANG, M. M., AZAM, L., OLIVERA, B. M., BULAJ, G. & YOSHIKAMI, D. 2011. Navbeta subunits modulate the inhibition of Nav1.8 by the analgesic gating modifier muO-conotoxin MrVIB. *J Pharmacol Exp Ther,* 338**,** 687-93.

XIONG, H., YANG, Q., ZHANG, X., WANG, P., CHEN, F., LIU, Y., WANG, P., ZHAO, Y., LI, S., HUANG, Y., CHEN, S., WANG, X., ZHANG, H., YU, D., TAN, C., FANG, C., HUANG, Y., WU, G., WU, Y., CHENG, X., LIAO, Y., ZHANG, R., YANG, Y., KE, T., REN, X., LI, H., TU, X., XIA, Y., XU, C., CHEN, Q. & WANG, Q. K. 2019. Significant association of rare variant p.Gly8Ser in cardiac sodium channel beta4-subunit SCN4B with atrial fibrillation. *Ann Hum Genet,* 83**,** 239-248.

YANG, Q., XIONG, H., XU, C., HUANG, Y., TU, X., WU, G., FU, F., WANG, Z., WANG, L., ZHAO, Y., LI, S., HUANG, Y., WANG, C., WANG, D., YAO, Y., WANG, F., WANG, Y., XUE, Y., WANG, P., CHEN, Q., PU, J. & WANG, Q. K. 2019. Identification of rare variants in cardiac sodium channel beta4-subunit gene SCN4B associated with ventricular tachycardia. *Mol Genet Genomics,* 294**,** 1059-1071.

YU, F. H., WESTENBROEK, R. E., SILOS-SANTIAGO, I., MCCORMICK, K. A., LAWSON, D., GE, P., FERRIERA, H., LILLY, J., DISTEFANO, P. S., CATTERALL, W. A., SCHEUER, T. & CURTIS, R. 2003. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci,* 23**,** 7577-85.

ZHANG, M. M., WILSON, M. J., AZAM, L., GAJEWIAK, J., RIVIER, J. E., BULAJ, G., OLIVERA, B. M. & YOSHIKAMI, D. 2013. Co-expression of Na(V)beta subunits alters the kinetics of inhibition of voltage-gated sodium channels by pore-blocking mu-conotoxins. *Br J Pharmacol,* 168**,** 1597-610.

Figure 1

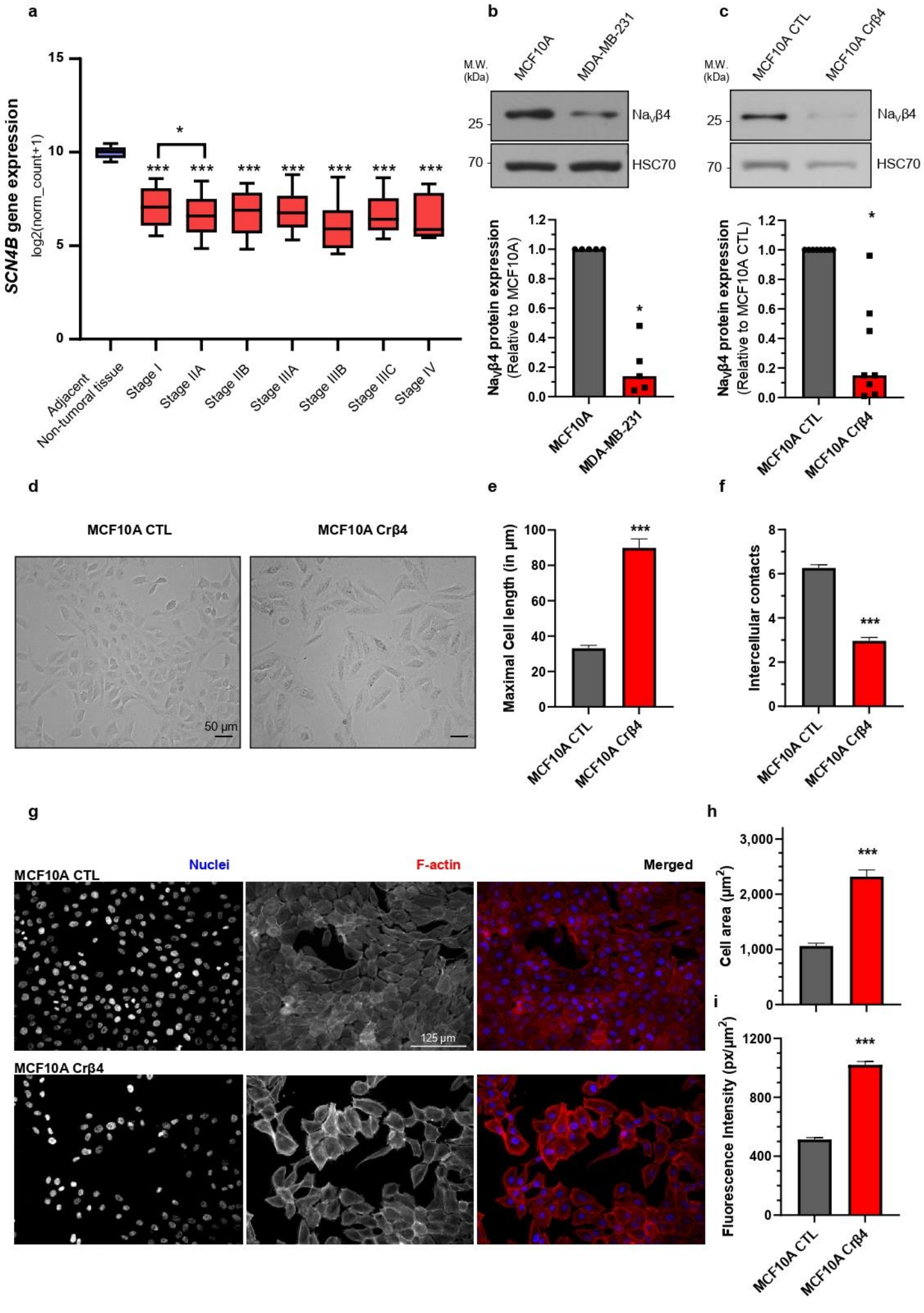

a
SCN4B gene expression
log2(norm_count+1)
15
10
5
0
*
***
Adjacent Non-tumoral tissue
Stage I
Stage IIA
Stage IIB
Stage IIIA
Stage IIIB
Stage IIIC
Stage IV
b
M.W. (kDa)
MCF10A
MDA-MB-231
25
70
Na$_V$β4
HSC70
Na$_V$β4 protein expression (Relative to MCF10A)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
c
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
d
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
50 µm
e
Maximal Cell length (in µm)
100
80
60
40
20
0
f
Intercellular contacts
8
6
4
2
0
g
Nuclei
F-actin
Merged
125 µm
h
Cell area (µm^2)
3,000
2,000
1,000
i
Fluorescence Intensity (px/µm^2)
1200
800
400

Figure 2

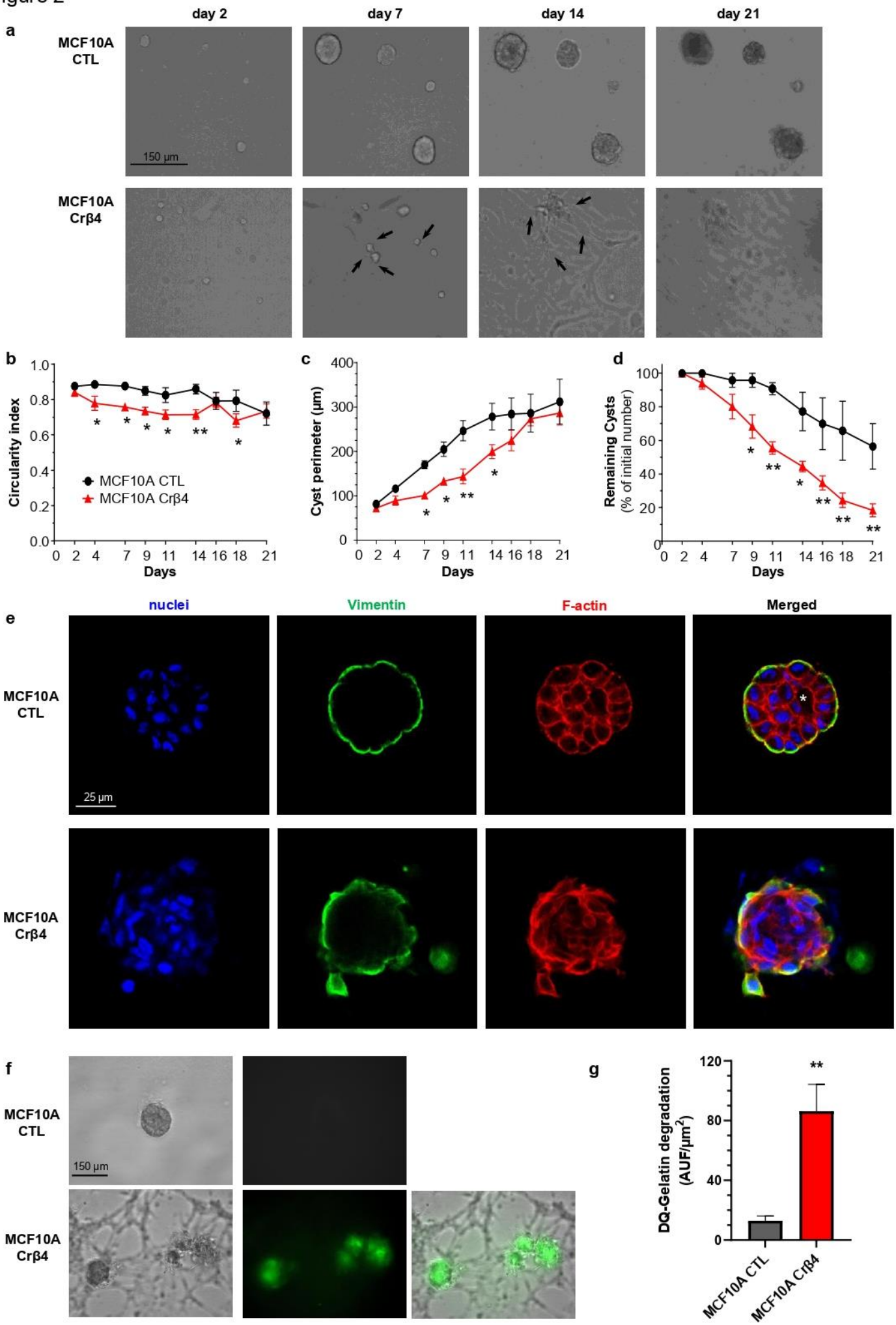

a
day 2
day 7
day 14
day 21
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
150 µm
b
Circularity index
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
Days
c
Cyst perimeter (µm)
Days
d
Remaining Cysts (% of initial number)
Days
e
nuclei
Vimentin
F-actin
Merged
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
25 µm
f
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
150 µm
g
DQ-Gelatin degradation (AUF/µm²)
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4

Figure 3

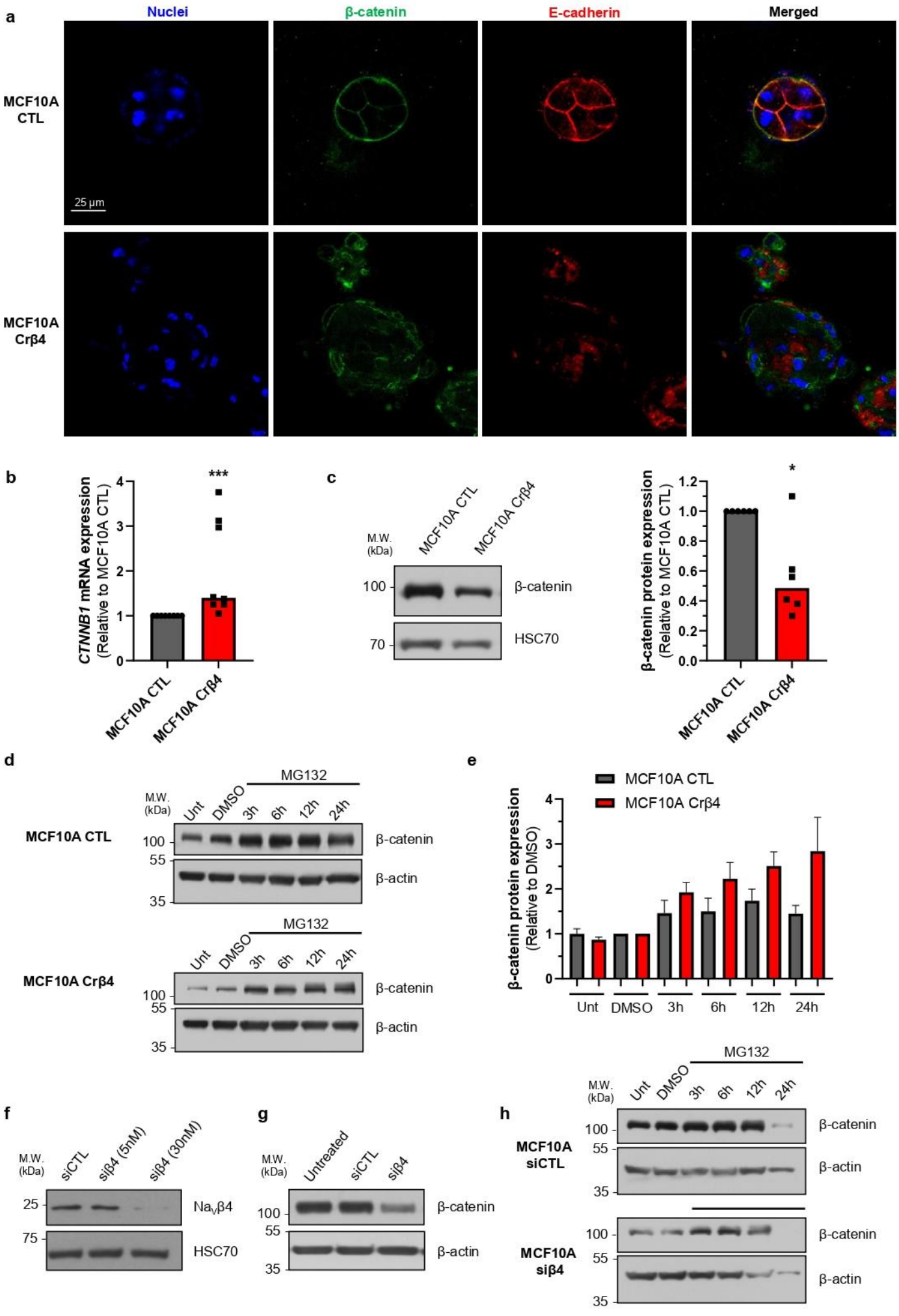
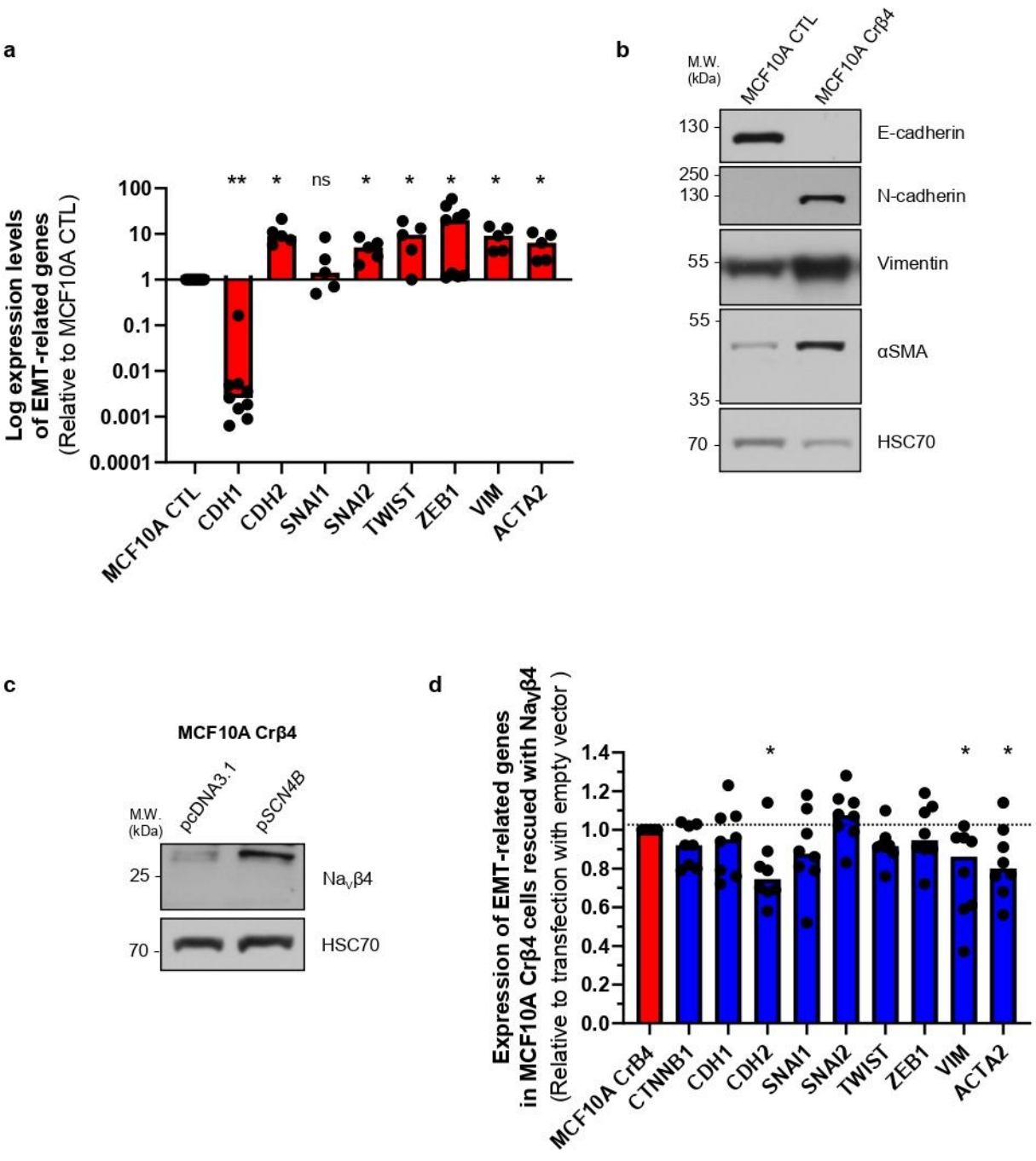

a
Nuclei
β-catenin
E-cadherin
Merged
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
25 µm
b
CTNNB1 mRNA expression (Relative to MCF10A CTL)
***
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
c
M.W. (kDa)
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
100
β-catenin
70
HSC70
β-catenin protein expression (Relative to MCF10A CTL)
*
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
d
MG132
M.W. (kDa)
Unt
DMSO
3h
6h
12h
24h
MCF10A CTL
100
55
35
β-catenin
β-actin
MCF10A Crβ4
e
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
β-catenin protein expression (Relative to DMSO)
Unt
DMSO
3h
6h
12h
24h
f
M.W. (kDa)
siCTL
siβ4 (5nM)
siβ4 (30nM)
25
75
Na$_v$β4
HSC70
g
M.W. (kDa)
Untreated
siCTL
siβ4
100
55
35
β-catenin
β-actin
h
MG132
M.W. (kDa)
Unt
DMSO
3h
6h
12h
24h
MCF10A siCTL
MCF10A siβ4
100
55
35
β-catenin
β-actin

Figure 4


a
Log expression levels of EMT-related genes (Relative to MCF10A CTL)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
** * ns * * * * *
MCF10A CTL
CDH1
CDH2
SNAI1
SNAI2
TWIST
ZEB1
VIM
ACTA2
b
M.W. (kDa)
MCF10A CTL
MCF10A Crβ4
130
E-cadherin
250
130
N-cadherin
55
Vimentin
55
αSMA
35
70
HSC70
c
MCF10A Crβ4
M.W. (kDa)
pcDNA3.1
pSCN4B
25
Nav β4
70
HSC70
d
Expression of EMT-related genes in MCF10A Crβ4 cells rescued with Navβ4
(Relative to transfection with empty vector)
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
* * *
MCF10A CrB4
CTNNB1
CDH1
CDH2
SNAI1
SNAI2
TWIST
ZEB1
VIM
ACTA2

Supplementary materials

THE VOLTAGE-GATED SODIUM CHANNEL BETA4 SUBUNIT MAINTAINS EPITHELIAL PHENOTYPE IN MAMMARY CELLS

Adélaïde DORAY[1], Roxane LEMOINE[1], Marc SEVERIN[2], Stéphanie CHADET[1], Osbaldo LOPEZ-CHARCAS[1], Audrey HÉRAUD[1], Christophe BARON[1], Pierre BESSON[1], Arnaud MONTEIL[3], Stine Falsig PEDERSEN[2] & Sébastien ROGER[1,4§]

[1] University of Tours, EA4245 Transplantation, Immunology, Inflammation, Tours, France

[2] Section for Cell Biology and Physiology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

[3] IGF, University of Montpellier, CNRS, INSERM, Montpellier, France

[4] Institut Universitaire de France, Paris, France

[§]Correspondence: Dr. Sébastien Roger,

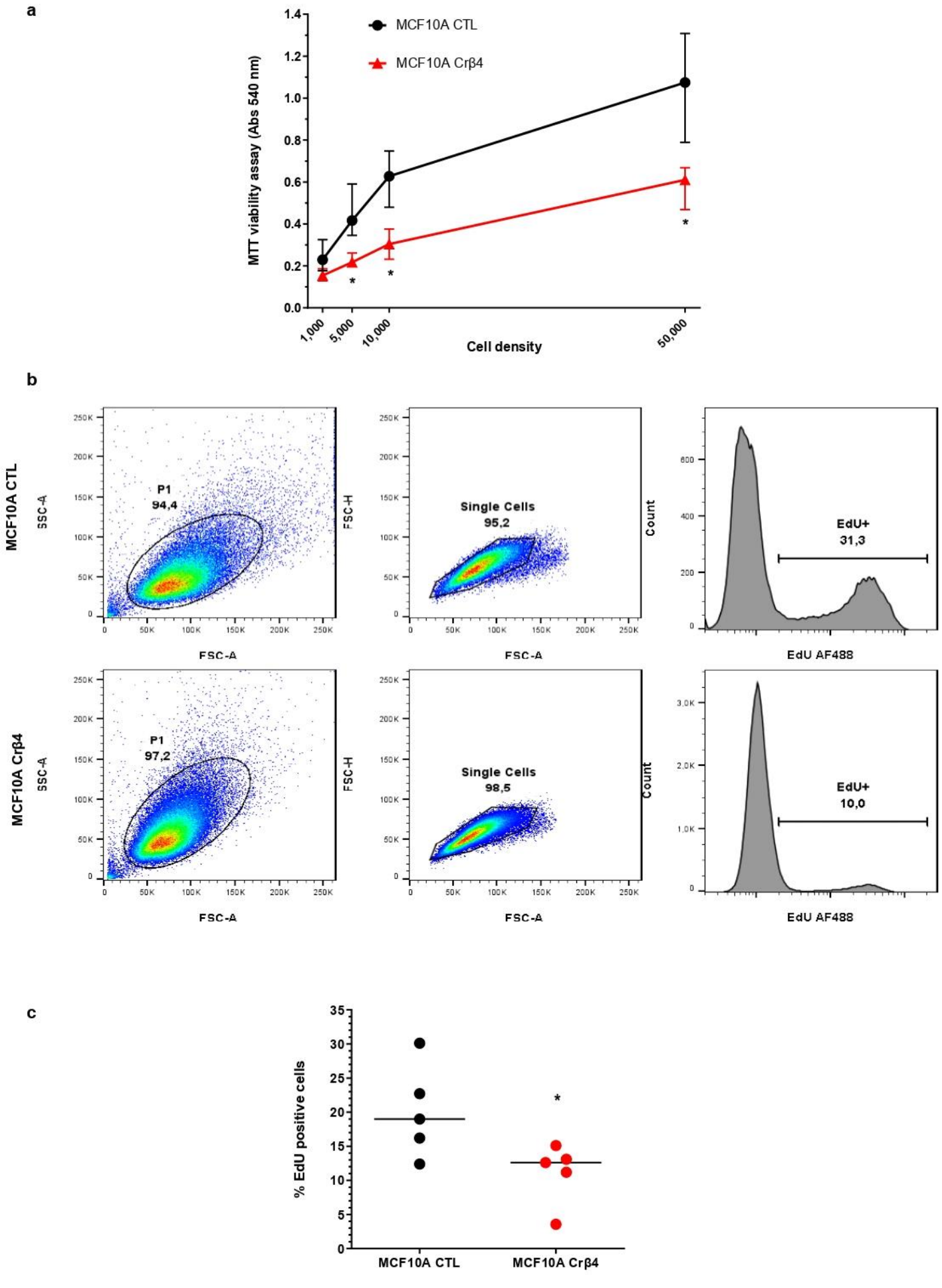
EA4245 Transplantation, Immunology, Inflammation, 10 Bd Tonnellé, 37032 Tours, France
Tel: (+33) 2 47 36 61 30, Email: sebastien.roger@univ-tours.fr

Supplementary Figure 1: Viability and proliferation of MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells

a, MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cell viability was measured by the MTT assay 4 days after seeding the cells at different densities (n=6 independent experiments). *, $p<0.05$ (Wilcoxon test). **b**, Labelling with 10 µM 5-Ethynyl-2'deoxyuridine (EdU, 10 µM) in MCF10A CTL and MCF10A Crβ4 cells was assessed by flow cytometry after 3 days of culture. **c**, Analyses of results acquired as in (b) from 5 independent experiments. *, $p<0.05$ (Mann-Whitney rank sum test).

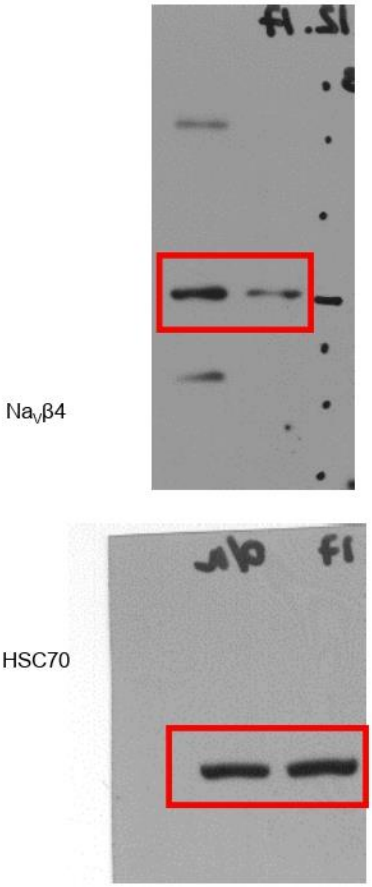
Supplementary Figure 2: uncropped WB films shown in a, Figure 1b, **b**, Figure 1c, **c,** Figure 3c, **d,** Figure 3d**, e,** Figure 3f**, f,** Figure 3g**, g,** Figure 3h**, h,** Figure 4b**,** and **f,** Figure 4c**.**

Supplementary Figure 1

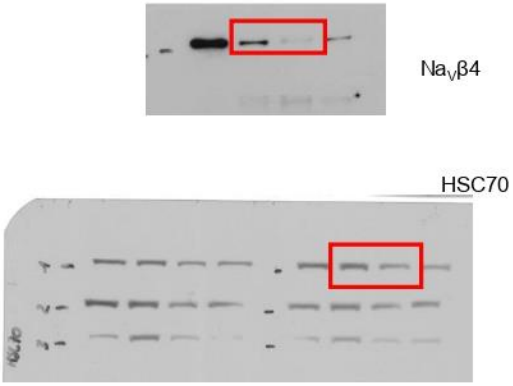


Supplementary Figure 2

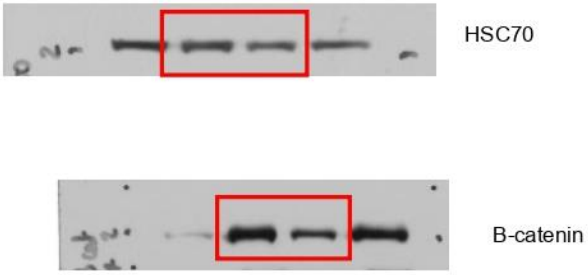
a) Uncropped blots shown in figure 1a



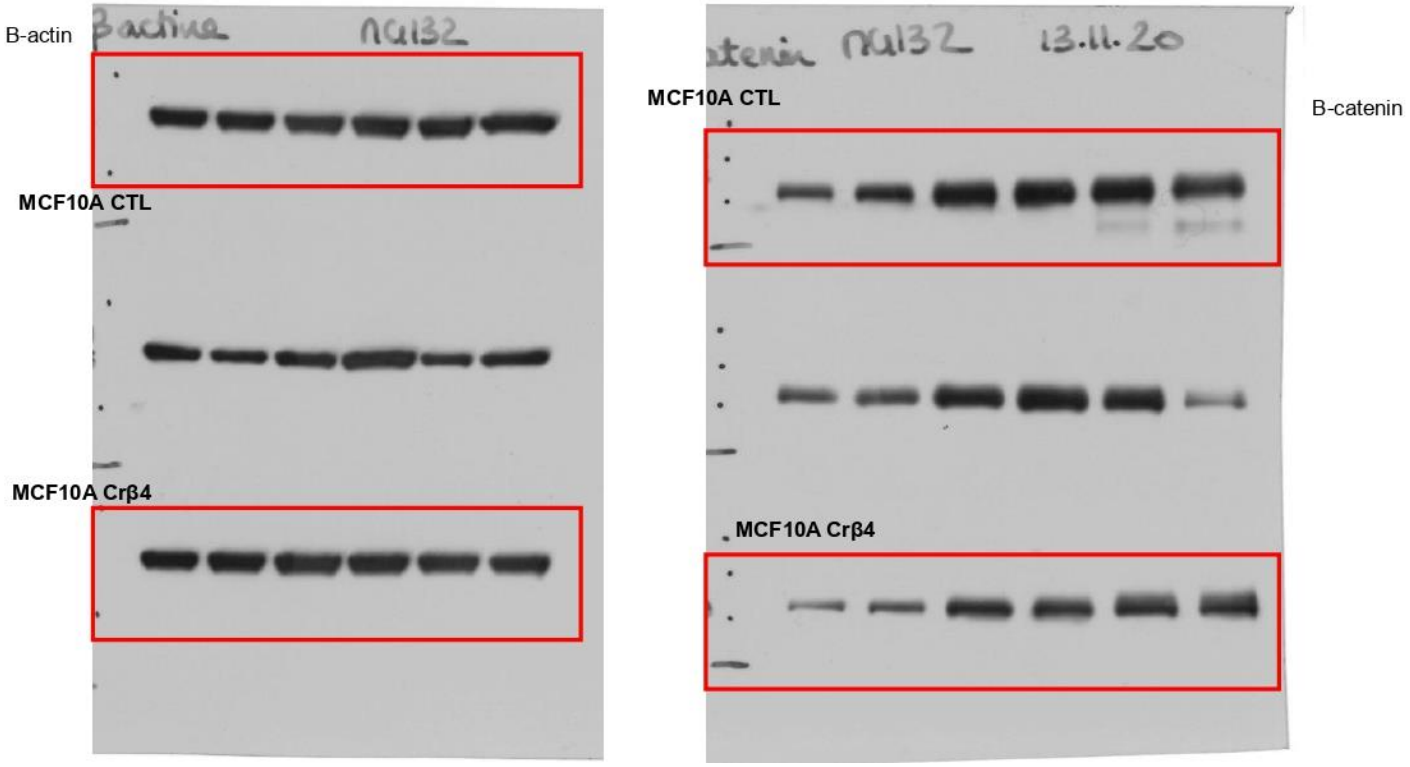
b) Uncropped blots shown in figure 1b



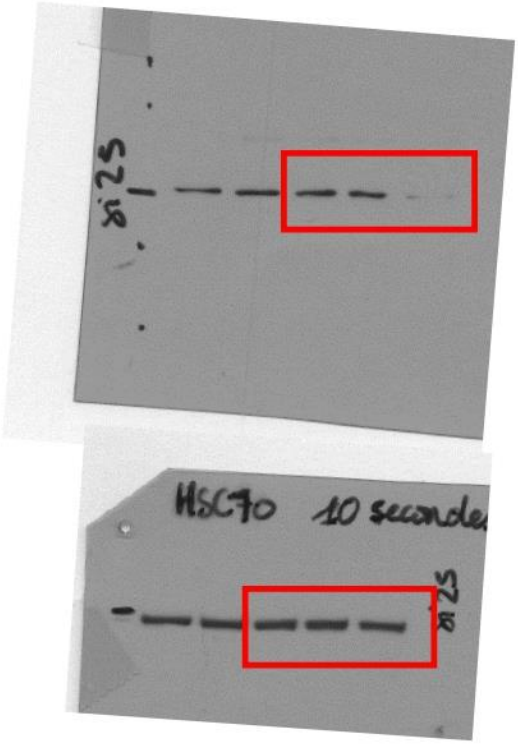
c) Uncropped blots shown in figure 3c



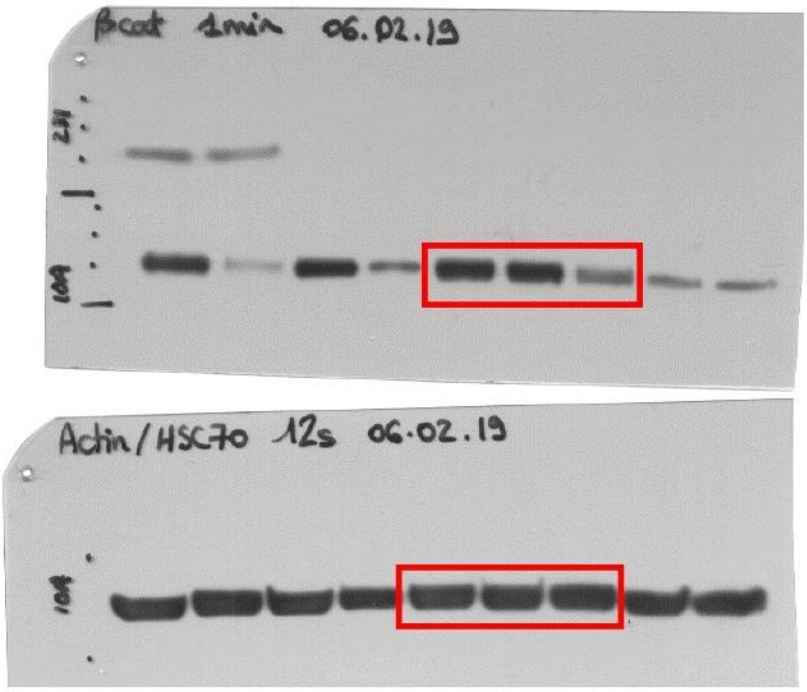
d) Uncropped blots shown in figure 3d



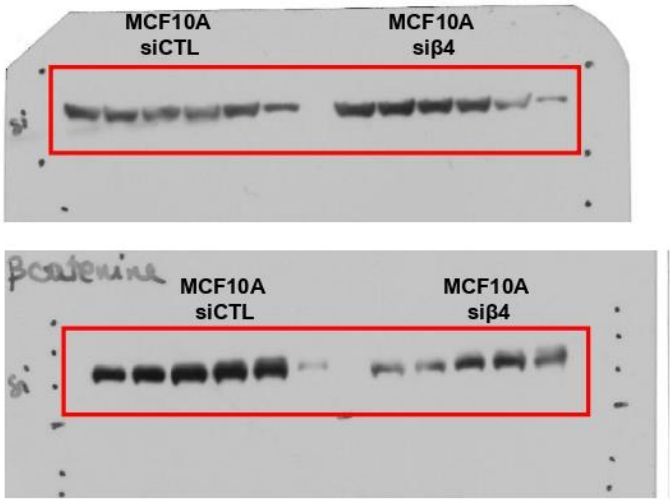
e) Uncropped blots shown in figure 3f



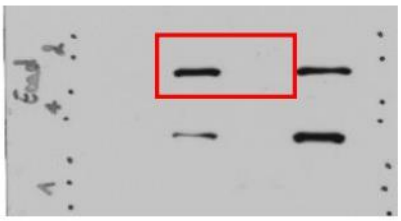
f) Uncropped blots shown in figure 3g



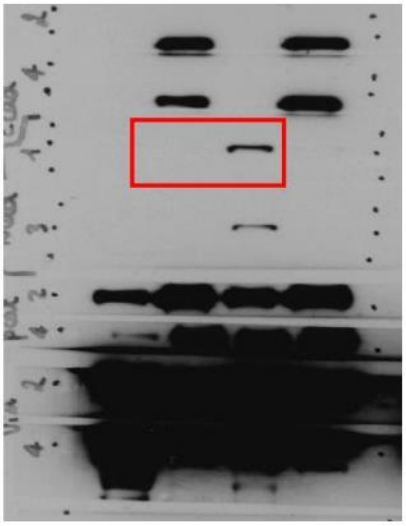
g) Uncropped blots shown in figure 3h



h) Uncropped blots shown in figure 4b

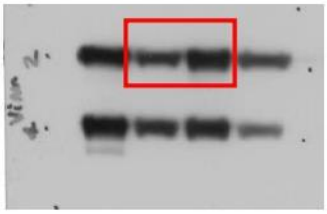


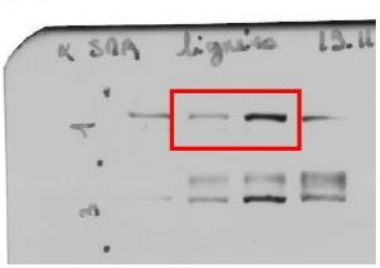
E-cadherin



N-cadherin

Vimentin



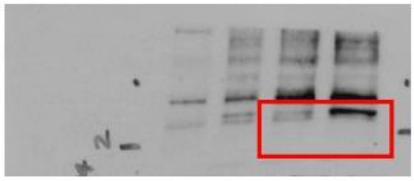


αSMA

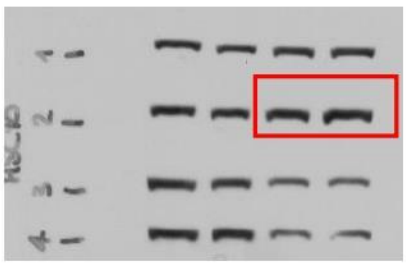


HSC70

h) Uncropped blots shown in figure 4c



$Na_V\beta4$



HSC70

Supplementary Table I: PCR primers used

Genes	Proteins	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5' →3')	Efficiencies	Expected size (pb)
CTNNB1	β-catenin	CCCACTAATGTCCAGCGTTT	GCATGATAGCGTGTCTGGAA	2.00	214
CDH1	E-cadherin	CGACCCAACCCAAGAATCTA	GGCTGTGCCTTCCTACAGAC	2.03	171
CDH2	N-cadherin	GGTGGAGGAGAAGAAGACCAG	GGCATCAGGCTCCACAGT	2.09	72
SNAI1	Snail	GGTTCTTCTGCGCTACTGCT	TAGGGCTGCTGGAAGGTAAA	2.00	157
SNAI2	Slug	GAGCATTTGCAGACAGGTCA	GCTTCGGAGTGAAGAAATGC	2.10	200
TWIST1	Twist1	CCACTGAAAGGAAAGGCATC	GCATTTTACCATGGGTCCTC	2.01	229
ZEB1	Zeb1	GCACCTGAAGAGGACCAGAG	GTGTAACTGCACAGGGAGCA	2.08	200
VIM	Vimentin	GTTTCCAAGCCTGACCTCAC	TTCCAGGGACTCATTGGTTC	1.99	246
ACTA2	α-SMA	ACCCGATAGAACATGGCATC	CATACATGGCTGGGACATTG	2.03	195
HPRT1	Hprt1	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	TATGTCCCCTGTTGACTGGT	2.00	119

Résultats non inclus dans l'article complémentaire

B. Absence de $Na_V1.5$ dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses MCF10A

Nous avons étudié les rôles de la protéine $Na_V\beta4$ dans des lignées de cellules épithéliales mammaires non cancéreuses. Ces cellules sont connues pour ne pas exprimer les $Na_V1.5$, sous-unité principale exprimée dans les cellules mammaires cancéreuses de la lignée MDA-MB-231 (Fraser *et al.,* 2005 ; Brisson *et al*., 2011). Il a tout de même été confirmé la non-expression en ARNm de $Na_V1.5$ dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses de la lignée MCF10A (Figure 14).

Afin de s'assurer que nous étudions le rôle de $Na_V\beta4$ indépendamment du canal sodique $Na_V1.5$, nous avons tout de même confirmé que la lignée MCF10A n'exprimait pas le gène *SCN5A* du canal sodique $Na_V1.5$ (Figure 14).

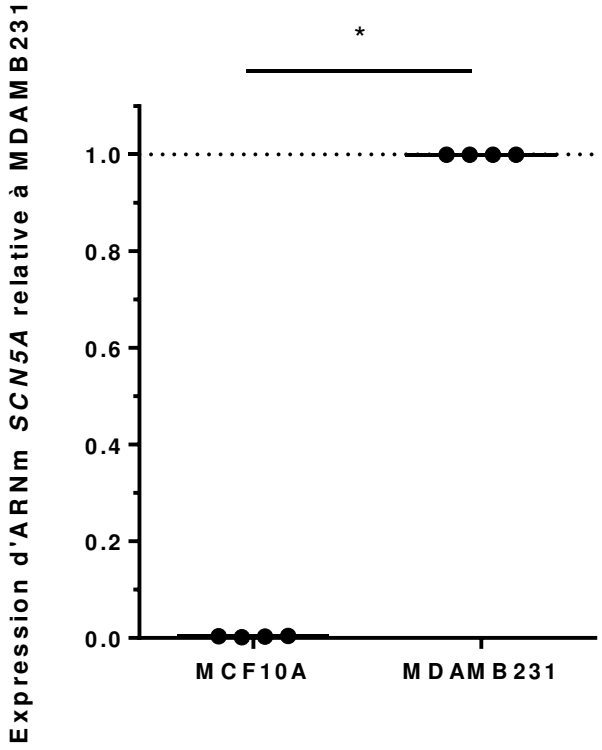


Figure 14 : Absence d'expression de $Na_V1.5$ dans la lignée de cellules mammaires non cancéreuses et forte expression dans les cellules tumorales.

*L'expression transcriptionnelle du gène SCN5A a été étudiée par RT-qPCR dans les cellules non cancéreuses MCF10A et cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Les barres indiquent les médianes. Un test statistique Mann-Whitney a été utilisé (N=4 expériences indépendantes ; * : p-value = 0,014).*

C. La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses diminue la migration et l'invasion cellulaires en 2D

La mobilité, la migration et l'invasion cellulaires sont des caractéristiques importantes des cellules cancéreuses. Nous les avons alors étudiées soit en « single cell tracking » soit à travers une membrane poreuse (insert contenant des pores de 8 µm de diamètre), après la réduction d'expression de Naνβ4 de manière stable (Crβ4), sur les cellules non cancéreuses de la lignée MCF10A. La figure 15 montre que les cellules du clone Crβ4 ont une mobilité très réduite de l'ordre de 5 fois par rapport aux cellules de la lignée MCF10A (Figure 15 ; panel A). Nous observons aussi que le nombre de cellules situées sur la face inférieure de l'insert est 5,6 fois moindre pour le clone Crβ4 en comparaison avec la lignée MCF10A (Figure 15 ; panel B). En plus d'étudier la capacité de déformation cellulaire, nous avons aussi analysé la migration à travers une membrane poreuse recouverte d'une substance mimant la matrice extracellulaire grâce à l'utilisation d'inserts recouverts de Matrigel® à 0,3 mg/mL (Figure 15 ; panel C), permettant d'évaluer la capacité invasive de ces cellules. En comparaison avec les cellules MCF10A, le nombre de cellules du clone Crβ4 qui ont migré est réduit de 35% (Figure 15 ; panel C). De plus, afin de nous assurer que ces différences n'étaient pas dues à une différence de mortalité cellulaire entre ces deux types cellulaires, nous avons réalisé un test de viabilité cellulaire à 48 heures (Figure 15 ; panel D). La viabilité du clone Crβ4

est supérieure à celle des cellules MCF10A, et ne peut donc pas être la cause d'une diminution de la migration cellulaire.

Ces résultats pris ensemble suggèrent que l'inhibition de l'expression Naνβ4 dans les cellules de la lignée cellulaire MCF10A diminue leur capacité de dégradation de la matrice extracellulaire et donc d'invasion cellulaire en 2D.

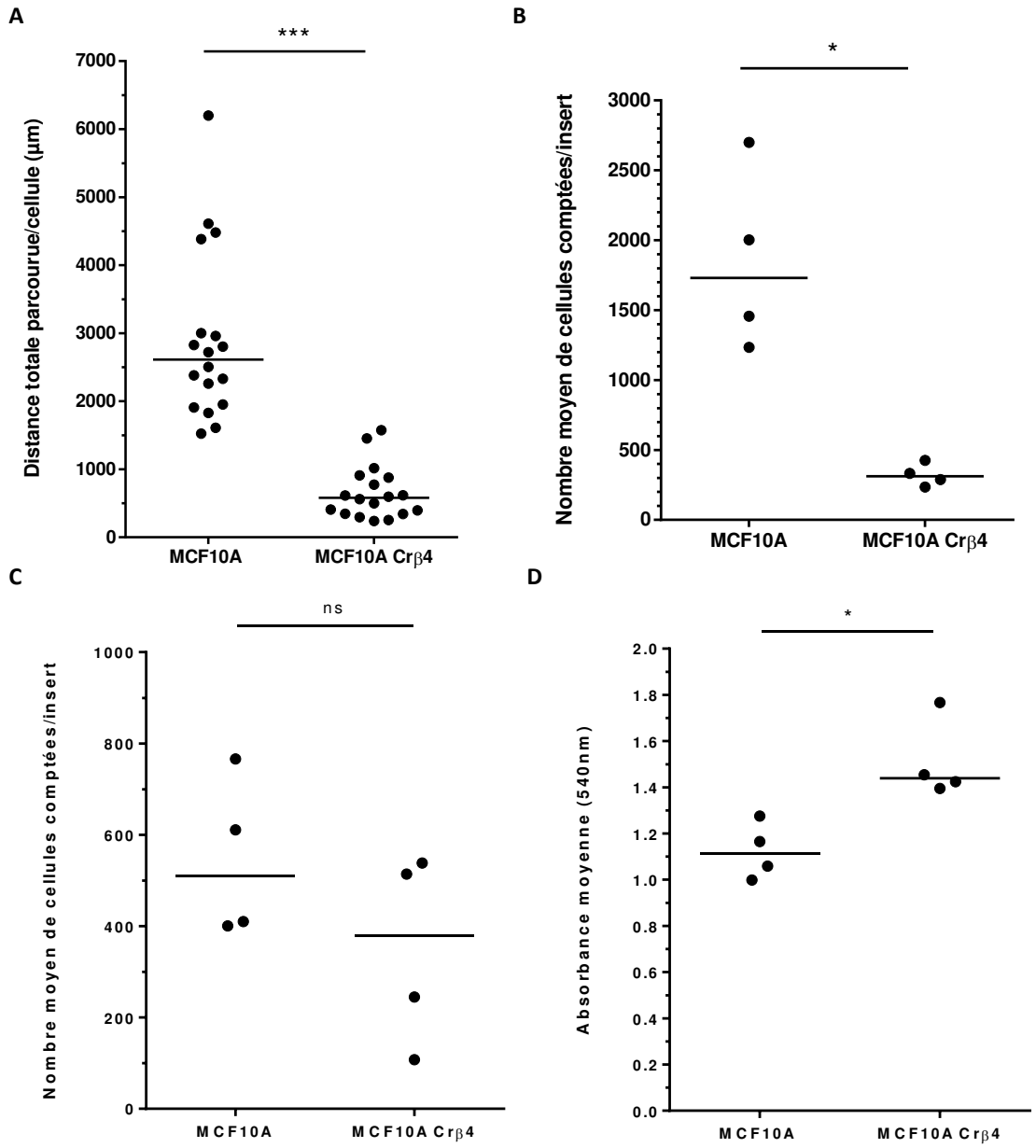


Figure 15 : La réduction de *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses diminue la mobilité, la migration et la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire en 2D.

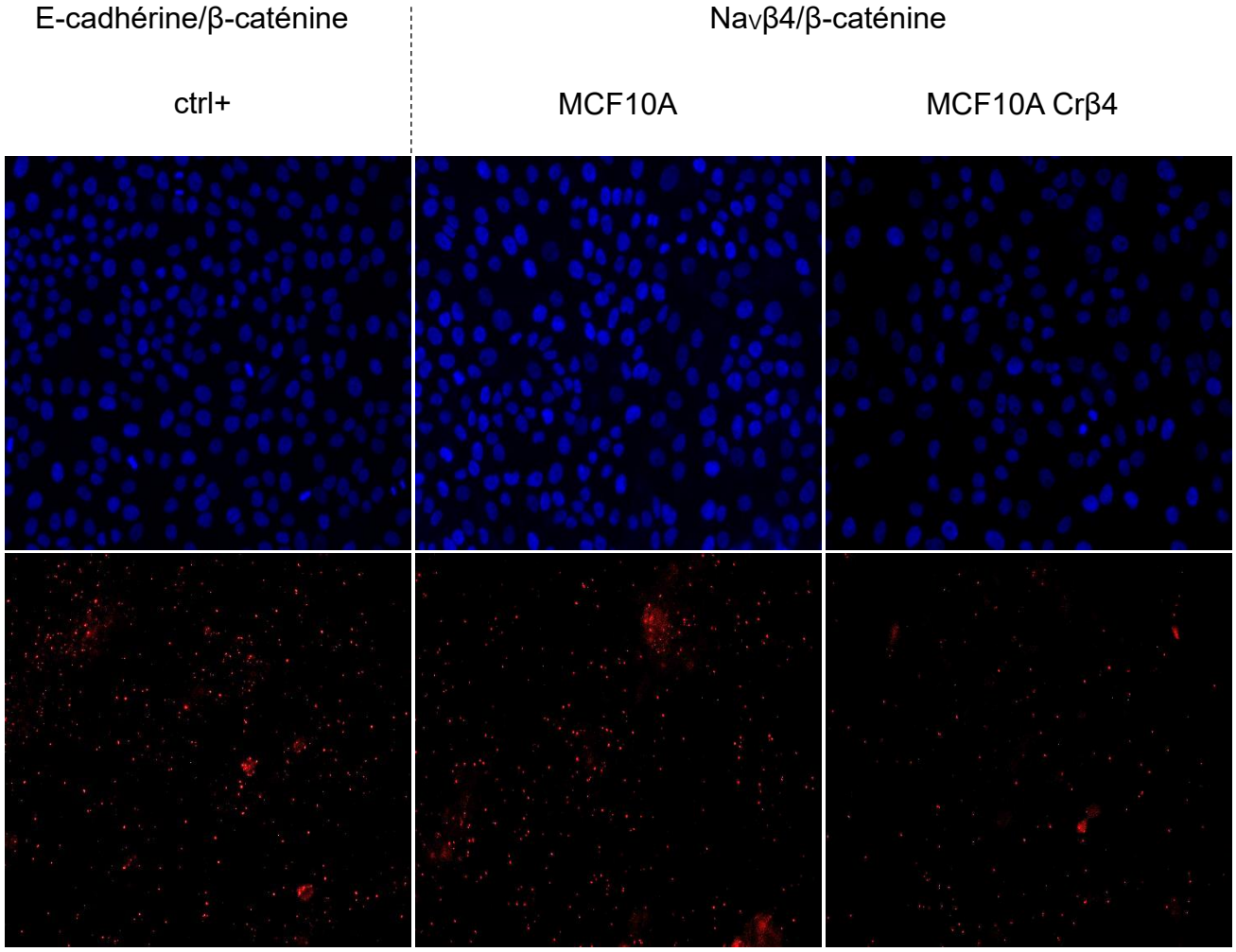
*A. La mobilité des cellules MCF10A et CRISPR Na$_V$β4 (MCF10A Crβ4) a été étudiée en « single cell tracking », en monocouche, où la distance accumulée totale parcourue a été mesurée pendant 48h. Un test statistique Mann Whitney a été appliqué (N=18 cellules analysées ; *** : p-value <0,0001). B. C. La migration (B.) et l'invasion (C.) cellulaires ont été étudiées. 10^5 cellules issues du clone Crβ4 ainsi que de la lignée MCF10A comme référence ont été mises en culture dans des inserts recouverts de Matrigel® (C.) ou non-recouverts (B.) et soumises pendant 48h à un gradient de SVF. Le nombre de noyaux cellulaires sur la face inférieure de la membrane a été compté, chaque expérience a été réalisée en triplicats (les nombres moyens de ces triplicats sont représentés par les points et les barres représentent les médianes sur le graphique). Des tests statistiques Mann-Whitney ont été appliqués (N=4 expériences indépendantes pour B et C ; * : p-value = 0,04). D. Contrôle de la viabilité cellulaire après 48h de culture à la même densité d'ensemencement que les inserts d'invasion, par l'utilisation de MTT. Les médianes sont représentées sur le graphique. Des tests statistiques Mann-Whitney ont été utilisés (N=4 expériences indépendantes ; non significatif).*

D. Les protéines Na$_V$β4 et β-caténine semble proche dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A

Nous avons montré que la réduction d'expression de *SCN4B* induit une diminution de l'expression de la protéine β-caténine par une dégradation accrue par le protéasome (Figure 3 ; panel d et e de l'article). Nous avons ensuite tenté de mieux appréhender les mécanismes à l'origine de cette dégradation plus importante dans les cellules sous-exprimant Na$_V$β4. Il est connu que Na$_V$β4 est une protéine transmembranaire (Isom *et al.*, 1994) tandis que la β-caténine est une protéine cytosolique, sous-membranaire (Dietrich *et al.*, 2002). Nous avons fait l'hypothèse que Na$_V$β4 pourrait stabiliser les jonctions cellulaires épithéliales et ancrer la β-

caténine à proximité de la membrane cytoplasmique. Par conséquent, une réduction d'expression de Naνβ4 pourrait être responsable de la déstabilisation des jonctions cellules, de la libération de la β-caténine et de sa dégradation par le protéasome. Afin d'étudier cette hypothèse et mettre en évidence une éventuelle relation de proximité entre ces deux protéines, une expérience de PLA (Proximity Ligation Assay) a été réalisée (Figure 16). Le décompte du nombre de points fluorescents dans une cellule indique le nombre de couples rapprochés Naνβ4-β-caténine d'une distance maximale de 40Å. Après 4 jours de culture cellulaire, nous avons compté le nombre moyen de points fluorescents par cellule en microscopie à fluorescence dans chacun des types cellulaires pour quatre expériences indépendantes réalisées (Figure 16). Comme référence, nous avons étudié sur une expérience les couples formés entre E-cadhérine et β-caténine dans les cellules MCF10A (2,6 points/cellule ; Figure 16, condition « ctrl+ »), connues pour avoir des interactions directes fortes (chapitre §Introduction, II, B). Cette technique permet de mettre en évidence pour la première fois que les protéines Naνβ4 et β-caténine forment des couples rapprochés dans les MCF10A. De plus, dans les cellules du clone Crβ4, le nombre de points fluorescents semble plus faible comparé aux cellules MCF10A (Figure 16). Cette différence était attendue, si on se rappelle que, dans les cellules du clone Crβ4, nous avions observé une forte diminution de l'expression de Naνβ4 (d'environ 70%) à 4 jours de culture.

A


E-cadhérine/β-caténine
Navβ4/β-caténine
ctrl+
MCF10A
MCF10A Crβ4

B

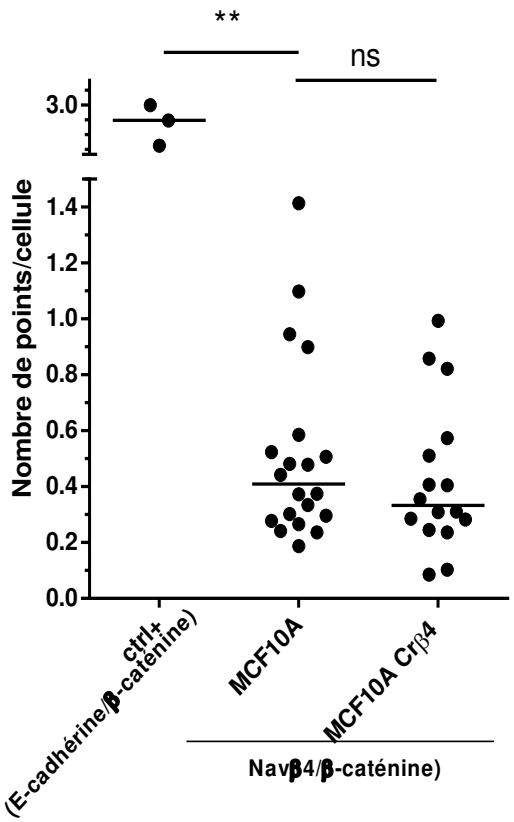

**
ns
Nombre de points/cellule
3.0
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
ctrl+
(E-cadhérine/β-caténine)
MCF10A
MCF10A Crβ4
Navβ4/β-caténine)

Figure 16 : Etude de la proximité entre les protéines Na$_V$β4 et β-caténine dans les cellules mammaires non cancéreuses.

*A. Images représentatives en microscopie à épifluorescence obtenues en Proximity Ligation Assay. B. Le nombre de points fluorescents, indiquant une proximité entre les protéines Na$_V$β4 et β-caténine, a été calculé en fonction du nombre de cellules MCF10A et CRISPR Na$_V$β4 (MCF10A Crβ4). Un point représente une image analysée et les barres représentent les médianes. Des tests Mann-Whitney ont été utilisés (N=4 expériences indépendantes ; ns : non significatif ; ** : p-value = 0,001).*

E. La sous-expression par siARN de *SCN4B* dans les cellules mammaires MCF10A ne modifie pas l'invasion cellulaire.

Dans nos premières expériences, la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules non cancéreuses MCF10A, induite par la technologie CRISPR/Cas9, provoque, entre autres, un changement du phénotype, une désorganisation cellulaire en 3D ainsi qu'une modification d'expression de certains marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il nous semblait important de vérifier certains de ces effets biologiques lors d'une réduction d'expression de Na$_V$β4 par le biais d'une autre technologie, les siARN. Nous avons ainsi analysé l'invasion cellulaire à 48 heures, 72h après transfection des siARN, ainsi que l'expression des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse 48 heures après transfection des siARN.

Vingt-quatre heures après la transfection des siARN, les cellules ont été mises en culture dans des inserts avec présence d'une matrice extracellulaire. Après 48h d'invasion, le nombre de cellules sur la face interne des inserts a été décompté. Nous voyons sur la figure 17 que la sous-expression de Na$_V$β4 dans les

cellules MCF10A semble diminuer l'invasion cellulaire, de façon non significative, ce qui pourrait confirmer nos résultats obtenus lors de la réduction d'expression avec la technologie CRISPR/Cas9. Cependant, il est important de noter que peu d'expériences ont été réalisées. Une augmentation d'effectifs serait alors nécessaire afin de statuer sur l'effet de la sous-expression de Naνβ4 dans les cellules MCF10A sur l'invasion cellulaire.

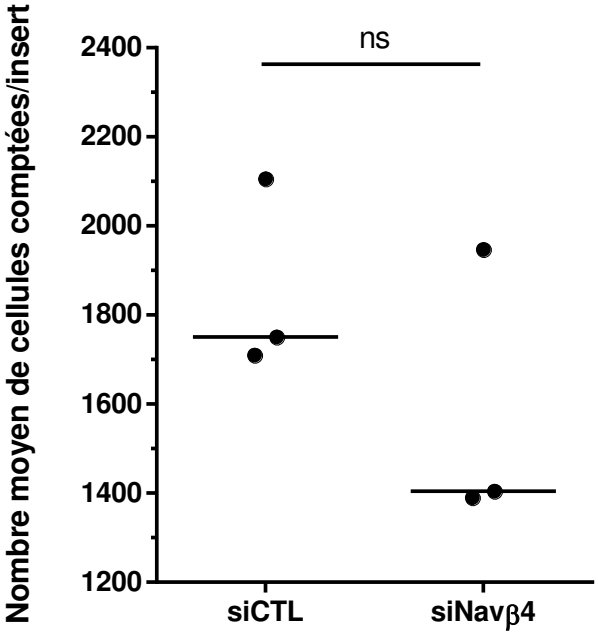


Figure 17 : La sous-expression de *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses ne modifie pas l'invasion cellulaire.

L'invasion des cellules MCF10A siNa$_V$β4 a été étudiée en inserts recouverts d'une couche de Matrigel® après 48h d'invasion en comparaison des siCTL. Les barres représentent les médianes. Un test statistique Mann-Whitney a été utilisé (N=3 expériences indépendantes ; non significatif).

F. La surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires Crβ4 ne modifie pas l'expression de la protéine β-caténine.

Nous avons ensuite voulu étudier la réversibilité du phénomène en réexprimant la protéine Na$_V$β4 dans les cellules du clone Crβ4. Précédemment, nous avons observé que la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les MCF10A diminuait l'expression protéique de la β-caténine (Figure 3 ; panel c de l'article). Ainsi, nous avons étudié si la surexpression de Na$_V$β4 pouvait modifier l'expression de *CTNNB1* par RT-qPCR et de la β-caténine par western blot à 48 heures après transfection (Figure 18). Nous voyons sur la figure 18 que la surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules Crβ4 ne semble pas avoir d'effet sur l'expression du gène *CTNNB1*, en RT-qPCR, ou de son produit d'expression la β-caténine, évaluée en western blot. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la surexpression de Na$_V$β4 n'était pas suffisamment importante pour induire le résultat attendu, qui était une augmentation d'expression de la β-caténine

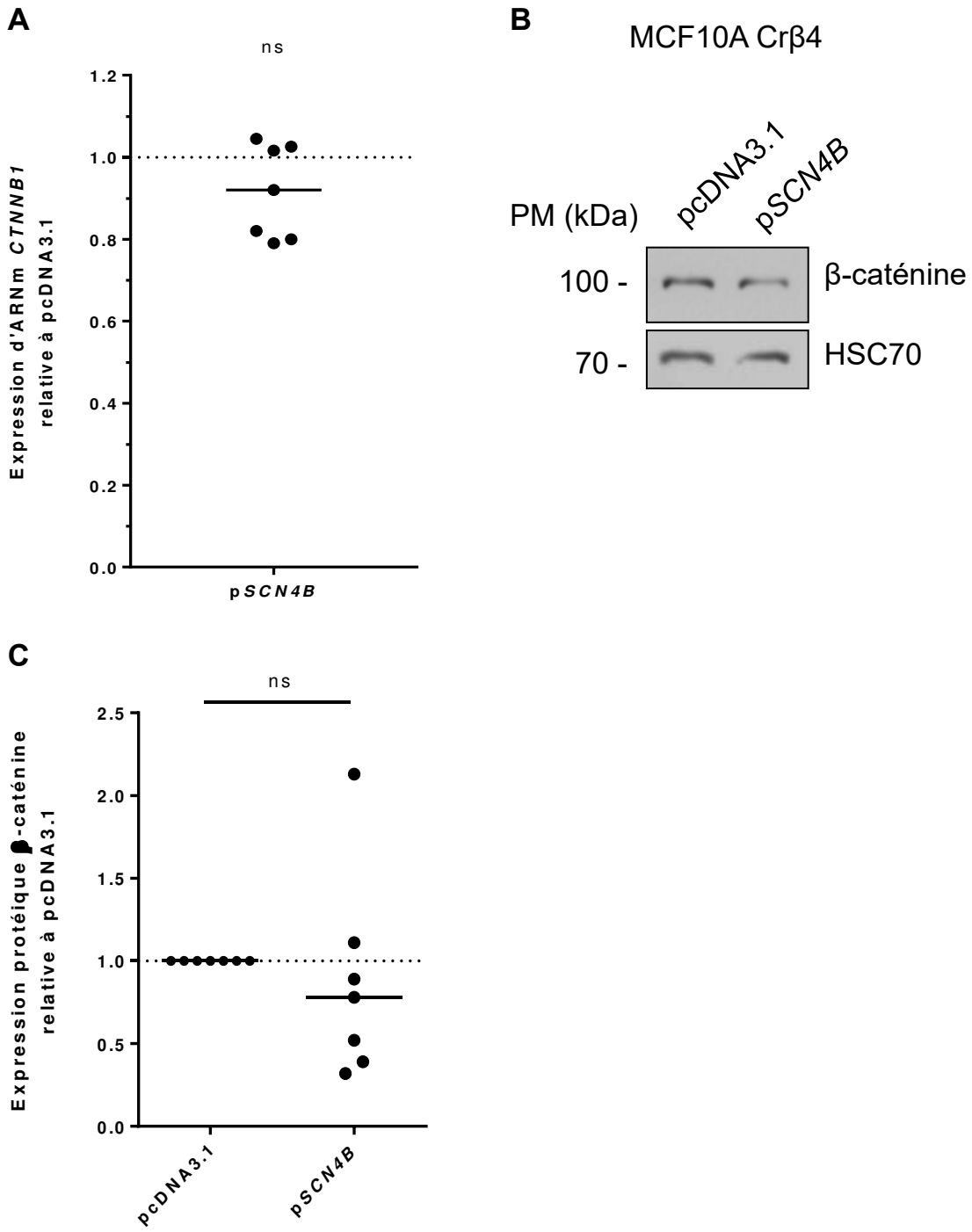


Figure 18 : La surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses Crβ4 ne modifie pas l'expression de la *CTNNB1*/β-caténine.

A. L'expression transcriptionnelle du gène CTNNB1 a été étudiée par RT-qPCR 48h après surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A Crβ4. La ligne pointillée représente les Crβ4 transfectées avec un vecteur nu pcDNA3.1 eGFP (pcDNA3.1). La barre indique la médiane. Un test statistique Wilcoxon a été appliqué (N=7 expériences indépendantes ; non significatif). B.

Western blot représentatif indiquant l'expression protéique de la β-caténine 48h après surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules du clone Crβ4. L'immunomarquage de HSC70 a été utilisé pour le contrôle de dépôts protéiques. C. Graphique représentant l'expression protéique relative de la β-caténine. La ligne pointillée représente les Crβ4 transfectées avec pcDNA3.1 et la barre indique la médiane. Un test statistique Wilcoxon a été appliqué (N=7 expériences indépendantes ; non significatif).

G. La surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires MCF10A ne modifie pas l'expression de la protéine β-caténine.

Dans la mesure où la surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules du clone Crβ4 n'a pas eu d'effet sur l'expression de la β-caténine (Figure 18), nous avons analysé l'effet d'une surexpression de Na$_V$β4 dans les MCF10A sur l'expression transcriptionnelle et protéique de la *CTNNB1*/β-caténine. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'efficacité de la transfection du plasmide contenant la forme entière de Na$_V$β4 (p*SCN4B*) dans les cellules de la lignée MCF10A. La figure 19 montre une augmentation d'environ 20000 fois de l'ARNm de *SCN4B* par rapport à la transfection du plasmide nu (pcDNA3.1).

Nous avons ensuite étudié si la surexpression de Na$_V$β4 affecte l'expression de *CTNNB1* en RT-qPCR et de la β-caténine par western blot à 48 heures après transfection. Nous voyons sur la figure 20 que la surexpression de Na$_V$β4 ne modifie pas l'expression transcriptionnelle et protéique de *CTNNB1*/β-caténine dans les cellules MCF10A WT.

De la même façon que pour la surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules Crβ4, la surexpression de cette protéine pourrait ne pas être suffisamment

importante pour induire des changements significatifs dans l'expression d'autres protéines.

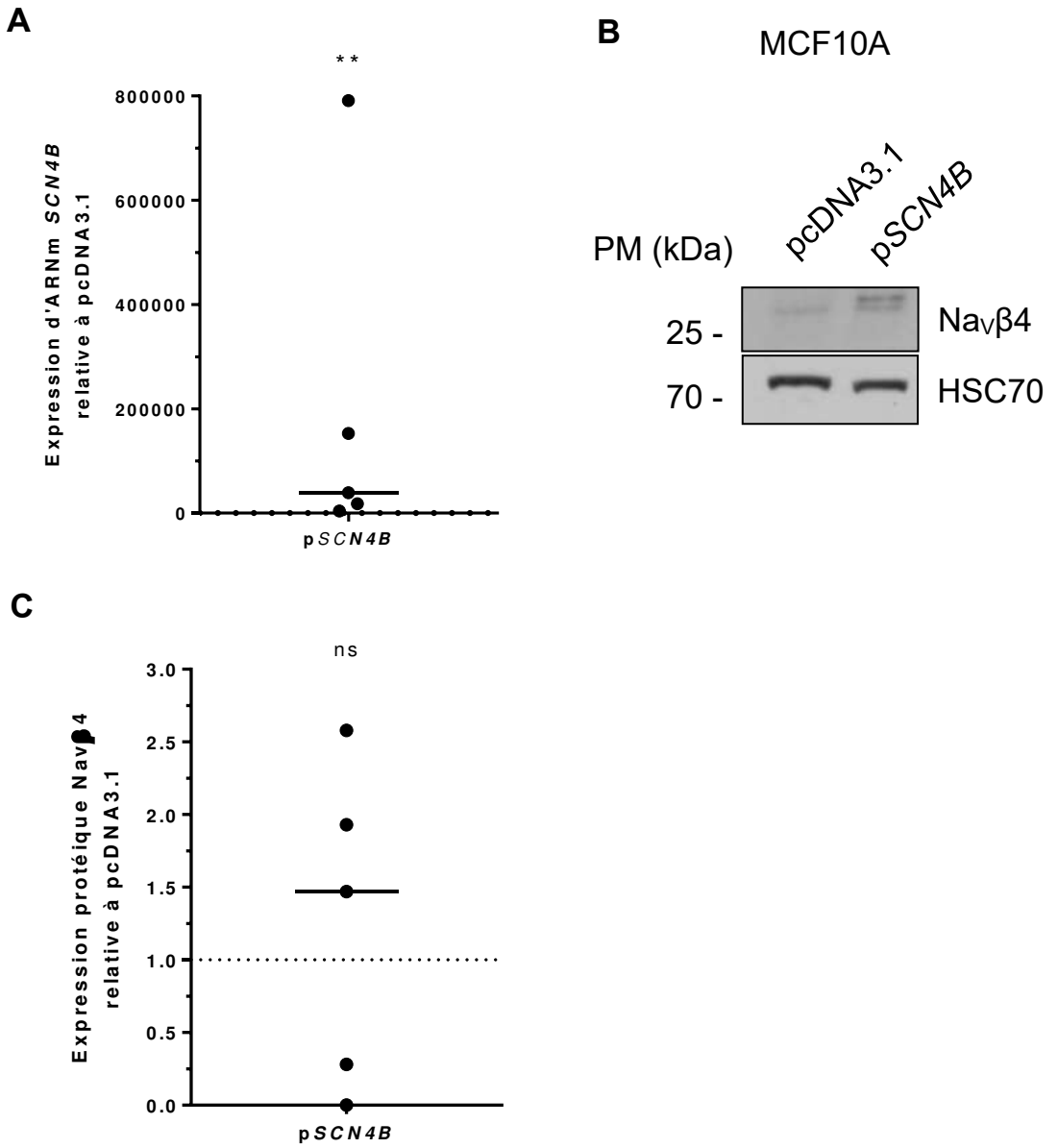


Figure 19 : Vérification de la surexpression de NaVβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A.

*A. L'expression transcriptionnelle du gène SCN4B a été étudiée par RT-qPCR 48h après surexpression de NaVβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A. La ligne pointillée représente les MCF10A transfectées avec un vecteur nu pcDNA3.1 eGFP (pcDNA3.1). La barre indique la médiane. Un test statistique Mann-Whitney a été appliqué (N=5 expériences indépendantes ; ** : p-*

value=0,004). B. Images représentatives de western blot indiquant l'expression protéique de la $Na_V\beta4$ après surexpression de $Na_V\beta4$ dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A WT. L'anticorps anti-HSC70 a été utilisé pour le contrôle de dépôts protéiques. C. Graphique représentant l'expression protéique relative de $Na_V\beta4$. La ligne pointillée représente la condition pcDNA3.1 et la barre indique la moyenne. Un test statistique Mann-Whitney a été appliqué (N=5 expériences indépendantes ; non significatif).

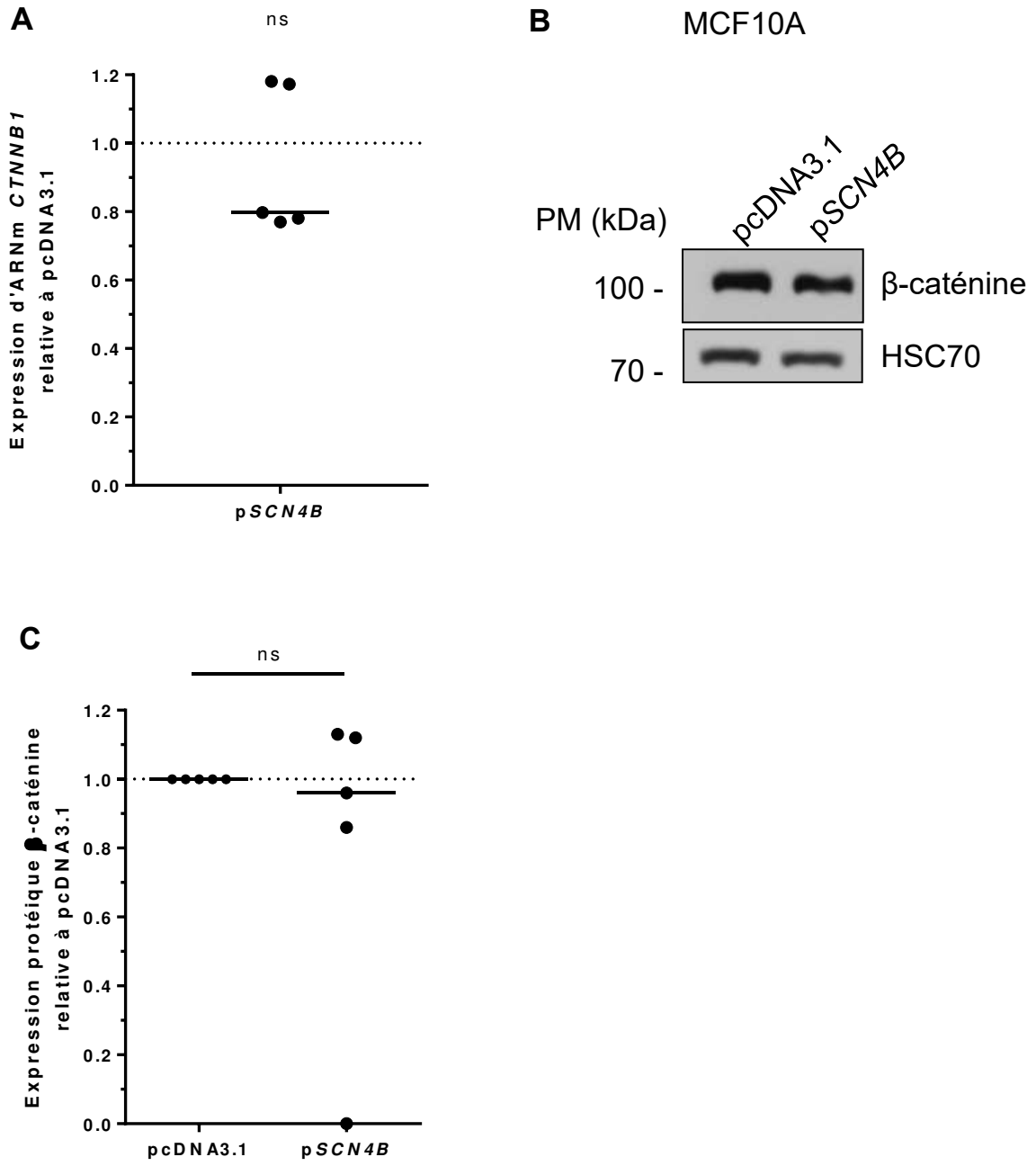


Figure 20 : La surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A ne modifie pas l'expression de la *CTNNB1*/β-caténine.

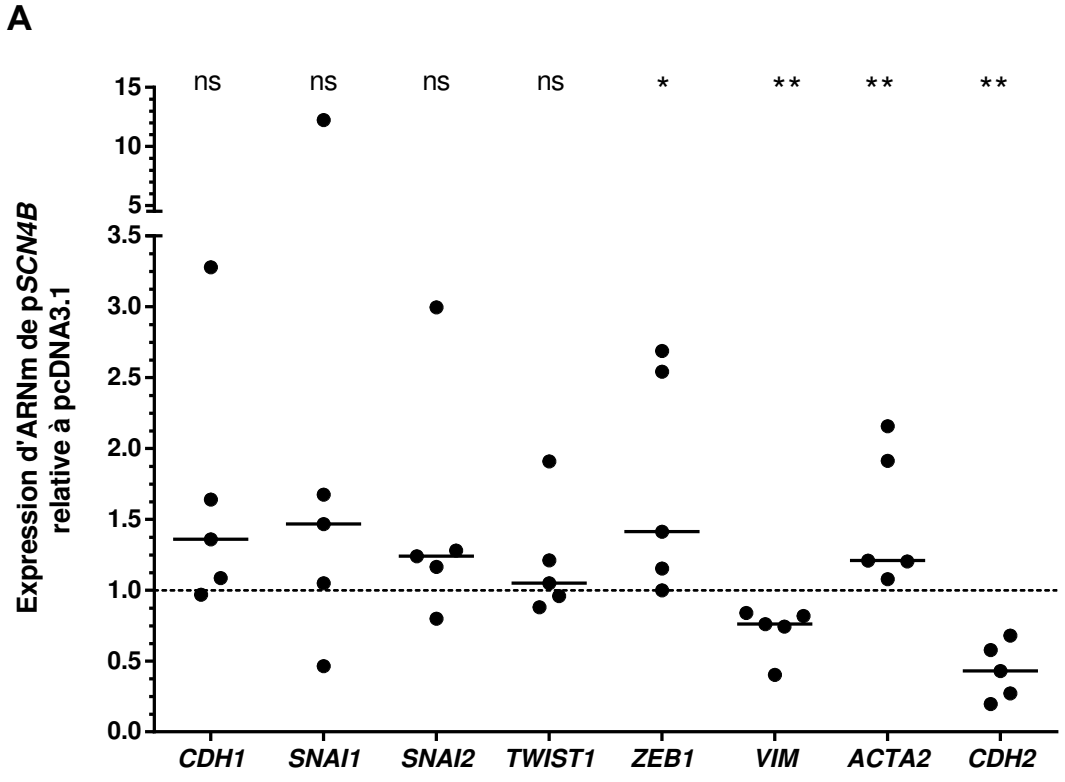
A. L'expression transcriptionnelle du gène CTNNB1 a été étudiée par RT-qPCR 48h après surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A. La ligne pointillée représente les MCF10A transfectées avec un vecteur nu pcDNA3.1 eGFP (pcDNA3.1). La barre indique la médiane. Un test statistique Mann-Whitney a été appliqué (N=5 expériences indépendantes ; non significatif). B.

Western blots représentatifs indiquant l'expression protéique de la β-caténine après expression de $Na_V\beta4$ dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A. L'immunomarquage HSC70 a été utilisé pour le contrôle de dépôts protéiques. C. Graphique représentant l'expression protéique relative de la β-caténine. La ligne pointillée représente la condition pcDNA3.1 et la barre indique la médiane. Un test statistique Mann-Whitney a été appliqué (N=5 expériences indépendantes ; non significatif).

H. La surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A diminue l'expression des marqueurs mésenchymateux vimentine et N-cadhérine.

Certains marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse ont été étudiés 48h après la surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules MCF10A qui expriment de façon physiologique Na$_V$β4 (Figure 21). La figure 21 montre que l'expression des gènes *VIM* et *CDH2* diminue significativement de 24% et 57% respectivement (p=0,008) par rapport aux cellules MCF10A transfectées avec vecteur nu pcDNA3.1 eGFP (pcDNA3.1). Cependant, l'expression des gènes *ZEB1 et ACTA2* augmente. Au niveau protéique, les marqueurs mésenchymateux ne semblent pas impactés par la surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules non cancéreuses MCF10A.

La surexpression de Na$_V$β4 pourrait ne pas être suffisamment importante pour induire des changements significatifs dans l'expression d'autres protéines.



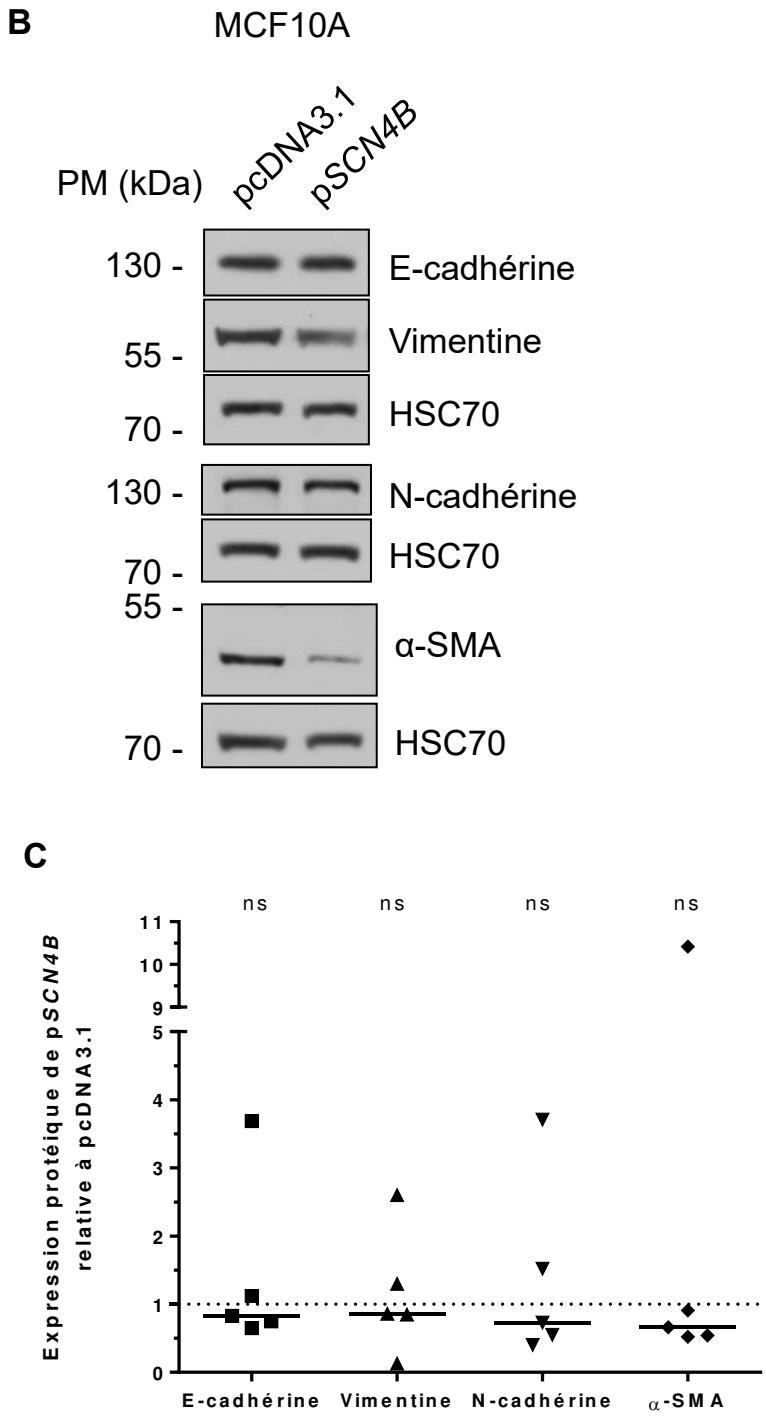


Figure 21 : La surexpression du gène *SCN4B* dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A WT diminue l'expression transcriptionnelle de *VIM* et *CDH2*.

A. L'expression transcriptionnelle des gènes CDH1, SNAI1, SNAI2, TWIST, ZEB1, VIM, ACTA2, CDH2 a été étudiée par RT-qPCR 48h après la surexpression de $Na_V\beta4$ dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A. La ligne pointillée représente les MCF10A transfectées avec un vecteur nu pcDNA3.1 eGFP

*(pcDNA3.1). Les barres indiquent les médianes. Des tests statistiques Mann-Whitney ont été appliqués (N=5 expériences indépendantes ; * : p-value = 0,048 ; ** : p-value = 0,008). B. Western blots représentatifs indiquant l'expression protéique de l'E-cadhérine, Vimentine, α-SMA, N-cadhérine après la surexpression de $Na_V\beta4$ dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A. L'immunomarquage de HSC70 a été utilisé pour le contrôle de dépôts protéiques. C. Graphique représentant l'expression protéique relative de la β-caténine. La ligne pointillée représente la condition pcDNA3.1 et les barres indiquent les médianes. Des tests statistiques Mann-Whitney ont été appliqués (N=5 expériences indépendantes ; non significatif).*

II. Conséquence de la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231

A. Sélection des cellules mammaires cancéreuses MDA-MB-231 sous-exprimant Na$_V$β4 par la technique CRISPR/Cas9

Afin d'étudier les conséquences de la réduction d'expression de *SCN4B* sur l'agressivité cancéreuse, il est important d'obtenir des modèles *in vitro*, comme des lignées cellulaires mammaires cancéreuses. Ce modèle a été obtenu par l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 dans les cellules cancéreuses mammaires humaines de la lignée MDA-MB-231, ayant pour objectif de sous-exprimer la protéine Na$_V$β4. Des clones ont été sélectionnés par l'analyse de l'expression de *SCN4B* par RT-qPCR et de Na$_V$β4 par western blot. Trois clones exprimant le plus faiblement Na$_V$β4 ont alors été retenus et nommés CRISPR #3 et #4 et #5. La figure 22 montre que les cellules CRISPR #3, #4 et #5 présentent une expression transcriptionnelle de *SCN4B* diminuée de 70 à 80% environ et de 35% à 83% environ pour l'expression protéique de Na$_V$β4 (résultats préliminaires).

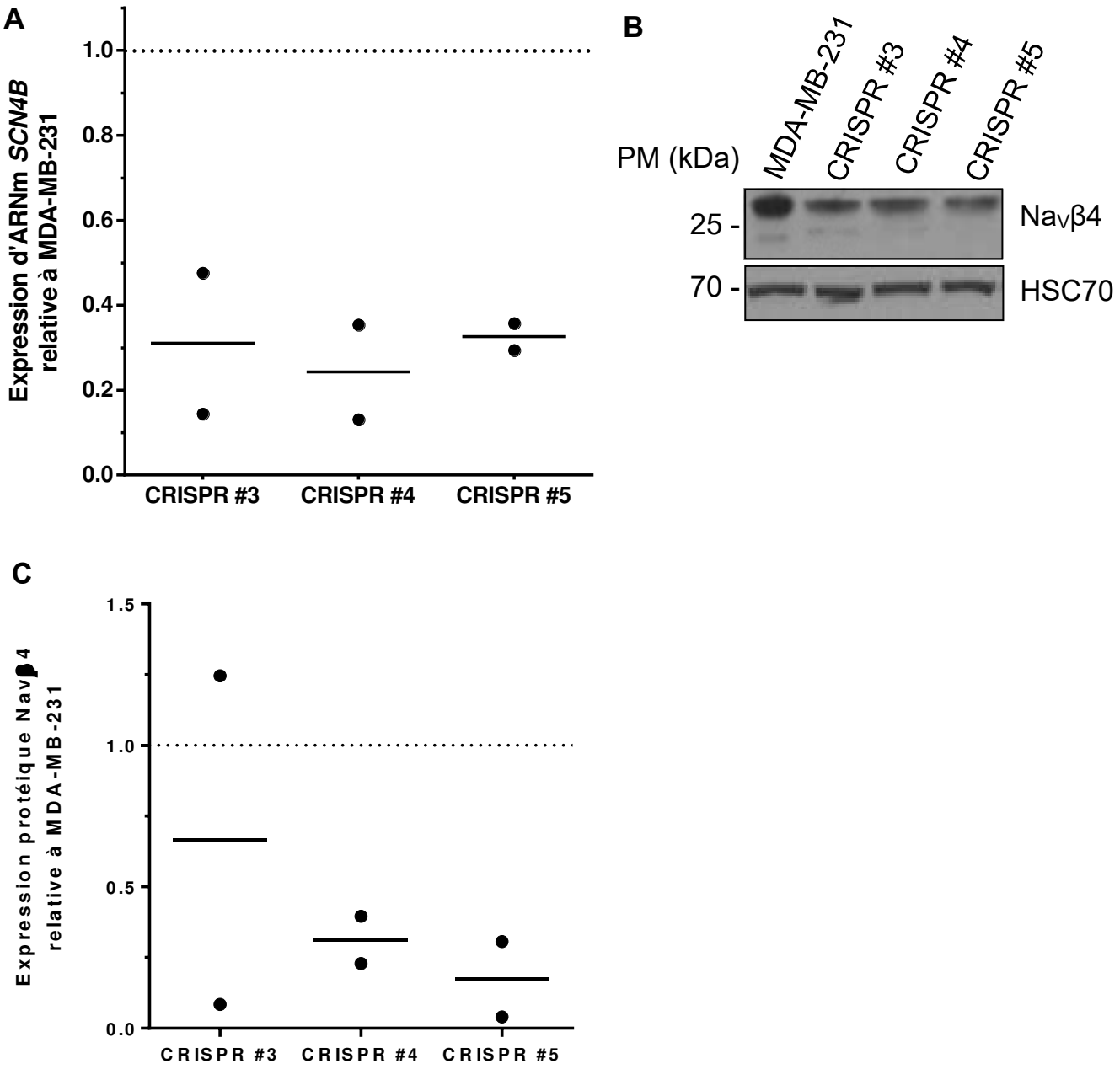


Figure 22 : Inhibition de l'expression de Navβ4 dans les 3 clones CRISPR #3 à #5 sélectionnés de MDA-MB-231.

A. L'expression transcriptionnelle du gène SCN4B a été étudiée par RT-qPCR dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 parentale et les clones CRISPR Navβ4 issus de cette lignée (#3, #4 et #5). La ligne pointillée représente la lignée parentale MDA-MB-231 et les barres indiquent les médianes (N=2 expériences indépendantes). B. Western blot représentatif de l'expression de Navβ4. L'immunomarquage de HSC70

a été utilisé pour les contrôles de dépôts protéiques. C. Graphique représentant la quantification relative de l'expression de $Na_V\beta4$ dans les différents types cellulaires. Les barres représentent les médianes (N=2 expériences indépendantes).

B. La réduction d'expression de $Na_V\beta4$ dans les cellules mammaires cancéreuses augmente l'invasion cellulaire

Une fois les différents clones obtenus, nous avons étudié deux caractéristiques importantes des cellules cancéreuses, la mobilité et l'invasion cellulaire. De la même façon que les MCF10A, nous avons analysé la mobilité en suivi individuel de migration (« single cell tracking ») pendant 48h. Nous observons sur la figure 23 panel A que les cellules CRISPR #3 et #5 ont parcouru une distance totale plus importante que les MDA-MB-231 de 53 et 32% respectivement. Les cellules CRISPR #4 semblent quant à elles similaires aux MDA-MB-231. Nous avons aussi étudié, de façon préliminaire, l'invasion cellulaire après 48h de culture par l'utilisation d'inserts recouverts d'une couche de Matrigel®, comme réalisé précédemment. La figure 23 panel B montre que l'invasion semble être augmentée dans les trois clones CRISPR (#3, #4 et #5), en comparaison avec la lignée parentale MDA-MB-231. Ces résultats nécessitent d'être confirmés avec des effectifs plus importants, mais semblent confirmer des résultats obtenus par notre équipe, avec la technologie shARN (Bon *et al.*, 2016)

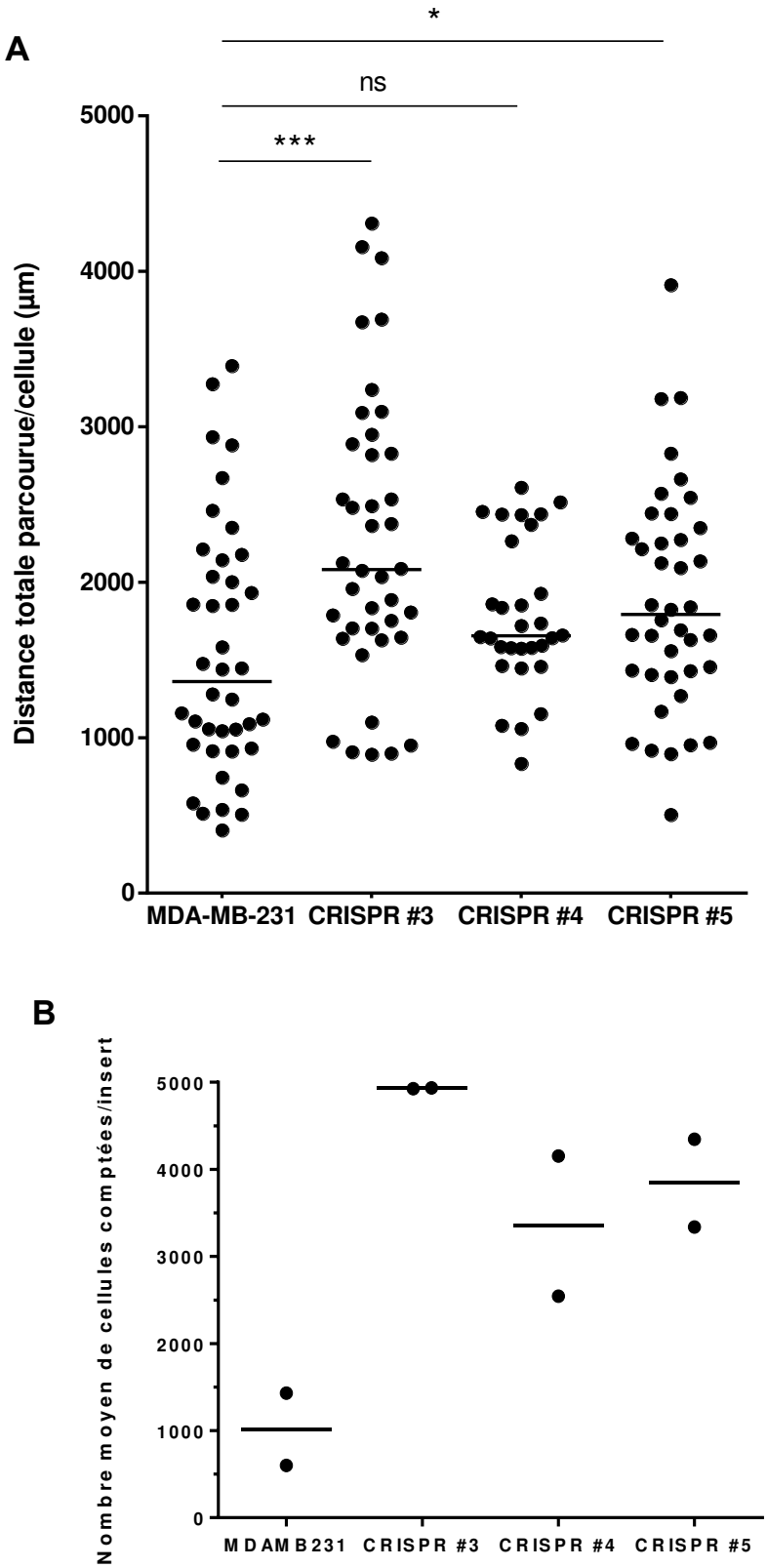


Figure 23 : La réduction d'expression de $Na_V\beta4$ dans les cellules mammaires cancéreuses augmente la mobilité et la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire en 2D.

*A. La mobilité des cellules MDA-MB-231 et CRISPR Na$_V$β4 (#3, #4 et #5) a été étudiée en suivi de migration individuel où la distance cumulée totale parcourue a été mesurée pendant 48h. Un test statistique Mann Whitney a été appliqué (N=30 cellules analysées pour CRISPR #4 et N=40 pour MDA-MB-231, CRISPR #3 et #5 ; *** : p-value = 0,0009 ; * : p-value = 0,045). B. L'invasion cellulaire a été étudiée par l'utilisation d'inserts recouverts de Matrigel®. Les nombres moyens de ces triplicats sont représentés par les points et les barres représentent les médianes sur le graphique (N=2 expériences indépendantes).*

C. La réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires cancéreuses diminue l'expression transcriptionnelle de *CTNNB1* et *CDH1*

Nous avons précédemment montré que la réduction d'expression de Na$_V$β4 diminue l'expression protéique de la β-caténine dans les cellules mammaires non cancéreuses MCF10A. Nous avons aussi montré que l'expression (transcriptionnelle et protéique) de la E-cadhérine est réduite dans ces mêmes conditions. Nous avons alors étudié l'expression transcriptionnelle de *CTNNB1* et *CDH1* dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 afin de comprendre le rôle de Na$_V$β4 dans ces cellules. La figure 24 indique que l'expression transcriptionnelle de *CTNNB1* est réduite d'environ 20% et celle de *CDH1* d'environ 60% dans les cellules issues du clone MDA-MB-231 CRISPR #3 comparées à l'expression des cellules MDA-MB-231 témoin. Ces résultats préliminaires seraient à confirmer par une augmentation des effectifs.

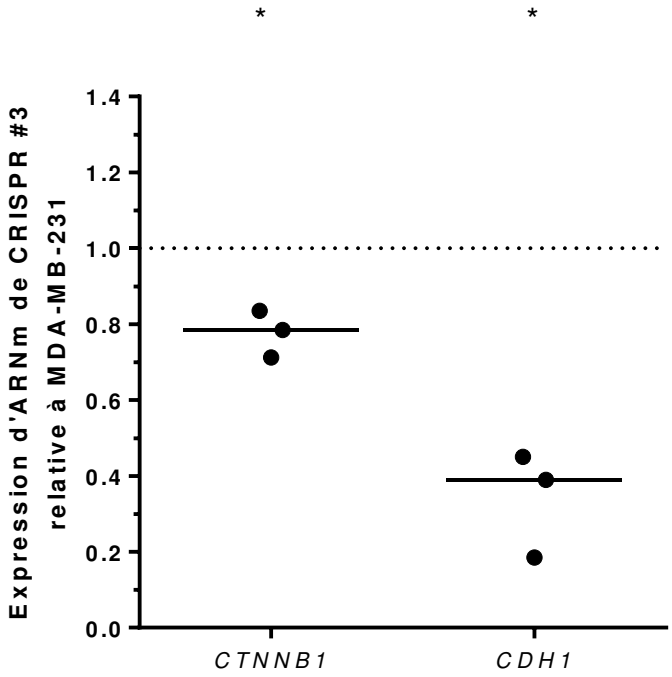


Figure 24 : La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 diminue l'expression de *CTNNB1* et *CDH1*

*L'expression transcriptionnelle des gènes CTNNB1 et CDH1 a été étudiée par RT-qPCR dans les cellules MDA-MB-231 CRISPR #3 et est exprimée de façon relative aux cellules MDA-MB-231 témoins. Les barres indiquent les médianes. Des tests statistiques Mann-Whitney ont été appliqués (N=3 expériences indépendantes ; * : p-value = 0,029).*

III. Lignée de cellules colorectales cancéreuses HCT116-Luc

A. Sélection des lignées cellulaires colorectales cancéreuses HCT116-Luc sous exprimant *SCN4B*

Il a été rapporté que de nombreux tissus cancéreux humains sous-expriment le gène *SCN4B* par rapport aux tissus non cancéreux appariés, c'est le cas dans le cancer mammaire mais également dans le cancer colorectal (Bon *et al.*, 2016). Afin d'étudier l'effet d'une réduction d'expression de *SCN4B* dans le cancer colorectal, nous avons utilisé la technologie de shARN dans la lignée cancéreuse colorectale humaine HCT116-Luc, et nous avons obtenus différentes lignées cellulaires : shNaνβ4 #1, #2 et #R. Nous avons utilisé des cellules possédant le gène de la luciférase (-Luc) afin de poursuivre de futures expérimentations *in vivo.* La figure 25 montre que les cellules shCTL expriment de façon similaire *SCN4B* comparés aux cellules HCT116-Luc. Les cellules shNaνβ4 #1 et #R ne semblent pas différentes des lignées contrôle ou parentale. La lignée shNaνβ4 #2 quant à elle expriment environ 40% moins le gène *SCN4B*.

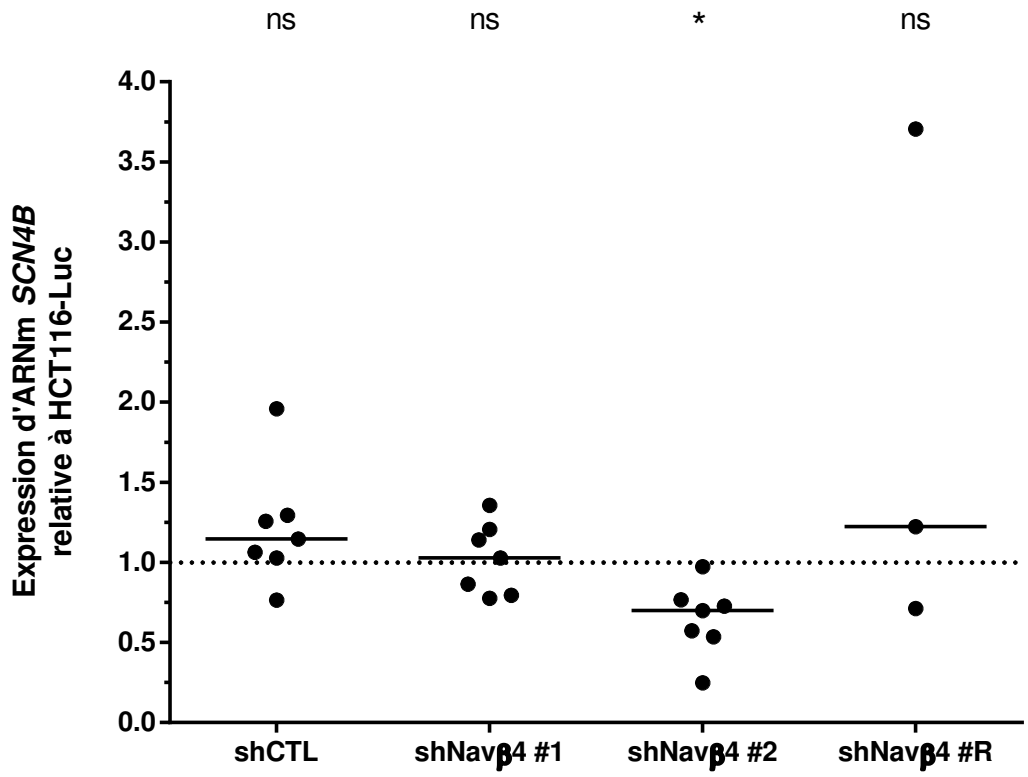


Figure 25 : Inhibition de l'expression de Na$_V$β4 dans les cellules shNa$_V$β4 #2 de HCT116-Luc.

*L'expression transcriptionnelle du gène SCN4B a été étudiée par RT-qPCR dans les lignées cellulaires HCT116-Luc, shCTL et shARN Na$_V$β4 (#1, #2 et #R). La ligne pointillée représente la lignée parentale HCT116-Luc. Des tests statistiques Wilcoxon et Mann-Whitney ont été utilisés ; l'expression d'ARNm des conditions a été comparée à l'expression des cellules de la lignée HCT116-Luc (N=7 expériences indépendantes ; N=3 expériences indépendantes pour la condition shNa$_V$β4 #R ; * : p-value = 0,016).*

B. La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules colorectales cancéreuses augmentent l'invasion cellulaire

Nous avons précédemment observé que la réduction d'expression du gène *SCN4B* dans les cellules cancéreuses mammaires avait un impact sur leurs capacités invasives. Nous avons alors étudié ce paramètre, de la même façon que précédemment (inserts d'invasion), dans les cellules colorectales cancéreuses. La figure 26 montre que les cellules shNavβ4 #2 ont une capacité invasive plus importante de 89 et 97% comparées aux cellules shCTL.

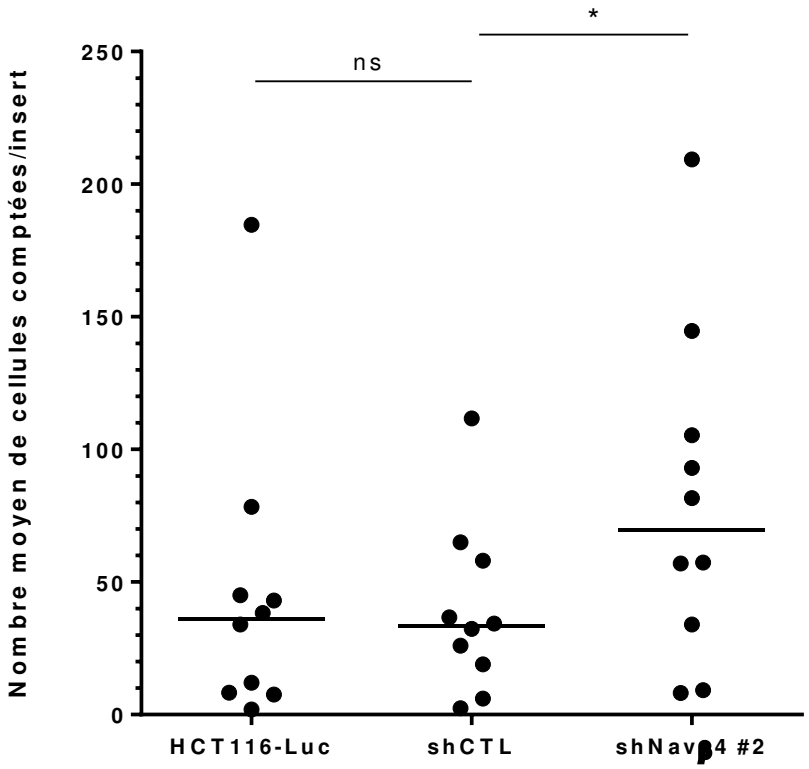


Figure 26 : La réduction de Navβ4 dans les cellules colorectales cancéreuses augmente la capacité de dégradation de la matrice extracellulaire en 2D.

L'invasion cellulaire a été étudiée par l'utilisation d'inserts recouverts de Matrigel® où les cellules ayant envahi l'insert ont été comptés après 48h. Le nombre de noyaux cellulaires sur la face inférieure de la membrane a été compté, après un marquage au DAPI, et chaque expérience a été réalisée en triplicats. Les nombres moyens de ces triplicats sont représentés par les points et les barres représentent

*les médianes sur le graphique. Un test statistique ANOVA suivi d'un test post-hoc Dunn's ont été utilisés (N=10 expériences indépendantes ; * : p-value = 0,047).*

C. La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules colorectales cancéreuses diminue le marqueur épithélial CDH1 et augmente certains marqueurs mésenchymateux

Dans les cellules mammaires non cancéreuses, la réduction d'expression de Naνβ4 entraîne une diminution de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et induit une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine, Vimentine et α-SMA entre autres. Nous avons étudié ces mêmes marqueurs dans les cellules cancéreuses colorectales HCT116-Luc shCTL et shNaνβ4 #2. La figure 27 montre que l'expression du gène *CDH1*, codant pour le marqueur épithélial E-cadhérine, est diminuée d'environ 20%. Au contraire, l'expression des gènes mésenchymateux *SNAI2, TWIST, ZEB1 et VIM* est augmentée de 1,2 ; 2,7 ; 1,2 et 2 fois respectivement.

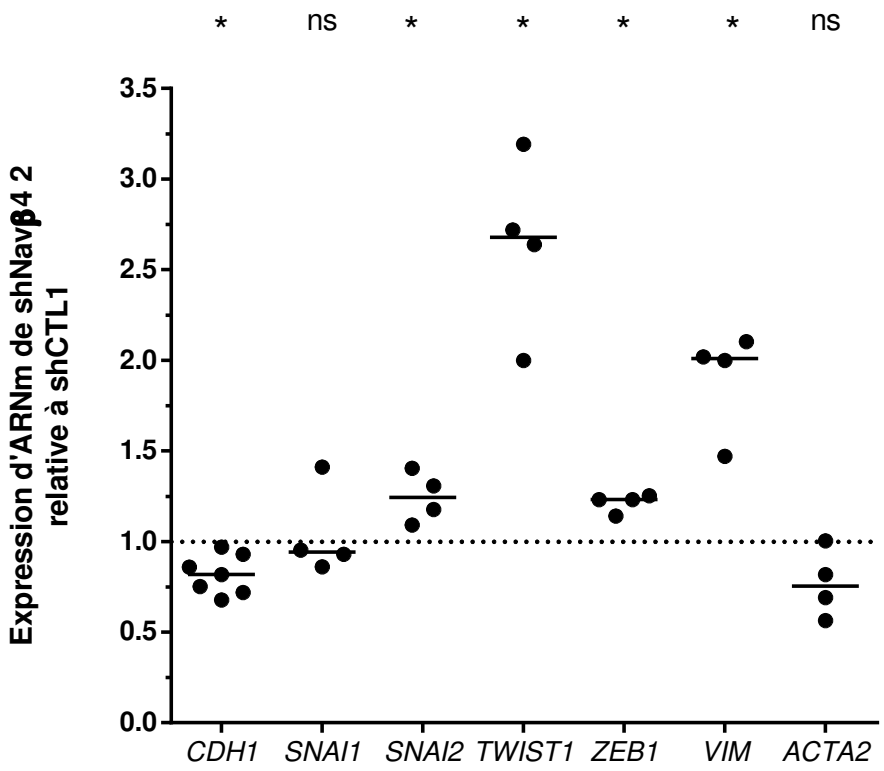


Figure 27 : La réduction d'expression de *SCN4B* dans les cellules colorectales cancéreuses HCT116-Luc shNa$_V$β4 #2 diminue le marqueur épithélial *CDH1* et augmente certains marqueurs mésenchymateux.

*A. L'expression transcriptionnelle des gènes CDH1, SNAI1, SNAI2, TWIST, ZEB1, VIM, ACTA2 a été étudiée par RT-qPCR dans les cellules shNa$_V$β4 #2. La ligne pointillée représente les cellules shCTL. Les barres indiquent les médianes. Des tests statistiques Wilcoxon et Mann-Whitney ont été appliqués (N=7 pour CDH1 et N=4 expériences indépendantes pour les autres conditions ; * : p-value = 0,015).*

IV. Modulation de l'expression de Na$_V$β4 et de l'activité RhoA par la supplémentation en acide docosahexaénoïque (22:6 n-3)

Nous avons montré que la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses induit une désorganisation cellulaire et une favorisation de la transition épithélio-mésenchymateuse. Nous avons montré que sa surexpression expérimentale, par la transfection d'un plasmide codant pour la forme entière de la protéine Na$_V$β4, permettait de diminuer l'expression de certains marqueurs mésenchymateux, et par conséquent semblait prévenir la transition épithélio-mésenchymateuse. Dans les cellules cancéreuses mammaires et coliques, nous avons montré que la réduction d'expression de Na$_V$β4 conduit à une augmentation de l'invasion cellulaire, confirmant ainsi les résultats d'une précédente étude de notre équipe de recherche (Bon *et al.*, 2016). Dans cette même étude, il a été montré que la surexpression de Na$_V$β4 conduit à une inversion du potentiel invasif des cellules cancéreuses mammaires (Bon *et al.*, 2016).

De nombreuses études ont montré que les acides gras polyinsaturés n-3, communément appelé omégas 3, présentent des effets anti-cancéreux, et apportent ainsi une stratégie thérapeutique intéressante en complément de thérapies dites « classiques ». Plusieurs études qui se sont portées dans différents types de cancers (sein, colorectal, prostate et pancréas) ont montré qu'une supplémentation en DHA (acide docosahexaénoïque, 22:6 n-3) conduit à l'apoptose cellulaire, à l'arrêt du cycle cellulaire, diminue la croissance et la prolifération cellulaire et induit un traitement anti-cancéreux plus efficace sans effet secondaire supplémentaire (Bougnoux *et al.*, 2010 ; Jing *et al.*, 2013 ; Li et Ma, 2014 ; Fabian *et al.*, 2015 ; D'Eliseo et Velotti, 2016 ; Song et Kim, 2016 ; Newell *et al.*, 2017 ; Park et Kim, 2017 ; Volpato et Hull, 2018 ; Giordano *et al.,* 2020 ; Yurko-Mauro *et al.*, 2020 ; Newell *et al.,* 2021).

Nous nous sommes alors demandé si la supplémentation en DHA pouvait avoir un effet sur le niveau d'expression de Na$_V$β4. L'expression protéique de Na$_V$β4 des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 a été étudiée par western blot lors d'une supplémentation en DHA (10 µM ; Figure 28). L'expression protéique de Na$_V$β4 est environ deux fois plus importante 72h après supplémentation en DHA à 10 µM qu'en condition témoin (solvant EtOH).

Dans la précédente étude menée par notre équipe, il a été montré que la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 conduit à une augmentation de la RhoGTPase RhoA sous sa forme active (liée au GTP), ce qui pourrait induire l'augmentation d'agressivité cancéreuse constatée (Bon *et al.*, 2016). Il a aussi été montré qu'une surexpression de Na$_V$β4, par le biais de plasmide, dans ces mêmes cellules, diminue la proportion la forme active RhoA-GTP (Bon *et al.*, 2016). Nous avons alors étudié l'activité de la protéine RhoA dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 72h après une supplémentation en DHA (10 µM). La figure 29 indique que la forme active de la RhoGTPase RhoA est significativement diminuée dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 après une supplémentation en DHA.

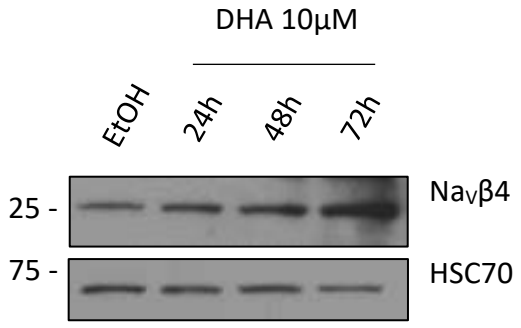


Figure 28 : La supplémentation en DHA augmente l'expression protéique de Na$_V$β4 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

L'expression protéique de Na$_V$β4 des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 a été étudiée par western blot après la supplémentation en DHA à 10 µM selon une cinétique de 24 à 72 h. L'utilisation d'éthanol (EtOH) a été utilisée en condition

contrôle. L'immunomarquage de l'actine HSC70 a été utilisé pour le contrôle des dépôts protéiques (N = 10 expériences indépendantes).

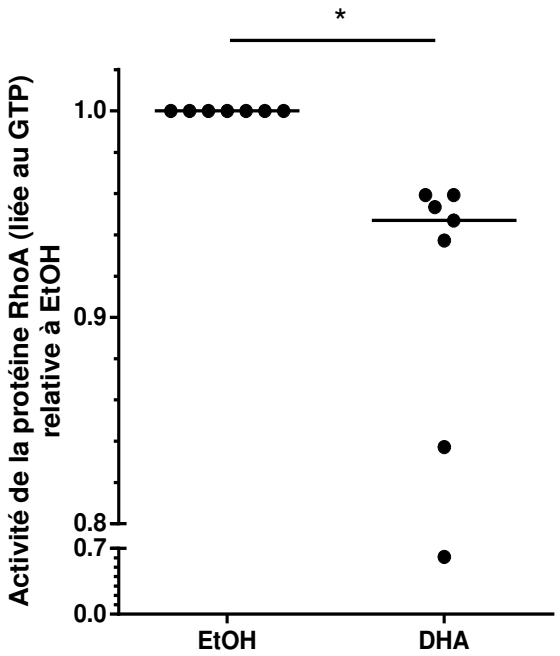


Figure 29 : La supplémentation en DHA diminue l'activité de la RhoGTPase RhoA dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231.

L'activité de la RhoGTPase RhoA des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 a été étudiée en G-LISA après la supplémentation en DHA à 10 µM pendant 72h. L'utilisation d'éthanol (EtOH) a été utilisée en condition contrôle. Un test statistique Wilcoxon a été utilisé (N=7 expériences indépendantes).

Discussion

Na$_V$β4 est une protéine transmembranaire, essentiellement étudiée pour son rôle auxiliaire lorsqu'elle est associée aux sous-unités principales Na$_V$α des canaux sodiques dépendants du voltage (Na$_V$). Ses fonctions, indépendamment des Na$_V$α, sont très peu connues. De façon intéressante, notre équipe a été la première à mettre en évidence le rôle de Na$_V$β4 dans la prévention de la croissance tumorale (Bon *et al*., 2016) et des premiers résultats de notre équipe ont montré que ces effets étaient indépendants des Na$_V$α, bien qu'une régulation de l'expression et de l'activité de Na$_V$1.5 existe dans ces cellules (Bon *et al*., 2016). Ceux-ci ont été confirmés par d'autres études (Gong *et al.,* 2018 ; Sanchez-Sandoval et Gomora, 2019). L'expression de Na$_V$β4 dans les tissus épithéliaux, non cancéreux, qui n'expriment pas les Na$_V$α, pose la question de son ou de ses rôle(s) physiologique(s). Cependant, à ce jour, les rôles physiologiques de Na$_V$β4 dans les tissus épithéliaux sont inconnus. Ainsi, mes travaux de thèse ont consisté à étudier les effets de cette protéine dans une lignée de cellules mammaires humaines non cancéreuses n'exprimant pas de Na$_V$α.

Nous avons essentiellement travaillé sur la lignée cellulaire mammaire non cancéreuse MCF10A pour laquelle nous avons d'abord vérifié l'absence d'expression de la sous-unité α Na$_V$1.5 (Figure 14), qui est la sous-unité formant le pore principalement exprimée dans les cancers du sein (Fraser *et al*., 2005 ; Gillet *et al*., 2009). Ensuite, nous avons confirmé que cette lignée MCF10A exprimait fortement Na$_V$β4 comparée à la lignée cellulaire mammaire cancéreuse MDA-MB-231 (Figure 1 de l'article).

Nous avons créé un modèle cellulaire à partir des cellules MCF10A, le clone Crβ4, dans lequel nous avons inhibé l'expression du gène *SCN4B* de manière stable par la technologie CRISPR/Cas9. Cependant, sur la figure 1 de l'article, nous observons le maintien d'une certaine expression protéique de Na$_V$β4 (d'environ

20%) alors que nous nous aurions initialement souhaité une perte totale d'expression du gène. Dans les études utilisant la technologie CRISPR/Cas9, il est courant de retrouver une faible expression protéique. En effet, en 2019, les auteurs Smits *et al.* ont analysé le niveau de traduction d'environ 130 gènes dans des cellules après traitement par la technologie CRISPR/Cas9 (Smits *et al.,* 2019). Ils ont montré qu'un tiers des protéines étudiées maintenait un niveau d'expression entre 9 et 28%. Ces auteurs ont évoqué l'hypothèse d'un échappement de l'exon modifié conduisant à des isoformes avec des délétions internes, permettant d'expliquer le maintien d'un niveau résiduel d'expression, proche de 20%. Afin de mieux comprendre les raisons de cette élimination incomplète du gène *SCN4B*, il serait intéressant de réaliser un séquençage nucléotidique pour le clone Crβ4.

En dépit de ce niveau d'expression résiduel, nous avons observé, dans les cellules du clone Crβ4 qui présentent une forte inhibition de Na$_V$β4 (80%), d'importants changements morphologiques, observables en culture bidimensionnelle (2D, Figure 1 de l'article) : les cellules sont plus allongées et forment moins de contacts intercellulaires comparées aux cellules MCF10A et le marquage du réseau d'actine F est aussi plus intense. Nous avons fait un constat similaire en culture tridimensionnelle (3D) : la figure 2 de l'article montre une désorganisation cellulaire pour les cellules du clone Crβ4. Les cellules sont de formes irrégulières et allongées, et semblent moins ordonnées entre elles que les cellules MCF10A. Ainsi, les cellules sous-exprimant Na$_V$β4 ne peuvent pas former des structures kystiques épithéliales organisées. Sur les trois semaines de culture 3D, les cellules du clone Crβ4 présentent des structures kystiques plus petites et moins circulaires que celles formées par les cellules MCF10A (Figure 2 de l'article). Ces résultats sur la morphologie sont compatibles avec une perte du phénotype épithélial et une transition mésenchymateuse.

Une caractéristique des cellules mésenchymateuses est leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire, notamment par la libération d'enzymes

protéolytiques telles que les métalloprotéases mais aussi des protéases à sérine, à cystéine ou à aspartate (Kryczka et Boncella, 2017 ; Mitschke *et al.*, 2019). Nous avons alors étudié cette capacité invasive par différentes méthodes. Nous avons observé en culture 3D que les cellules issues du clone Crβ4 ont une très forte tendance à s'échapper des structures cystiques pour migrer au fond des puits de chambres Lab-Tek^{TM}, suggérant une forte capacité à dégrader la matrice Geltrex^{TM} et à s'infiltrer à travers lorsqu'il est dégradé. Cette interprétation a été confirmée par une étude quantitative de la dégradation de la matrice extracellulaire par l'utilisation de DQ^{TM} Gelatin (substrat fluorogénique qui émet de la fluorescence) en culture 3D (Figure 2 de l'article). Si les résultats en culture 3D montrent de façon claire une augmentation de la dégradation de la matrice, nous observons en culture 2D une diminution de l'invasion au travers des pores d'inserts recouverts d'une couche de matrice (figure 15). Ces résultats, d'apparence paradoxale au premier abord, pourraient s'expliquer par le fait que, dans la culture en inserts 2D, les cellules doivent non seulement dégrader la matrice extracellulaire mais aussi se déformer pour passer au travers des pores (de 8 µm). Nous pourrions émettre l'hypothèse que la perte de Naᵥβ4 pourrait augmenter la capacité à dégrader la matrice extracellulaire sans permettre une déformation cellulaire suffisante pour traverser les pores relativement étroits par rapport à la taille des cellules (~75 µm de diamètre). Ces résultats suggèrent que la réduction d'expression de la protéine Naᵥβ4 serait plutôt impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire et moins dans la capacité de déformation cellulaire nécessaire à la traversée des pores. De façon importante, nous devons rappeler que, dans un organisme vivant, les cellules ne migrent pas au travers de pores mais bien dans une matrice extracellulaire. Ainsi, il nous apparait que les résultats en 3D sont beaucoup plus pertinents pour comprendre le rôle de Naᵥβ4 *in vivo*.

Nous avons par la suite cherché à mieux caractériser les mécanismes qui pouvaient avoir pour conséquence à la fois ces changements morphologiques, la désorganisation des cystes et l'augmentation de la dégradation de la matrice

extracellulaire en 3D lorsque l'expression de Na$_V$β4 est réduite. Nous avons focalisé nos recherches sur l'expression des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), un processus important de la transformation cancéreuse (chapitre §Introduction, III, D). L'expression transcriptionnelle et protéique de certains marqueurs épithéliaux et mésenchymateux a été étudiée respectivement en RT-qPCR et en western blot (Figure 4 de l'article). Ces expériences révèlent une perte totale du marqueur épithélial *CDH1*/E-cadhérine dans les cellules du clone Crβ4 comparées aux MCF10A. A l'inverse, une forte expression de *CDH2*/N-cadhérine est identifiée dans les cellules du clone Crβ4 tandis qu'aucune expression n'avait été détectée dans les MCF10A au niveau protéique (Figure 4 de l'article). Ce phénomène, appelé « l'échange des cadhérines », est connu au cours du processus cancéreux (chapitre §Introduction, III, D, 1). La N-cadhérine est un des marqueurs mésenchymateux principaux favorisant le détachement cellulaire et augmentant la motilité cellulaire (chapitre §Introduction, III, D, 1). Les autres gènes et protéines, caractéristiques d'un phénotype mésenchymateux, tels que la *VIM*/vimentine et l'*ACTA2*/α-SMA, sont augmentés dans les cellules du clone Crβ4. Ces résultats sont en accord avec une récente étude montrant que la perte de Na$_V$β4 induite par des microARN augmente l'expression de la N-cadhérine et diminue celle de la E-cadhérine dans le cancer de la prostate (Huang *et al.*, 2020). L'ensemble de ces résultats renforce l'hypothèse selon laquelle la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non cancéreuses induit une transition vers un phénotype mésenchymateux, processus connu pour être associé à une transformation en cellules cancéreuses (chapitre §Introduction, III, D).

Une autre protéine joue un rôle essentiel dans l'acquisition du phénotype mésenchymateux, il s'agit de la β-caténine, protéine pouvant être sous-membranaire, ayant des rôles connus dans le cancer (chapitre §Introduction, III, D, 3). Cette protéine participe notamment à la formation des jonctions adhérentes,

nécessaires pour le maintien de la structure et de la polarité épithéliale. Dans notre modèle Crβ4, l'expression de cette protéine semble être inhibée d'environ 40%, confirmé par l'immunomarquage de cette protéine dans les cultures cellulaires tridimensionnelles, tandis que son expression transcriptionnelle est augmentée de 40%. Nous avons également fait le même constat lors d'une sous-expression transitoire par siARN *SCN4B* dans les MCF10A (Figure 3 de l'article). Ceci pourrait être expliqué par une dégradation augmentée de la protéine β-caténine. Afin d'étayer cette hypothèse, nous avons étudié son expression protéique après avoir bloqué le protéasome, voie de dégradation principale de cette protéine (Aberle *et al.*, 1997 ; Figure 3 de l'article). Nous observons une récupération de son expression protéique plus importante dans les cellules du clone Crβ4 que dans les MCF10A. Cela semble indiquer que la perte de Naᵥβ4 est associée à une dégradation accrue de la β-caténine. Nous avons obtenu un résultat similaire lors de la sous-expression transitoire par siARN *SCN4B* dans les MCF10A lors du blocage du protéasome. Ces résultats sont de prime abord contradictoire avec ce qui est connu. En effet, dans les cellules cancéreuses, où l'expression de Naᵥβ4 est diminuée, l'expression de la β-caténine est augmentée et cette protéine est transloquée vers le noyau. Il est important de rappeler que dans notre étude, notre modèle cellulaire est une lignée cellulaire mammaire non cancéreuse et que les voies de signalisation sont différentes de celles d'une lignée mammaire cancéreuse.

Suite à ce résultat obtenu sur l'augmentation de la dégradation de la β-caténine, nous avons essayé de savoir si les protéines Naᵥβ4 et β-catenine pouvaient être étroitement proches. Par une expérience de PLA, nous avons pu mettre en évidence que ces deux protéines sont distantes de moins de 40Å dans les MCF10A. Cette expérience est difficilement interprétable dans les cellules du clone Crβ4 car celles-ci expriment très faiblement la protéine Naᵥβ4 ; il est donc logique d'observer moins de couples rapprochés dans ces conditions (Figure 16). Cependant, nos résultats sont intéressants dans la mesure où ils mettent en évidence pour la première fois une proximité entre Naᵥβ4 et β-caténine dans les

cellules non cancéreuses. Il serait aussi intéressant de réaliser des expériences de proximité ou de co-immunoprécipitation afin d'étudier une potentielle interaction protéique entre Naᵥβ4 et la E-cadhérine.

Naᵥβ4 et la E-cadhérine sont des protéines transmembranaires, tandis que la β-caténine est une protéine cytosolique sous-membranaire. Il est connu que la E-cadhérine et la β-caténine interagissent physiquement pour la formation et le maintien des jonctions adhérentes (chapitre §Introduction, II, B). Nous pouvons émettre l'hypothèse que la réduction d'expression de Naᵥβ4, qui est associée à la perte de la E-cadhérine (Figure 4 de l'article), pourrait alors provoquer la libération de la β-caténine dans le cytoplasme. Dans les cellules mammaires non cancéreuses (comme les MCF10A), ceci pourrait induire une ubiquitination accrue de cette protéine et un adressage vers le protéasome pour sa dégradation. De ce fait, l'expression de Naᵥβ4 dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses pourrait maintenir l'expression de la E-cadhérine à la membrane, et avoir un rôle protecteur envers la β-caténine, empêchant sa dégradation protéique, du fait de la proximité entre Naᵥβ4 et la β-caténine dans les MCF10A. Nous pouvons aussi suspecter que, dans les cellules non cancéreuses, une autre voie de signalisation entre en jeu pour la surexpression des marqueurs mésenchymateux (notamment les gènes *SNAI2, ZEB, TWIST1, ACTA2* et la protéine vimentine) que nous avons pu observer dans notre étude (Figure 4 de l'article).

Nos résultats sur les cellules issues du clone Crβ4 montrent que la réduction d'expression de Naᵥβ4 induit une transformation cellulaire vers un phénotype mésenchymateux, qui est classiquement observé au cours du processus de cancérisation. Nous nous sommes demandé si cette transition induite par la réduction d'expression de Naᵥβ4 est suffisante pour induire des propriétés des cellules cancéreuses telles qu'une prolifération accrue. Cependant, nos études de prolifération montrent que la réduction d'expression de Naᵥβ4 conduit à une légère baisse de l'incorporation de l'EdU dans les cellules du clone Crβ4, indiquant une

diminution du nombre de cellules en phase S du cycle de prolifération (Figure supplémentaire 1 de l'article). De même, nous avons observé une baisse de la viabilité cellulaire dans les cellules du clone Crβ4 liée, soit à cette baisse de la prolifération, soit à une mortalité accrue des cellules du clone Crβ4.

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats indique que la réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses favorise la TEM mais de façon surprenante inhibe légèrement la prolifération cellulaire. Ces résultats renforcent l'idée que d'autres évènements seraient nécessaires pour contribuer au processus de cancérisation. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que la TEM, induite par la réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses, conduit à des changements morphologiques d'apparence mésenchymateuse. Ces étapes seraient peut-être initiales et nécessaires avant que ne se produise un autre signal afin de poursuivre les premières étapes de la carcinogenèse.

Nous avons interrogé la réversibilité des phénomènes induits grâce à la surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules du clone Crβ4 afin de savoir si nous pouvions obtenir de nouveau des cellules présentant des caractéristiques épithéliales. Les mêmes analyses que précédemment ont donc été effectuées 48h après transfection du plasmide contenant la forme entière de Naᵥβ4 et les tags HIF et GFP (p*SCN4B*) dans les cellules du clone Crβ4. De façon surprenante, nous avons observé que ni l'expression de la E-cadhérine ni celle de la β-caténine n'étaient restituées (Figure 4 de l'article, et figure 18 du manuscrit de thèse), même si l'expression de certains gènes mésenchymateux étaient inhibés (*VIM* et *CDH2*, Figure 4 de l'article). Ceci suggère que le processus de la TEM enclenché par la réduction d'expression de Naᵥβ4 est plus ou moins irréversible. Une autre explication, au fait que l'expression de la β-caténine et de la E-cadhérine ne sont pas restituées, est que la surexpression de Naᵥβ4 n'est pas suffisamment importante pour induire une modification d'expression des gènes ou protéines.

Nous avons également étudié l'effet d'une surexpression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non-cancéreuses MCF10A, mais nous n'avons pas observé de résultats probants hormis la diminution d'expression des gènes *VIM* et *CDH2*. Nous pouvons toutefois nous demander la pertinence de la surexpression dans ces cellules, étant donné que l'expression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires non-cancéreuses MCF10A est déjà élevée.

Nous avons aussi travaillé sur la lignée cancéreuse mammaire, MDA-MB-231, afin d'étudier le rôle d'une réduction d'expression de Na$_V$β4 sur la progression cancéreuse. De la même façon que pour les MCF10A, nous avons utilisé la technologie CRISPR/Cas9 et nous avons obtenu plusieurs clones CRISPR (#3 à #5) ayant des niveaux de sous-expression de Na$_V$β4 différents (Figure 22). Nous avons pu observer que la réduction d'expression de Na$_V$β4 dans les cellules mammaires cancéreuses augmente la mobilité et l'invasion cellulaire (Figure 23). Nous avons aussi pu observer que la réduction d'expression de Na$_V$β4 induit une diminution de l'expression transcriptionnelle de la β-caténine et du marqueur épithélial E-cadhérine (Figure 24). De ce fait, la réduction d'expression de Na$_V$β4 semble rendre les cellules mammaires cancéreuses plus agressives. Dans les cellules cancéreuses colorectales HCT116-Luc, il en est de même : la réduction d'expression de Na$_V$β4 induit une augmentation de l'invasion cellulaire (Figure 26). Nous avons aussi observé que, dans ces cellules, l'expression transcriptionnelle de la E-cadhérine est diminuée et celle de certains marqueurs mésenchymateux est augmentée (Figure 27). Ceci suggère que la transition épithélio-mésenchymateuse serait favorisée dans les cellules cancéreuses colorectales lors d'une réduction d'expression de Na$_V$β4. Ainsi, ces résultats préliminaires sur les cellules cancéreuses mammaires et colorectales viennent confirmer les résultats mis en avant par notre équipe lors de la réduction d'expression de Na$_V$β4 (Bon *et al.*, 2016), soit par l'utilisation de la même technologie (shARN) soit de la technologie CRISPR.

Enfin, une précédente étude de notre laboratoire a montré que la réduction d'expression de Naνβ4 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 conduit à une augmentation de la proportion de la forme active de la RhoGTPase RhoA, forme liée au GTP, ce qui pourrait être lié à la caractéristique invasive des cellules cancéreuses mammaires dépourvues de Naνβ4. Il a également été montré, dans cette étude, que la surexpression de Naνβ4 dans ces cellules induit une diminution de l'activité de la protéine RhoA (Bon *et al.*, 2016). Des études ont montré que la supplémentation en DHA, acide gras polyinsaturés n-3, a un effet anti-cancéreux dans différents types de cancers. Nous avons alors étudié son effet dans les cellules mammaires cancéreuses sur la protéine Naνβ4. Nous avons montré que la supplémentation en DHA augmente l'expression de Naνβ4 et diminue l'activité de la RhoGTPase RhoA dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 (Figures 27 et 28), pouvant alors contribuer à son effet anti-cancéreux.

Conclusions et perspectives

Nous avons montré que la réduction d'expression de Naνβ4 dans la lignée cellulaire mammaire non cancéreuse MCF10A induit un changement de morphologie cellulaire, ainsi qu'une perte de l'organisation épithéliale dans des structures cystiques associée à une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire. Par ailleurs, nous avons montré que la TEM est favorisée lors de la réduction d'expression de Naνβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses, notamment par la perte d'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et un gain d'expression des marqueurs mésenchymateux N-cadhérine et α-SMA, rejoignant de ce fait la récente étude menée sur *SCN4B* dans le cancer de la prostate. Nous avons aussi pu mettre en évidence pour la première fois que les protéines Naνβ4 et la β-caténine sont physiquement proches dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses et que la réduction d'expression de Naνβ4 est associée à une dégradation accrue de la β-caténine. La TEM est un processus assez bien connu et décrit dans un contexte cancéreux. Ces travaux de recherche apportent de nouvelles hypothèses sur la régulation de ce processus via *SCN4B*/Naνβ4, notamment dans les cellules mammaires non cancéreuses.

Par ailleurs, nous avons montré que la réduction d'expression de Naνβ4 dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et colorectales HCT116-Luc induit une augmentation de leurs capacités invasives. Nous avons aussi montré que l'expression de certains marqueurs mésenchymateux, comme *TWIST* et *VIM*, est augmentée lors d'une réduction d'expression de Naνβ4 dans les cellules colorectales cancéreuses HCT116-Luc, suggérant que la réduction d'expression de Naνβ4 induit un phénotype plus agressif dans les cellules cancéreuses.

Ainsi, la réalisation de ce projet de thèse a montré que l'expression de Naνβ4 dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses pourrait maintenir un

phénotype épithélial et que sa réduction d'expression, dans ces mêmes cellules, pourrait être une étape importante associée à la carcinogenèse.

Dans les cellules cancéreuses, la réduction d'expression de Naᵥβ4 confirme l'étude antérieure de notre équipe sur l'induction d'un phénotype plus agressif (Bon *et al.*, 2016).

Toutefois, certaines questions restent en suspens concernant les travaux de ce projet de thèse. C'est le cas de l'élimination incomplète du gène *SCN4B* dans la lignée cellulaire mammaire non cancéreuse MCF10A, il serait alors intéressant de réaliser un séquençage nucléotidique pour le clone Crβ4.

Nous avons aussi pu mettre en évidence que les protéines Naᵥβ4 et β-caténine sont proches dans les MCF10A. La β-caténine et la E-cadhérine sont des protéines qui interagissent entre elles notamment pour le maintien des jonctions adhérentes (chapitre §Introduction, II, B), cela suggère que les protéines Naᵥβ4 et E-cadhérine sont également proches ou interagissent directement entre elles. La réalisation d'expériences de proximité ou de co-immunoprécipitation serait nécessaire afin d'étudier une potentielle interaction protéique entre Naᵥβ4 et la E-cadhérine.

Par ailleurs, nos résultats tendraient à montrer que l'expression de Naᵥβ4, en favorisant le maintien d'un phénotype épithélial, pourrait s'opposer à l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux associé à la carcinogenèse. Une étude antérieure de notre équipe a montré que la surexpression expérimentale de Naᵥβ4, au moyen d'un plasmide, dans les cellules cancéreuses mammaires, bloquait l'invasion cellulaire (Bon *et al.*, 2016). Nous avons développé plusieurs plasmides contenant des isoformes tronquées ou mutées de Naᵥβ4 qui seraient intéressants d'étudier afin d'investiguer si la forme entière de Naᵥβ4 ou seulement la partie intracellulaire par exemple sont suffisantes pour potentiellement réduire la capacité

invasive des cellules mammaires cancéreuses (ou même non cancéreuses). En effet, dans la même étude antérieure de notre équipe, il a été montré que la partie intracellulaire est responsable de la régulation de la migration, de l'invasion et de l'activité RhoA (Bon *et al.*, 2016 ; voir chapitre §IV, D, 4, d).

De plus, au vu de nos résultats, il nous semblerait important d'analyser si la surexpression de Naᵥβ4 dans les cellules issues du clone Crβ4 pourrait induire la reformation de cystes. Cela suggérerait alors que la surexpression de Naᵥβ4 pourrait réverser la désorganisation cellulaire.

D'autres études complémentaires, à moyen terme, mériteraient d'être effectuées, comme celle de l'implication de Naᵥβ4 sur différentes voies de signalisation connues pour être impliquées dans la TEM, telles que celles des récepteurs au TGFβ, Wnt/Frizzled ou certains récepteurs tyrosine-kinase (chapitre §Introduction, III, D, 2 et 3). Il serait également intéressant d'étudier l'expression et l'activité des enzymes protéolytiques comme les protéases à sérine, à cystéine ou à aspartate ou encore les métalloprotéinases matricielles (MMPs), après la réduction d'expression de Naᵥβ4. En effet, les métalloprotéinases matricielles sont un type de protéines caractéristiques de la TEM impliquées dans le clivage de la E-cadhérine, et sont essentielles dans un contexte tumoral pour la dégradation de la matrice extracellulaire et de ce fait faciliter l'invasion cancéreuse (Mitschke *et al.*, 2019).

Nous avons aussi suggéré que la réduction d'expression de Naᵥβ4 dans les cellules mammaires non cancéreuses a un fort impact sur les jonctions intercellulaires, notamment les jonctions adhérentes. Afin de mieux comprendre et préciser le rôle de la protéine Naᵥβ4 dans l'adhésion et la polarité épithéliale, il nous semble important d'étudier l'expression d'autres protéines impliquées dans ces mécanismes, comme par exemple, le complexe formé par les protéines Par3, Par6 (partitioning defective) et PKC atypique (Iden et Collard, 2008 ; Chen et Zhang, 2013), qui peut être régulé par la GTPase RhoA (Iden et Collard, 2008). Une étude antérieure de notre équipe a montré que l'inhibition de Naᵥβ4 dans les cellules

cancéreuses mammaires induit une activité accrue de la protéine RhoA (Bon *et al.*, 2016). Cela pourrait activer une autre protéine, ROCK (Rho-associated protein kinase), qui inhibe alors le complexe formé par Par3, Par6 et PKC atypique (Iden et Collard, 2008). Cette inhibition favoriserait la perte de l'adhésion et de la polarité des cellules cancéreuses.

En outre, nos résultats ont aussi suggéré un rôle inattendu de Na$_V$β4 dans la régulation positive du cycle cellulaire des cellules mammaires non cancéreuses. Pour rendre compte de ces résultats, il faut envisager que Na$_V$β4 pourrait favoriser une durée raccourcie de la phase G0 ou éventuellement un allongement de la durée de la phase S. L'étude de l'expression des kinases dépendantes des cyclines (CDK) ainsi que des cyclines serait alors intéressante à réaliser afin de déterminer quelle étape du cycle cellulaire serait régulée par Na$_V$β4. Il a été montré que les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines jouent un rôle important dans le cancer, notamment sur la prolifération, l'apoptose, et la migration (Gao *et al.*, 2020).

De façon intéressante, nos résultats, indiquant que Na$_V$β4 inhibe la TEM et augmente la capacité prolifératives des cellules indépendamment des Na$_V$α, nous conduisent à nous poser des questions sur le rôle propre de Na$_V$β4 dans un contexte pathologique non tumoral de stress tissulaire. Les conditions de stress cellulaire sont connues pour favoriser la TEM de type 2 et orienter une cicatrisation sous forme de fibrose (chapitre §Introduction, III, D). Il serait intéressant de tester l'hypothèse que certains stress tissulaires inhiberaient l'expression de Na$_V$β4, ce qui pourrait peut-être induire la formation de fibrose cicatricielle. Ainsi, pour de futures perspectives et en dehors du contexte cancéreux, il nous semble intéressant d'étudier l'expression de cette protéine dans divers organes lors d'un stress hypoxique (infarctus du myocarde, hypoxie rénale et en greffe d'organe) qui est un des axes de recherche de notre laboratoire.

Des études en hypoxie pourraient aussi être envisagées pour les cellules cancéreuses MDA-MB-231 et HCT116-Luc, car il est connu que les cellules

cancéreuses au centre d'une tumeur ont des apports en nutriments et oxygène très diminués, ce qui favorise l'activation des différentes voies de signalisation conduisant à l'échappement à la tumeur primaire (Eskiizmir et Özgür, 2018). Les cellules cancéreuses, ayant une expression de Naᵥβ4 diminuée, pourrait alors avoir une capacité invasive accrue comparée à des cellules cancéreuses non hypoxiées. La surexpression de Naᵥβ4 dans ces cellules sous hypoxie pourrait alors diminuer leur capacité invasive.

L'étude de l'effet d'une supplémentation en DHA devrait être poursuivie par l'analyse de l'expression de Naᵥβ4 des cellules cancéreuses colorectales, ainsi que l'analyse de l'activité de la RhoGTPase RhoA. Cette étude pourrait aussi s'étendre sur d'autres types cellulaires cancéreux dans lesquels il a été montré une diminution d'expression de Naᵥβ4. Cette étude pourrait aussi s'étendre sur l'effet d'une supplémentation en DHA sur l'invasivité cancéreuse. Il serait également intéressant d'étudier d'autres éléments qui pourraient stabiliser l'expression de Naᵥβ4, comme par exemple des inhibiteurs des microARN, afin de prévenir la carcinogenèse ou la progression tumorale (chapitre §IV, D, 4, d).

Enfin, les cellules colorectales cancéreuses HCT116-Luc expriment le gène de la luciférase, ce qui permet de réaliser un suivi de ces cellules lors d'études *in vivo*. Ainsi, après avoir confirmé les résultats préliminaires *in vitro* obtenus dans ces travaux de thèse, il serait intéressant d'injecter ces cellules dans le caecum de souris immunodéprimées afin d'étudier la croissance tumorale et le processus de métastases *in vivo*.

L'étude de différents marqueurs mésenchymateux que nous avons pu mettre en évidence dans ces travaux de thèse, tels que la N-cadhérine et la vimentine entre autres, serait intéressante à réaliser sur des biopsies de patients, afin de corréler ces niveaux d'expression à celui de Naᵥβ4 et de confirmer nos résultats obtenus *in vitro.* De ce fait, la réduction d'expression de Naᵥβ4 associée à l'augmentation

d’expression de la N-cadhérine par exemple, pourraient devenir des marqueurs biologiques afin d’identifier des tissus en possible transformation cancéreuse.

Références bibliographiques

Sites web

Institut Curie (curie.fr)

Institut national du cancer (e-cancer.fr)

Ligue contre le cancer (ligue-cancer.net)

Organisation mondiale de la Santé (gco.iarc.fr)

Santé publique France (santepubliquefrance.fr)

UniProt (uniprot.org)

Chapitre de livres

Eskiizmir, G., & Özgür, E. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Microenvironment Induced by Hypoxia. In Y. Basbinar & G. Calıbası-Kocal (Éds.), *Cancer Metastasis*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.78717

Lee, K., & Nelson, C. M. (2012). New Insights into the Regulation of Epithelial–Mesenchymal Transition and Tissue Fibrosis. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 294, p. 171-221). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394305-7.00004-5

Puisieux, A., & Caramel, J. (2013). La transition épithélio-mésenchymateuse, un processus d'adaptation des cellules cancéreuses. In *Correspondances en Onco-Théranostic* (Vol. 2, p. 126-131).

Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2017). *Manuel d'anatomie et de physiologie humaines*. De Boeck supérieur.

Articles scientifiques

Aasen, T., Leithe, E., Graham, S. V., Kameritsch, P., Mayán, M. D., Mesnil, M., Pogoda, K., & Tabernero, A. (2019). Connexins in cancer : Bridging the gap to the clinic. *Oncogene*, *38*(23), 4429-4451. https://doi.org/10.1038/s41388-019-0741-6

Abedini, A., Sayed, C., Carter, L. E., Boerboom, D., & Vanderhyden, B. C. (2020). Non-canonical WNT5a regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the mouse ovarian surface epithelium. *Scientific Reports*, *10*(1), 9695. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66559-9

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO Journal*, *16*(13), 3797-3804. https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3797

Acs, G., Lawton, T. J., Rebbeck, T. R., LiVolsi, V. A., & Zhang, P. J. (2001). Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *American Journal of Clinical Pathology*, *115*(1), 85-98. https://doi.org/10.1309/FDHX-L92R-BATQ-2GE0

Adachi, K., Toyota, M., Sasaki, Y., Yamashita, T., Ishida, S., Ohe-Toyota, M., Maruyama, R., Hinoda, Y., Saito, T., Imai, K., Kudo, R., & Tokino, T. (2004). Identification of SCN3B as a novel p53-inducible proapoptotic gene. *Oncogene*, *23*(47), 7791-7798. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208067

Afrăsânie, V.-A., Marinca, M. V., Alexa-Stratulat, T., Gafton, B., Păduraru, M., Adavidoaiei, A. M., Miron, L., & Rusu, C. (2019). KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer—Practical implications for the clinician. *Radiology and Oncology*, *53*(3), 265-274. https://doi.org/10.2478/raon-2019-0033

Al Saleh, S., Sharaf, L. H., & Luqmani, Y. A. (2011). Signalling pathways involved in endocrine resistance in breast cancer and associations with epithelial to mesenchymal transition (Review). *International Journal of Oncology*, *38*(5), 1197-1217. https://doi.org/10.3892/ijo.2011.942

Aman, T. K., Grieco-Calub, T. M., Chen, C., Rusconi, R., Slat, E. A., Isom, L. L., & Raman, I. M. (2009). Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(7), 2027-2042. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4531-08.2009

Anlar, B., & Gunel-Ozcan, A. (2012). Tenascin-R : Role in the central nervous system. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(9), 1385-1389. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.009

Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G., & Bennasroune, A. (2015). Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion. *Frontiers in Pharmacology*, *6*, 283. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00283

Aronson, N. N., & Yannarell, A. (1975). Effects of membrane ribonuclease and 3'-nucleotidase on the digestion of polyuridylic acid by rat liver plasma membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *413*(1), 135-142. https://doi.org/10.1016/0005-2736(75)90064-4

Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L., & Arteaga, C. L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(47), 36803-36810. https://doi.org/10.1074/jbc.M005912200

Bant, J. S., & Raman, I. M. (2010). Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel beta4 in cultured cerebellar granule neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(27), 12357-12362. https://doi.org/10.1073/pnas.1005633107

Baranwal, S., & Alahari, S. K. (2009). Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *384*(1), 6-11. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.051

Baum, B., & Georgiou, M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of Cell Biology*, *192*(6), 907-917. https://doi.org/10.1083/jcb.201009141

Berx, G., Cleton-Jansen, A. M., Nollet, F., de Leeuw, W. J., van de Vijver, M., Cornelisse, C., & van Roy, F. (1995). E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *The EMBO Journal*, *14*(24), 6107-6115.

Bischof, P., Aplin, J. D., Bentin-Ley, U., Brannstrom, M., Casslen, B., Castrillo, J. L., Classen-Linke, I., Critchley, H. O. D., Devoto, L., D'Hooghe, T., Horcajadas, J. A., Groothuis, P., Ivell, R., Pongrantz, I., Macklon, N. S., Sharkey, A., Vicovac, L., White, J. O., Winterhager, E., … Stavreus-Evers, A. (2006). Implantation of the human embryo : Research lines and models. From the implantation research network « Fruitful ». *Gynecologic and Obstetric Investigation*, *62*(4), 206-216. https://doi.org/10.1159/000094005

Bon, E., Driffort, V., Gradek, F., Martinez-Caceres, C., Anchelin, M., Pelegrin, P., Cayuela, M.-L., Marionneau-Lambot, S., Oullier, T., Guibon, R., Fromont, G., Gutierrez-Pajares, J. L., Domingo, I., Piver, E., Moreau, A., Burlaud-Gaillard, J., Frank, P. G., Chevalier, S., Besson, P., & Roger, S. (2016). *SCN4B* acts as a metastasis-suppressor gene preventing hyperactivation of cell migration in breast cancer. *Nature Communications*, *7*, 13648. https://doi.org/10.1038/ncomms13648

Bougnoux, P., Hajjaji, N., Maheo, K., Couet, C., & Chevalier, S. (2010). Fatty acids and breast cancer : Sensitization to treatments and prevention of metastatic re-growth. *Progress in Lipid Research*, *49*(1), 76-86. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.003

Bouza, A. A., & Isom, L. L. (2018). Voltage-Gated Sodium Channel β Subunits and Their Related Diseases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *246*, 423-450. https://doi.org/10.1007/164_2017_48

Brackenbury, W. J. (2012). Voltage-gated sodium channels and metastatic disease. *Channels (Austin, Tex.)*, *6*(5), 352-361. https://doi.org/10.4161/chan.21910

Brackenbury, W. J., Calhoun, J. D., Chen, C., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., Ranscht, B., & Isom, L. L. (2010). Functional reciprocity between Na+ channel Nav1.6 and beta1 subunits in the coordinated regulation of excitability and neurite outgrowth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(5), 2283-2288. https://doi.org/10.1073/pnas.0909434107

Brackenbury, W. J., Davis, T. H., Chen, C., Slat, E. A., Detrow, M. J., Dickendesher, T. L., Ranscht, B., & Isom, L. L. (2008). Voltage-gated Na+ channel beta1 subunit-mediated neurite outgrowth requires Fyn kinase and contributes to postnatal CNS development in vivo. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *28*(12), 3246-3256. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5446-07.2008

Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2008). Voltage-gated Na+ channels : Potential for beta subunits as therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *12*(9), 1191-1203. https://doi.org/10.1517/14728222.12.9.1191

Brackenbury, W. J., & Isom, L. L. (2011). Na Channel β Subunits : Overachievers of the Ion Channel Family. *Frontiers in Pharmacology*, *2*, 53. https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00053

Brackenbury, W. J., Yuan, Y., O'Malley, H. A., Parent, J. M., & Isom, L. L. (2013). Abnormal neuronal patterning occurs during early postnatal brain development of Scn1b-null mice and precedes hyperexcitability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(3), 1089-1094. https://doi.org/10.1073/pnas.1208767110

Brattain, M. G., Fine, W. D., Khaled, F. M., Thompson, J., & Brattain, D. E. (1981). Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Research*, *41*(5), 1751-1756.

Brisson, L., Gillet, L., Calaghan, S., Besson, P., Le Guennec, J.-Y., Roger, S., & Gore, J. (2011). NaV1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H+ efflux in caveolae. *Oncogene*, *30*(17), 2070-2076. https://doi.org/10.1038/onc.2010.574

Bruner, H. C., & Derksen, P. W. B. (2018). Loss of E-Cadherin-Dependent Cell-Cell Adhesion and the Development and Progression of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(3). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029330

Bryan, R. T., & Tselepis, C. (2010). Cadherin switching and bladder cancer. *The Journal of Urology*, *184*(2), 423-431. https://doi.org/10.1016/j.juro.2010.04.016

Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., & Reeves, W. J. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *Journal of the National Cancer Institute*, *53*(3), 661-674. https://doi.org/10.1093/jnci/53.3.661

Calhoun, J. D., & Isom, L. L. (2014). The role of non-pore-forming β subunits in physiology and pathophysiology of voltage-gated sodium channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *221*, 51-89. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_4

Campbell, T. M., Main, M. J., & Fitzgerald, E. M. (2013). Functional expression of the voltage-gated Na^+-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cell Science*, *126*(Pt 21), 4939-4949. https://doi.org/10.1242/jcs.130013

Cao, H., Xu, E., Liu, H., Wan, L., & Lai, M. (2015). Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis : A system review. *Pathology, Research and Practice*, *211*(8), 557-569. https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.05.010

Casas, E., Kim, J., Bendesky, A., Ohno-Machado, L., Wolfe, C. J., & Yang, J. (2011). Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Research*, *71*(1), 245-254. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2330

Catterall, W. A. (2000). From ionic currents to molecular mechanisms : The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, *26*(1), 13-25. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81133-2

Catterall, William A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-

gated sodium channels. *Pharmacological Reviews*, *57*(4), 397-409. https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4

Cavallaro, U., & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *4*(2), 118-132. https://doi.org/10.1038/nrc1276

Cerda-Troncoso, C., Varas-Godoy, M., & Burgos, P. V. (2021). Pro-Tumoral Functions of Autophagy Receptors in the Modulation of Cancer Progression. *Frontiers in Oncology*, *10*, 619727. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.619727

Chen, A., Beetham, H., Black, M. A., Priya, R., Telford, B. J., Guest, J., Wiggins, G. A. R., Godwin, T. D., Yap, A. S., & Guilford, P. J. (2014). E-cadherin loss alters cytoskeletal organization and adhesion in non-malignant breast cells but is insufficient to induce an epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, *14*, 552. https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-552

Chen, C., Calhoun, J. D., Zhang, Y., Lopez-Santiago, L., Zhou, N., Davis, T. H., Salzer, J. L., & Isom, L. L. (2012). Identification of the cysteine residue responsible for disulfide linkage of Na+ channel α and β2 subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(46), 39061-39069. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397646

Chen, C., Westenbroek, R. E., Xu, X., Edwards, C. A., Sorenson, D. R., Chen, Y., McEwen, D. P., O'Malley, H. A., Bharucha, V., Meadows, L. S., Knudsen, G. A., Vilaythong, A., Noebels, J. L., Saunders, T. L., Scheuer, T., Shrager, P., Catterall, W. A., & Isom, L. L. (2004). Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(16), 4030-4042. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4139-03.2004

Chen, J., & Zhang, M. (2013). The Par3/Par6/aPKC complex and epithelial cell polarity. *Experimental Cell Research*, *319*(10), 1357-1364. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.03.021

Cheng, G. Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C. D., & Wang, L.-H. (2007). Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Research*, *67*(5), 1979-1987. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1479

Chepied, A., Daoud-Omar, Z., Meunier-Balandre, A.-C., Laird, D. W., Mesnil, M., & Defamie, N. (2020). Involvement of the Gap Junction Protein, Connexin43, in the Formation and Function of Invadopodia in the Human U251 Glioblastoma Cell Line. *Cells*, *9*(1). https://doi.org/10.3390/cells9010117

Chilosi, M., Poletti, V., Zamò, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., Cancellieri, A., Maestro, R., Semenzato, G., & Doglioni, C. (2003). Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, *162*(5), 1495-1502. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64282-4

Chioni, A.-M., Brackenbury, W. J., Calhoun, J. D., Isom, L. L., & Djamgoz, M. B. A. (2009). A novel adhesion molecule in human breast cancer cells : Voltage-gated Na+ channel beta1 subunit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(5), 1216-1227. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.11.001

Citi, S., Spadaro, D., Schneider, Y., Stutz, J., & Pulimeno, P. (2011). Regulation of small GTPases at epithelial cell-cell junctions. *Molecular Membrane Biology*, *28*(7-8), 427-444. https://doi.org/10.3109/09687688.2011.603101

Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschueren, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D., & van Roy, F. (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Molecular Cell*, *7*(6), 1267-1278. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00260-x

Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., & Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions : The roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *The Journal of Cell Biology*, *163*(4), 847-857. https://doi.org/10.1083/jcb.200308162

Cunha, G. R., Hayward, S. W., & Wang, Y. Z. (2002). Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *70*(9-10), 473-485. https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700902.x

Dai, W., Zhou, J., Wang, H., Zhang, M., Yang, X., & Song, W. (2020). MiR-424-5p promotes the proliferation and metastasis of colorectal cancer by directly targeting *SCN4B*. *Pathology - Research and Practice*, *216*(1), 152731. https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152731

Davis, T. H., Chen, C., & Isom, L. L. (2004). Sodium channel beta1 subunits promote neurite outgrowth in cerebellar granule neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(49), 51424-51432. https://doi.org/10.1074/jbc.M410830200

De Craene, B., & Berx, G. (2013). Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(2), 97-110. https://doi.org/10.1038/nrc3447

De Leeuw, W. J., Berx, G., Vos, C. B., Peterse, J. L., Van de Vijver, M. J., Litvinov, S., Van Roy, F., Cornelisse, C. J., & Cleton-Jansen, A. M. (1997). Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *The Journal of Pathology*, *183*(4), 404-411. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199712)183:4<404::AID-PATH1148>3.0.CO;2-9

D'Eliseo, D., & Velotti, F. (2016). Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity : Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine*, *5*(2). https://doi.org/10.3390/jcm5020015

Deschênes, I., Armoundas, A. A., Jones, S. P., & Tomaselli, G. F. (2008). Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *45*(3), 336-346. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.05.001

Dietrich, C., Scherwat, J., Faust, D., & Oesch, F. (2002). Subcellular localization of beta-catenin is regulated by cell density. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *292*(1), 195-199. https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6625

Diss, J. K. J., Fraser, S. P., Walker, M. M., Patel, A., Latchman, D. S., & Djamgoz, M. B. A. (2008). Beta-subunits of voltage-gated sodium channels in human prostate cancer : Quantitative in vitro and in vivo analyses of mRNA expression. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, *11*(4), 325-333. https://doi.org/10.1038/sj.pcan.4501012

Eckert, M. A., Lwin, T. M., Chang, A. T., Kim, J., Danis, E., Ohno-Machado, L., & Yang, J. (2011). Twist1-induced invadopodia formation promotes tumor metastasis. *Cancer Cell*, *19*(3), 372-386. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.036

Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., & Martin, P. (2000). Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *Journal of Cell Science*, *113 (Pt 13)*, 2455-2462.

Edelman, G. M., Gallin, W. J., Delouvée, A., Cunningham, B. A., & Thiery, J. P. (1983). Early epochal maps of two different cell adhesion molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(14), 4384-4388. https://doi.org/10.1073/pnas.80.14.4384

Edme, N., Downward, J., Thiery, J.-P., & Boyer, B. (2002). Ras induces NBT-II epithelial cell scattering through the coordinate activities of Rac and MAPK pathways. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 12), 2591-2601.

Eger, A., Aigner, K., Sonderegger, S., Dampier, B., Oehler, S., Schreiber, M., Berx, G., Cano, A., Beug, H., & Foisner, R. (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene*, *24*(14), 2375-2385. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208429

Elliott, A. A., & Elliott, J. R. (1993). Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *The Journal of Physiology*, *463*, 39-56. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019583

Fabian, C. J., Kimler, B. F., & Hursting, S. D. (2015). Omega-3 fatty acids for breast cancer prevention and survivorship. *Breast Cancer Research: BCR*, *17*, 62. https://doi.org/10.1186/s13058-015-0571-6

Farber, E. (1984). The multistep nature of cancer development. *Cancer Research*, *44*(10), 4217-4223.

Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T. C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R. F., Vahdat, L. T., Altorki, N. K., Mittal, V., & Gao, D. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature*, *527*(7579), 472-476. https://doi.org/10.1038/nature15748

Fraser, S. P., Diss, J. K. J., Chioni, A.-M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyutürk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, M. T., Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., … Djamgoz, M. B. A. (2005). Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(15), 5381-5389. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-0327

Gao, X., Leone, G. W., & Wang, H. (2020). Cyclin D-CDK4/6 functions in cancer. *Advances in Cancer Research*, *148*, 147-169. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2020.02.002

Gavert, N., & Ben-Ze'ev, A. (2007). Beta-Catenin signaling in biological control and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(4), 820-828. https://doi.org/10.1002/jcb.21505

Gersbacher, M. T., Kim, D. Y., Bhattacharyya, R., & Kovacs, D. M. (2010). Identification of BACE1 cleavage sites in human voltage-gated sodium channel beta 2 subunit. *Molecular Neurodegeneration*, *5*, 61. https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-61

Gilchrist, J., Das, S., Van Petegem, F., & Bosmans, F. (2013). Crystallographic insights into sodium-channel modulation by the β4 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51), E5016-5024. https://doi.org/10.1073/pnas.1314557110

Gilles, C., Polette, M., Piette, J., Delvigne, A. C., Thompson, E. W., Foidart, J. M., & Birembaut, P. (1996). Vimentin expression in cervical carcinomas : Association with

invasive and migratory potential. *The Journal of Pathology*, *180*(2), 175-180. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199610)180:2<175::AID-PATH630>3.0.CO;2-G

Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G., & Le Guennec, J.-Y. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(13), 8680-8691. https://doi.org/10.1074/jbc.M806891200

Giordano, C., Plastina, P., Barone, I., Catalano, S., & Bonofiglio, D. (2020). n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Amides : New Avenues in the Prevention and Treatment of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7). https://doi.org/10.3390/ijms21072279

Gong, Y., Yang, J., Wu, W., Liu, F., Su, A., Li, Z., Zhu, J., & Wei, T. (2018). Preserved *SCN4B* expression is an independent indicator of favorable recurrence-free survival in classical papillary thyroid cancer. *PloS One*, *13*(5), e0197007. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197007

Gort, E. H., van Haaften, G., Verlaan, I., Groot, A. J., Plasterk, R. H. A., Shvarts, A., Suijkerbuijk, K. P. M., van Laar, T., van der Wall, E., Raman, V., van Diest, P. J., Tijsterman, M., & Vooijs, M. (2008). The TWIST1 oncogene is a direct target of hypoxia-inducible factor-2alpha. *Oncogene*, *27*(11), 1501-1510. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210795

Green, K. J., Jaiganesh, A., & Broussard, J. A. (2019). Desmosomes : Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Research*, *8*. https://doi.org/10.12688/f1000research.20942.1

Grieco, T. M., Malhotra, J. D., Chen, C., Isom, L. L., & Raman, I. M. (2005). Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel beta4 as a mechanism for resurgent sodium current. *Neuron*, *45*(2), 233-244. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.035

Gunasinghe, N. P. A. D., Wells, A., Thompson, E. W., & Hugo, H. J. (2012). Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *31*(3-4), 469-478. https://doi.org/10.1007/s10555-012-9377-5

Hajra, K. M., Chen, D. Y.-S., & Fearon, E. R. (2002). The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer. *Cancer Research*, *62*(6), 1613-1618.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan, Douglas, & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hay, E. D. (1990). Role of cell-matrix contacts in cell migration and epithelial-mesenchymal transformation. *Cell Differentiation and Development: The Official Journal of the International Society of Developmental Biologists*, *32*(3), 367-375. https://doi.org/10.1016/0922-3371(90)90052-x

Hazan, R. B., Qiao, R., Keren, R., Badano, I., & Suyama, K. (2004). Cadherin switch in tumor progression. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1014*, 155-163. https://doi.org/10.1196/annals.1294.016

Heatley, M., Whiteside, C., Maxwell, P., & Toner, P. (1993). Vimentin expression in benign and malignant breast epithelium. *Journal of Clinical Pathology*, *46*(5), 441-445. https://doi.org/10.1136/jcp.46.5.441

Heredia-Soto, V., López-Guerrero, J. A., Redondo, A., & Mendiola, M. (2020). The hallmarks of ovarian cancer : Focus on angiogenesis and micro-environment and new models for their characterisation. *EJC Supplements: EJC: Official Journal of EORTC, European Organization for Research and Treatment of Cancer ... [et Al.]*, *15*, 49-55. https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2019.11.003

Hernandez-Plata, E., Ortiz, C. S., Marquina-Castillo, B., Medina-Martinez, I., Alfaro, A., Berumen, J., Rivera, M., & Gomora, J. C. (2012). Overexpression of NaV 1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer.

International Journal of Cancer, *130*(9), 2013-2023. https://doi.org/10.1002/ijc.26210

Huang, H., Qing, X.-Y., Zhou, Q., Li, H.-D., & Hu, Z.-Y. (2020). Silencing of microRNA-3175 represses cell proliferation and invasion in prostate cancer by targeting the potential tumor-suppressor *SCN4B*. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*. https://doi.org/10.1002/kjm2.12292

Huang, R. Y.-J., Guilford, P., & Thiery, J. P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, *125*(Pt 19), 4417-4422. https://doi.org/10.1242/jcs.099697

Huszno, J., Kołosza, Z., & Grzybowska, E. (2018). BRCA1 mutation in breast cancer patients : Analysis of prognostic factors and survival. *Oncology Letters*. https://doi.org/10.3892/ol.2018.9770

Iden, S., & Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(11), 846-859. https://doi.org/10.1038/nrm2521

Ishigaki, Y., Nakamura, Y., Takehara, T., Shimasaki, T., Tatsuno, T., Takano, F., Ueda, Y., Motoo, Y., Takegami, T., Nakagawa, H., Kuwabata, S., Nemoto, N., Tomosugi, N., & Miyazawa, S. (2011). Scanning electron microscopy with an ionic liquid reveals the loss of mitotic protrusions of cells during the epithelial-mesenchymal transition. *Microscopy Research and Technique*, *74*(11), 1024-1031. https://doi.org/10.1002/jemt.20989

Isom, L. L., & Catterall, W. A. (1996). Na+ channel subunits and Ig domains. *Nature*, *383*(6598), 307-308. https://doi.org/10.1038/383307b0

Isom, L. L., De Jongh, K. S., & Catterall, W. A. (1994). Auxiliary subunits of voltage-gated ion channels. *Neuron*, *12*(6), 1183-1194. https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90436-7

Isom, L. L., De Jongh, K. S., Patton, D. E., Reber, B. F., Offord, J., Charbonneau, H., Walsh, K., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). Primary structure and functional

expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5058), 839-842. https://doi.org/10.1126/science.1375395

Isom, L. L., Ragsdale, D. S., De Jongh, K. S., Westenbroek, R. E., Reber, B. F., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif. *Cell*, *83*(3), 433-442. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90121-3

Isom, Lori L. (2002). The role of sodium channels in cell adhesion. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, *7*, 12-23. https://doi.org/10.2741/isom

Itoh, M., & Bissell, M. J. (2003). The organization of tight junctions in epithelia : Implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, *8*(4), 449-462. https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000017431.45314.07

Ivanova, L., Butt, M. J., & Matsell, D. G. (2008). Mesenchymal transition in kidney collecting duct epithelial cells. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, *294*(5), F1238-1248. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00326.2007

Jansson, K. H., Castillo, D. G., Morris, J. W., Boggs, M. E., Czymmek, K. J., Adams, E. L., Schramm, L. P., & Sikes, R. A. (2014). Identification of beta-2 as a key cell adhesion molecule in PCa cell neurotropic behavior : A novel ex vivo and biophysical approach. *PloS One*, *9*(6), e98408. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098408

Jansson, K. H., Lynch, J. E., Lepori-Bui, N., Czymmek, K. J., Duncan, R. L., & Sikes, R. A. (2012). Overexpression of the VSSC-associated CAM, β-2, enhances LNCaP cell metastasis associated behavior. *The Prostate*, *72*(10), 1080-1092. https://doi.org/10.1002/pros.21512

Jensen, H. H., Pedersen, G. A., Morgen, J. J., Parsons, M., Pedersen, S. F., & Nejsum, L. N. (2019). The Na+ /H+ exchanger NHE1 localizes as clusters to cryptic lamellipodia and accelerates collective epithelial cell migration. *The Journal of Physiology*, *597*(3), 849-867. https://doi.org/10.1113/JP277383

Jing, K., Wu, T., & Lim, K. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, *13*(8), 1162-1177. https://doi.org/10.2174/18715206113139990319

Jo, M., Lester, R. D., Montel, V., Eastman, B., Takimoto, S., & Gonias, S. L. (2009). Reversibility of epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced in breast cancer cells by activation of urokinase receptor-dependent cell signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(34), 22825-22833. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.023960

Johnson, D., Montpetit, M. L., Stocker, P. J., & Bennett, E. S. (2004). The sialic acid component of the beta1 subunit modulates voltage-gated sodium channel function. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(43), 44303-44310. https://doi.org/10.1074/jbc.M408900200

Kalluri, R., & Neilson, E. G. (2003). Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1776-1784. https://doi.org/10.1172/JCI20530

Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1420-1428. https://doi.org/10.1172/JCI39104

Karamanou, K., Franchi, M., Vynios, D., & Brézillon, S. (2020). Epithelial-to-mesenchymal transition and invadopodia markers in breast cancer : Lumican a key regulator. *Seminars in Cancer Biology*, *62*, 125-133. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.003

Kazarinova-Noyes, K., Malhotra, J. D., McEwen, D. P., Mattei, L. N., Berglund, E. O., Ranscht, B., Levinson, S. R., Schachner, M., Shrager, P., Isom, L. L., & Xiao, Z. C. (2001). Contactin associates with Na+ channels and increases their functional expression. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *21*(19), 7517-7525.

Kazen-Gillespie, K. A., Ragsdale, D. S., D'Andrea, M. R., Mattei, L. N., Rogers, K. E., & Isom, L. L. (2000). Cloning, localization, and functional expression of sodium

channel beta1A subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(2), 1079-1088. https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1079

Keely, P. J., Westwick, J. K., Whitehead, I. P., Der, C. J., & Parise, L. V. (1997). Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature*, *390*(6660), 632-636. https://doi.org/10.1038/37656

Kida, Y., Asahina, K., Teraoka, H., Gitelman, I., & Sato, T. (2007). Twist relates to tubular epithelial-mesenchymal transition and interstitial fibrogenesis in the obstructed kidney. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, *55*(7), 661-673. https://doi.org/10.1369/jhc.6A7157.2007

Kim, D. Y., Carey, B. W., Wang, H., Ingano, L. A. M., Binshtok, A. M., Wertz, M. H., Pettingell, W. H., He, P., Lee, V. M.-Y., Woolf, C. J., & Kovacs, D. M. (2007). BACE1 regulates voltage-gated sodium channels and neuronal activity. *Nature Cell Biology*, *9*(7), 755-764. https://doi.org/10.1038/ncb1602

Kim, D. Y., Ingano, L. A. M., Carey, B. W., Pettingell, W. H., & Kovacs, D. M. (2005). Presenilin/gamma-secretase-mediated cleavage of the voltage-gated sodium channel beta2-subunit regulates cell adhesion and migration. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 23251-23261. https://doi.org/10.1074/jbc.M412938200

Kleeff, J., Friess, H., Berberat, P. O., Martignoni, M. E., Z'graggen, K., & Büchler, M. W. (2000). Pancreatic cancer—New aspects of molecular biology research. *Swiss Surgery = Schweizer Chirurgie = Chirurgie Suisse = Chirurgia Svizzera*, *6*(5), 231-234. https://doi.org/10.1024/1023-9332.6.5.231

Ko, S.-H., Lenkowski, P. W., Lee, H. C., Mounsey, J. P., & Patel, M. K. (2005). Modulation of Na(v)1.5 by beta1—And beta3-subunit co-expression in mammalian cells. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*, *449*(4), 403-412. https://doi.org/10.1007/s00424-004-1348-4

Kruger, L. C., & Isom, L. L. (2016). Voltage-Gated Na+ Channels : Not Just for Conduction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(6). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029264

Kryczka, J., & Boncela, J. (2017). Proteases Revisited : Roles and Therapeutic Implications in Fibrosis. *Mediators of Inflammation*, *2017*, 2570154. https://doi.org/10.1155/2017/2570154

Laedermann, C. J., Syam, N., Pertin, M., Decosterd, I., & Abriel, H. (2013). B1- and β3-voltage-gated sodium channel subunits modulate cell surface expression and glycosylation of Nav1.7 in HEK293 cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 137. https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00137

Lanigan, F., O'Connor, D., Martin, F., & Gallagher, W. M. (2007). Molecular links between mammary gland development and breast cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *64*(24), 3159-3184. https://doi.org/10.1007/s00018-007-7386-2

Lasry, A., Zinger, A., & Ben-Neriah, Y. (2016). Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature Immunology*, *17*(3), 230-240. https://doi.org/10.1038/ni.3384

Laukoetter, M. G., Bruewer, M., & Nusrat, A. (2006). Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex. *Current Opinion in Gastroenterology*, *22*(2), 85-89. https://doi.org/10.1097/01.mog.0000203864.48255.4f

Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition : New insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, *172*(7), 973-981. https://doi.org/10.1083/jcb.200601018

Lee, K., Gjorevski, N., Boghaert, E., Radisky, D. C., & Nelson, C. M. (2011). Snail1, Snail2, and E47 promote mammary epithelial branching morphogenesis. *The EMBO Journal*, *30*(13), 2662-2674. https://doi.org/10.1038/emboj.2011.159

Li, G., Su, Q., Liu, H., Wang, D., Zhang, W., Lu, Z., Chen, Y., Huang, X., Li, W., Zhang, C., He, Y., Fu, L., & Bi, J. (2018). Frizzled7 Promotes Epithelial-to-mesenchymal Transition and Stemness Via Activating Canonical Wnt/β-catenin Pathway in Gastric Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *14*(3), 280-293. https://doi.org/10.7150/ijbs.23756

Liao, T.-T., & Yang, M.-H. (2017). Revisiting epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis : The connection between epithelial plasticity and stemness. *Molecular Oncology*, *11*(7), 792-804. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12096

Liu, Jiajie, & Ma, D. W. L. (2014). The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in the prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*, *6*(11), 5184-5223. https://doi.org/10.3390/nu6115184

Liu, Jun, Uygur, B., Zhang, Z., Shao, L., Romero, D., Vary, C., Ding, Q., & Wu, W.-S. (2010). Slug inhibits proliferation of human prostate cancer cells via downregulation of cyclin D1 expression. *The Prostate*, *70*(16), 1768-1777. https://doi.org/10.1002/pros.21213

Liu, P., Wakamiya, M., Shea, M. J., Albrecht, U., Behringer, R. R., & Bradley, A. (1999). Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nature Genetics*, *22*(4), 361-365. https://doi.org/10.1038/11932

Lo, H.-W., Hsu, S.-C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.-Y., Wei, Y., Abbruzzese, J. L., Hortobagyi, G. N., & Hung, M.-C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Research*, *67*(19), 9066-9076. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0575

Lo, W.-L., Donermeyer, D. L., & Allen, P. M. (2012). A voltage-gated sodium channel is essential for the positive selection of CD4(+) T cells. *Nature Immunology*, *13*(9), 880-887. https://doi.org/10.1038/ni.2379

Locascio, A., & Nieto, M. A. (2001). Cell movements during vertebrate development : Integrated tissue behaviour versus individual cell migration. *Current Opinion in Genetics & Development*, *11*(4), 464-469. https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00218-5

Lochter, A., Galosy, S., Muschler, J., Freedman, N., Werb, Z., & Bissell, M. J. (1997). Matrix metalloproteinase stromelysin-1 triggers a cascade of molecular alterations that leads to stable epithelial-to-mesenchymal conversion and a premalignant

phenotype in mammary epithelial cells. *The Journal of Cell Biology*, *139*(7), 1861-1872. https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1861

Lopez-Charcas, O., Pukkanasut, P., Velu, S. E., Brackenbury, W. J., Hales, T. G., Besson, P., Gomora, J. C., & Roger, S. (2021). Pharmacological and nutritional targeting of voltage-gated sodium channels in the treatment of cancers. *IScience*, *24*(4), 102270. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102270

Lopez-Santiago, L. F., Brackenbury, W. J., Chen, C., & Isom, L. L. (2011). Na+ channel Scn1b gene regulates dorsal root ganglion nociceptor excitability in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(26), 22913-22923. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.242370

Lopez-Santiago, L. F., Pertin, M., Morisod, X., Chen, C., Hong, S., Wiley, J., Decosterd, I., & Isom, L. L. (2006). Sodium channel beta2 subunits regulate tetrodotoxin-sensitive sodium channels in small dorsal root ganglion neurons and modulate the response to pain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(30), 7984-7994. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2211-06.2006

Maier, S. K. G., Westenbroek, R. E., McCormick, K. A., Curtis, R., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2004). Distinct subcellular localization of different sodium channel alpha and beta subunits in single ventricular myocytes from mouse heart. *Circulation*, *109*(11), 1421-1427. https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121421.61896.24

Malhotra, J. D., Kazen-Gillespie, K., Hortsch, M., & Isom, L. L. (2000). Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(15), 11383-11388. https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11383

Malhotra, Jyoti D., Koopmann, M. C., Kazen-Gillespie, K. A., Fettman, N., Hortsch, M., & Isom, L. L. (2002). Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(29), 26681-26688. https://doi.org/10.1074/jbc.M202354200

Malhotra, Jyoti D., Thyagarajan, V., Chen, C., & Isom, L. L. (2004). Tyrosine-phosphorylated and nonphosphorylated sodium channel beta1 subunits are differentially localized in cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(39), 40748-40754. https://doi.org/10.1074/jbc.M407243200

Marionneau, C., Carrasquillo, Y., Norris, A. J., Townsend, R. R., Isom, L. L., Link, A. J., & Nerbonne, J. M. (2012). The sodium channel accessory subunit Navβ1 regulates neuronal excitability through modulation of repolarizing voltage-gated K^+ channels. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(17), 5716-5727. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6450-11.2012

Marotti, J. D., Collins, L. C., Hu, R., & Tamimi, R. M. (2010). Estrogen receptor-beta expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype : Results from the Nurses' Health Study. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *23*(2), 197-204. https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.158

Masugi, Y., Yamazaki, K., Emoto, K., Effendi, K., Tsujikawa, H., Kitago, M., Itano, O., Kitagawa, Y., & Sakamoto, M. (2015). Upregulation of integrin β4 promotes epithelial-mesenchymal transition and is a novel prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *95*(3), 308-319. https://doi.org/10.1038/labinvest.2014.166

McCormick, K. A., Isom, L. L., Ragsdale, D., Smith, D., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). Molecular determinants of Na+ channel function in the extracellular domain of the beta1 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(7), 3954-3962. https://doi.org/10.1074/jbc.273.7.3954

McEwen, D. P., Chen, C., Meadows, L. S., Lopez-Santiago, L., & Isom, L. L. (2009). The voltage-gated Na+ channel beta3 subunit does not mediate trans homophilic cell adhesion or associate with the cell adhesion molecule contactin. *Neuroscience Letters*, *462*(3), 272-275. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.07.020

McEwen, D. P., & Isom, L. L. (2004). Heterophilic interactions of sodium channel beta1 subunits with axonal and glial cell adhesion molecules. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(50), 52744-52752. https://doi.org/10.1074/jbc.M405990200

McEwen, D. P., Meadows, L. S., Chen, C., Thyagarajan, V., & Isom, L. L. (2004). Sodium Channel β1 Subunit-mediated Modulation of Na $_{v}$ 1.2 Currents and Cell Surface Density Is Dependent on Interactions with Contactin and Ankyrin. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(16), 16044-16049. https://doi.org/10.1074/jbc.M400856200

Meadows, L., Malhotra, J. D., Stetzer, A., Isom, L. L., & Ragsdale, D. S. (2001). The intracellular segment of the sodium channel beta 1 subunit is required for its efficient association with the channel alpha subunit. *Journal of Neurochemistry*, *76*(6), 1871-1878. https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00192.x

Meadows, L. S., Malhotra, J., Loukas, A., Thyagarajan, V., Kazen-Gillespie, K. A., Koopman, M. C., Kriegler, S., Isom, L. L., & Ragsdale, D. S. (2002). Functional and biochemical analysis of a sodium channel beta1 subunit mutation responsible for generalized epilepsy with febrile seizures plus type 1. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(24), 10699-10709.

Medeiros-Domingo, A., Kaku, T., Tester, D. J., Iturralde-Torres, P., Itty, A., Ye, B., Valdivia, C., Ueda, K., Canizales-Quinteros, S., Tusié-Luna, M. T., Makielski, J. C., & Ackerman, M. J. (2007). *SCN4B*-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation*, *116*(2), 134-142. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.659086

Midwood, K. S., Hussenet, T., Langlois, B., & Orend, G. (2011). Advances in tenascin-C biology. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *68*(19), 3175-3199. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0783-6

Mitschke, J., Burk, U. C., & Reinheckel, T. (2019). The role of proteases in epithelial-to-mesenchymal cell transitions in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, *38*(3), 431-444. https://doi.org/10.1007/s10555-019-09808-2

Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y., Aihara, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., & Nakamura, Y. (1998). Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Research*, *58*(12), 2524-2527.

Moasser, M. M. (2007). The oncogene HER2 : Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, *26*(45), 6469-6487. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477

Monaghan, P., Clarke, C., Perusinghe, N. P., Moss, D. W., Chen, X. Y., & Evans, W. H. (1996). Gap junction distribution and connexin expression in human breast. *Experimental Cell Research*, *223*(1), 29-38. https://doi.org/10.1006/excr.1996.0055

Morgan, K., Stevens, E. B., Shah, B., Cox, P. J., Dixon, A. K., Lee, K., Pinnock, R. D., Hughes, J., Richardson, P. J., Mizuguchi, K., & Jackson, A. P. (2000). beta 3 : An additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(5), 2308-2313. https://doi.org/10.1073/pnas.030362197

Morin, P. J. (1999). Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *21*(12), 1021-1030. https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199912)22:1<1021::AID-BIES6>3.0.CO;2-P

Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, N.Y.)*, *275*(5307), 1787-1790. https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1787

Nakagawa, S., & Takeichi, M. (1998). Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression. *Development (Cambridge, England)*, *125*(15), 2963-2971.

Nakajima, Y., Mironov, V., Yamagishi, T., Nakamura, H., & Markwald, R. R. (1997). Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of

avian endocardial cushion tissue : A role for transforming growth factor beta3. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *209*(3), 296-309. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199707)209:3<296::AID-AJA5>3.0.CO;2-D

Namadurai, S., Balasuriya, D., Rajappa, R., Wiemhöfer, M., Stott, K., Klingauf, J., Edwardson, J. M., Chirgadze, D. Y., & Jackson, A. P. (2014). Crystal structure and molecular imaging of the Nav channel β3 subunit indicates a trimeric assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(15), 10797-10811. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.527994

Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., & Hay, E. D. (2005). Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation : Implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells, Tissues, Organs*, *179*(1-2), 11-23. https://doi.org/10.1159/000084505

Nelson, M., Millican-Slater, R., Forrest, L. C., & Brackenbury, W. J. (2014). The sodium channel β1 subunit mediates outgrowth of neurite-like processes on breast cancer cells and promotes tumour growth and metastasis. *International Journal of Cancer*, *135*(10), 2338-2351. https://doi.org/10.1002/ijc.28890

Nelson, W. J., & Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *303*(5663), 1483-1487. https://doi.org/10.1126/science.1094291

Newell, M., Baker, K., Postovit, L. M., & Field, C. J. (2017). A Critical Review on the Effect of Docosahexaenoic Acid (DHA) on Cancer Cell Cycle Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(8). https://doi.org/10.3390/ijms18081784

Newell, M., Mazurak, V., Postovit, L. M., & Field, C. J. (2021). N-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids, Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acid, and the Role of Supplementation during Cancer Treatment : A Scoping Review of Current Clinical Evidence. *Cancers*, *13*(6). https://doi.org/10.3390/cancers13061206

Nguyen, H. M., Miyazaki, H., Hoshi, N., Smith, B. J., Nukina, N., Goldin, A. L., & Chandy, K. G. (2012). Modulation of voltage-gated K+ channels by the sodium channel β1 subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(45), 18577-18582. https://doi.org/10.1073/pnas.1209142109

Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(12), 767-779. https://doi.org/10.1038/nrm3470

Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., & Holstein-Rathlou, N.-H. (2012). Gap junctions. *Comprehensive Physiology*, *2*(3), 1981-2035. https://doi.org/10.1002/cphy.c110051

Niessen, C. M., & Gottardi, C. J. (2008). Molecular components of the adherens junction. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1778*(3), 562-571. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.12.015

O'Connell, E., Reynolds, I. S., McNamara, D. A., Burke, J. P., & Prehn, J. H. M. (2021). Resistance to Cell Death in Mucinous Colorectal Cancer-A Review. *Cancers*, *13*(6). https://doi.org/10.3390/cancers13061389

Ohkubo, T., & Ozawa, M. (2004). The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *Journal of Cell Science*, *117*(9), 1675-1685. https://doi.org/10.1242/jcs.01004

Okada, H., Strutz, F., Danoff, T. M., Kalluri, R., & Neilson, E. G. (1996). Possible mechanisms of renal fibrosis. *Contributions to Nephrology*, *118*, 147-154. https://doi.org/10.1159/000425088

O'Malley, H. A., & Isom, L. L. (2015). Sodium channel β subunits : Emerging targets in channelopathies. *Annual Review of Physiology*, *77*, 481-504. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071846

Park, M., & Kim, H. (2017). Anti-cancer Mechanism of Docosahexaenoic Acid in Pancreatic Carcinogenesis : A Mini-review. *Journal of Cancer Prevention*, *22*(1), 1-5. https://doi.org/10.15430/JCP.2017.22.1.1

Patel, F., & Brackenbury, W. J. (2015). Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer. *The International Journal of Developmental Biology*, *59*(7-9), 357-366. https://doi.org/10.1387/ijdb.150171wb

Patino, G. A., Brackenbury, W. J., Bao, Y., Lopez-Santiago, L. F., O'Malley, H. A., Chen, C., Calhoun, J. D., Lafrenière, R. G., Cossette, P., Rouleau, G. A., & Isom, L. L. (2011). Voltage-gated Na+ channel β1B : A secreted cell adhesion molecule involved in human epilepsy. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(41), 14577-14591. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0361-11.2011

Patino, G. A., Claes, L. R. F., Lopez-Santiago, L. F., Slat, E. A., Dondeti, R. S. R., Chen, C., O'Malley, H. A., Gray, C. B. B., Miyazaki, H., Nukina, N., Oyama, F., De Jonghe, P., & Isom, L. L. (2009). A functional null mutation of SCN1B in a patient with Dravet syndrome. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(34), 10764-10778. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2475-09.2009

Patino, G. A., & Isom, L. L. (2010). Electrophysiology and beyond : Multiple roles of Na+ channel β subunits in development and disease. *Neuroscience Letters*, *486*(2), 53-59. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.06.050

Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metabolism*, *23*(1), 27-47. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006

Pei, D., Shu, X., Gassama-Diagne, A., & Thiery, J. P. (2019). Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming. *Nature Cell Biology*, *21*(1), 44-53. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0195-z

Peinado, Héctor, Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression : An alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews. Cancer*, *7*(6), 415-428. https://doi.org/10.1038/nrc2131

Peinado, Héctor, Portillo, F., & Cano, A. (2004). Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, *48*(5-6), 365-375. https://doi.org/10.1387/ijdb.041794hp

Peinado, Hector, Quintanilla, M., & Cano, A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines : Mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(23), 21113-21123. https://doi.org/10.1074/jbc.M211304200

Perez-Moreno, M. A., Locascio, A., Rodrigo, I., Dhondt, G., Portillo, F., Nieto, M. A., & Cano, A. (2001). A new role for E12/E47 in the repression of E-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(29), 27424-27431. https://doi.org/10.1074/jbc.M100827200

Pistritto, G., Trisciuoglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism : Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, *8*(4), 603-619. https://doi.org/10.18632/aging.100934

Polakis, P. (2007). The many ways of Wnt in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, *17*(1), 45-51. https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.12.007

Puisieux, A., Brabletz, T., & Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*, *16*(6), 488-494. https://doi.org/10.1038/ncb2976

Qin, N., D'Andrea, M. R., Lubin, M.-L., Shafaee, N., Codd, E. E., & Correa, A. M. (2003). Molecular cloning and functional expression of the human sodium channel beta1B subunit, a novel splicing variant of the beta1 subunit. *European Journal of Biochemistry*, *270*(23), 4762-4770. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03878.x

Rastaldi, M. P., Ferrario, F., Giardino, L., Dell'Antonio, G., Grillo, C., Grillo, P., Strutz, F., Müller, G. A., Colasanti, G., & D'Amico, G. (2002). Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney International*, *62*(1), 137-146. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00430.x

Ratcliffe, C. F., Qu, Y., McCormick, K. A., Tibbs, V. C., Dixon, J. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2000). A sodium channel signaling complex : Modulation by associated receptor protein tyrosine phosphatase beta. *Nature Neuroscience*, *3*(5), 437-444. https://doi.org/10.1038/74805

Ratcliffe, C. F., Westenbroek, R. E., Curtis, R., & Catterall, W. A. (2001). Sodium channel beta1 and beta3 subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *The Journal of Cell Biology*, *154*(2), 427-434. https://doi.org/10.1083/jcb.200102086

Roger, S., Gillet, L., Le Guennec, J.-Y., & Besson, P. (2015). Voltage-gated sodium channels and cancer : Is excitability their primary role? *Frontiers in Pharmacology*, *6*, 152. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00152

Roger, S., Rollin, J., Barascu, A., Besson, P., Raynal, P.-I., Iochmann, S., Lei, M., Bougnoux, P., Gruel, Y., & Le Guennec, J.-Y. (2007). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *39*(4), 774-786. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.12.007

Rosivatz, E., Becker, I., Specht, K., Fricke, E., Luber, B., Busch, R., Höfler, H., & Becker, K.-F. (2002). Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *The American Journal of Pathology*, *161*(5), 1881-1891. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64464-1

Sanchez-Sandoval, A. L., & Gomora, J. C. (2019). Contribution of voltage-gated sodium channel β-subunits to cervical cancer cells metastatic behavior. *Cancer Cell International*, *19*, 35. https://doi.org/10.1186/s12935-019-0757-6

Sarrió, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Research*, *68*(4), 989-997. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2017

Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., & Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, *75*(3), 495-505. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3

Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction : A multifunctional complex. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *286*(6), C1213-1228. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00558.2003

Serrano-Gomez, S. J., Maziveyi, M., & Alahari, S. K. (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Molecular Cancer*, *15*, 18. https://doi.org/10.1186/s12943-016-0502-x

Shimizu, H., Miyazaki, H., Ohsawa, N., Shoji, S., Ishizuka-Katsura, Y., Tosaki, A., Oyama, F., Terada, T., Sakamoto, K., Shirouzu, M., Sekine, S.-I., Nukina, N., & Yokoyama, S. (2016). Structure-based site-directed photo-crosslinking analyses of multimeric cell-adhesive interactions of voltage-gated sodium channel β subunits. *Scientific Reports*, *6*, 26618. https://doi.org/10.1038/srep26618

Shimizu, H., Tosaki, A., Ohsawa, N., Ishizuka-Katsura, Y., Shoji, S., Miyazaki, H., Oyama, F., Terada, T., Shirouzu, M., Sekine, S.-I., Nukina, N., & Yokoyama, S. (2017). Parallel homodimer structures of the extracellular domains of the voltage-gated sodium channel β4 subunit explain its role in cell-cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(32), 13428-13440. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786509

Shirakihara, T., Kawasaki, T., Fukagawa, A., Semba, K., Sakai, R., Miyazono, K., Miyazawa, K., & Saitoh, M. (2013). Identification of integrin α3 as a molecular marker of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes. *Cancer Science*, *104*(9), 1189-1197. https://doi.org/10.1111/cas.12220

Singla, V. (2020). Carcinogens in Products : Inadequate Protections Raise Cancer Risks. *Trends in Cancer*, *6*(8), 619-622. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.04.006

Sipos, F., & Galamb, O. (2012). Epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions in the colon. *World Journal of Gastroenterology*, *18*(7), 601-608. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i7.601

Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., Szabo, S., Buckhaults, P., Farrell, C., Meeh, P., Markowitz, S. D., Willis, J., Dawson, D., Willson, J. K. V., Gazdar, A. F., … Velculescu, V. E. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, *314*(5797), 268-274. https://doi.org/10.1126/science.1133427

Smits, A. H., Ziebell, F., Joberty, G., Zinn, N., Mueller, W. F., Clauder-Münster, S., Eberhard, D., Fälth Savitski, M., Grandi, P., Jakob, P., Michon, A.-M., Sun, H., Tessmer, K., Bürckstümmer, T., Bantscheff, M., Steinmetz, L. M., Drewes, G., & Huber, W. (2019). Biological plasticity rescues target activity in CRISPR knock outs. *Nature Methods*, *16*(11), 1087-1093. https://doi.org/10.1038/s41592-019-0614-5

Song, E. A., & Kim, H. (2016). Docosahexaenoic Acid Induces Oxidative DNA Damage and Apoptosis, and Enhances the Chemosensitivity of Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(8). https://doi.org/10.3390/ijms17081257

Song, K.-A., & Faber, A. C. (2019). Epithelial-to-mesenchymal transition and drug resistance : Transitioning away from death. *Journal of Thoracic Disease*, *11*(6), E82-E85. https://doi.org/10.21037/jtd.2019.06.11

Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F., & Brooks, S. C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Research*, *50*(18), 6075-6086.

Spampanato, J., Kearney, J. A., de Haan, G., McEwen, D. P., Escayg, A., Aradi, I., MacDonald, B. T., Levin, S. I., Soltesz, I., Benna, P., Montalenti, E., Isom, L. L., Goldin, A. L., & Meisler, M. H. (2004). A novel epilepsy mutation in the sodium channel SCN1A identifies a cytoplasmic domain for beta subunit interaction. *The*

Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, *24*(44), 10022-10034. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2034-04.2004

Srinivasan, J., Schachner, M., & Catterall, W. A. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(26), 15753-15757. https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15753

Sullivan, N. J., Sasser, A. K., Axel, A. E., Vesuna, F., Raman, V., Ramirez, N., Oberyszyn, T. M., & Hall, B. M. (2009). Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*, *28*(33), 2940-2947. https://doi.org/10.1038/onc.2009.180

Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M., & Peifer, M. (2000). Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *1*(2), 91-100. https://doi.org/10.1038/35040042

Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, *2*(6), 442-454. https://doi.org/10.1038/nrc822

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, *139*(5), 871-890. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007

Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(2), 131-142. https://doi.org/10.1038/nrm1835

Thuault, S., Valcourt, U., Petersen, M., Manfioletti, G., Heldin, C.-H., & Moustakas, A. (2006). Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology*, *174*(2), 175-183. https://doi.org/10.1083/jcb.200512110

Tomita, K., van Bokhoven, A., van Leenders, G. J., Ruijter, E. T., Jansen, C. F., Bussemakers, M. J., & Schalken, J. A. (2000). Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Research*, *60*(13), 3650-3654.

Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. A., Chau, S., & Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, *22*(6), 725-736. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.09.022

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect : The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5930), 1029-1033. https://doi.org/10.1126/science.1160809

Vandewalle, C., Van Roy, F., & Berx, G. (2009). The role of the ZEB family of transcription factors in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *66*(5), 773-787. https://doi.org/10.1007/s00018-008-8465-8

Vandewalle, Cindy, Comijn, J., De Craene, B., Vermassen, P., Bruyneel, E., Andersen, H., Tulchinsky, E., Van Roy, F., & Berx, G. (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Research*, *33*(20), 6566-6578. https://doi.org/10.1093/nar/gki965

van Schie, E. H., & van Amerongen, R. (2020). Aberrant WNT/CTNNB1 Signaling as a Therapeutic Target in Human Breast Cancer : Weighing the Evidence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 25. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00025

van Staalduinen, J., Baker, D., ten Dijke, P., & van Dam, H. (2018). Epithelial–mesenchymal-transition-inducing transcription factors : New targets for tackling chemoresistance in cancer? *Oncogene*, *37*(48), 6195-6211. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0378-x

Varga, J., De Oliveira, T., & Greten, F. R. (2014). The architect who never sleeps : Tumor-induced plasticity. *FEBS Letters*, *588*(15), 2422-2427. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.019

Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I., & Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & Development*, *18*(10), 1131-1143. https://doi.org/10.1101/gad.294104

Vićovac, L., & Aplin, J. D. (1996). Epithelial-mesenchymal transition during trophoblast differentiation. *Acta Anatomica*, *156*(3), 202-216. https://doi.org/10.1159/000147847

Vollmann-Zwerenz, A., Leidgens, V., Feliciello, G., Klein, C. A., & Hau, P. (2020). Tumor Cell Invasion in Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(6). https://doi.org/10.3390/ijms21061932

Volpato, M., & Hull, M. A. (2018). Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *37*(2-3), 545-555. https://doi.org/10.1007/s10555-018-9744-y

Vu, T., & Datta, P. K. (2017). Regulation of EMT in Colorectal Cancer : A Culprit in Metastasis. *Cancers, 9(12)*. https://doi.org/10.3390/cancers9120171

Wang, J., Wei, Q., Wang, X., Tang, S., Liu, H., Zhang, F., Mohammed, M. K., Huang, J., Guo, D., Lu, M., Liu, F., Liu, J., Ma, C., Hu, X., Haydon, R. C., He, T.-C., & Luu, H. H. (2016). Transition to resistance : An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance. *Genes & Diseases*, *3*(1), 3-6. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.01.002

Warburg, O. (1930). Warburg report on the metabolism of tumors. *Journal of Chemical Education*, *7*(1), 179. https://doi.org/10.1021/ed007p179

Wells, A., Chao, Y. L., Grahovac, J., Wu, Q., & Lauffenburger, D. A. (2011). Epithelial and mesenchymal phenotypic switchings modulate cell motility in metastasis. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *16*, 815-837. https://doi.org/10.2741/3722

Wiseman, B. S., & Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *296*(5570), 1046-1049. https://doi.org/10.1126/science.1067431

Wong, H.-K., Sakurai, T., Oyama, F., Kaneko, K., Wada, K., Miyazaki, H., Kurosawa, M., De Strooper, B., Saftig, P., & Nukina, N. (2005). Beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-

cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 23009-23017. https://doi.org/10.1074/jbc.M414648200

Wu, Y., & Zhou, B. P. (2008). New insights of epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, *40*(7), 643-650. https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00443.x

Xiao, Z. C., Ragsdale, D. S., Malhotra, J. D., Mattei, L. N., Braun, P. E., Schachner, M., & Isom, L. L. (1999). Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(37), 26511-26517. https://doi.org/10.1074/jbc.274.37.26511

Xu, J., Lamouille, S., & Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Research*, *19*(2), 156-172. https://doi.org/10.1038/cr.2009.5

Xu, T.-H., Yan, Y., Kang, Y., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2016). Alzheimer's disease-associated mutations increase amyloid precursor protein resistance to γ-secretase cleavage and the Aβ42/Aβ40 ratio. *Cell Discovery*, *2*, 16026. https://doi.org/10.1038/celldisc.2016.26

Xu, X., Zhang, M., Xu, F., & Jiang, S. (2020). Wnt signaling in breast cancer : Biological mechanisms, challenges and opportunities. *Molecular Cancer*, *19*(1), 165. https://doi.org/10.1186/s12943-020-01276-5

Yamamoto, H., & Imai, K. (2015). Microsatellite instability : An update. *Archives of Toxicology*, *89*(6), 899-921. https://doi.org/10.1007/s00204-015-1474-0

Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., & Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, *117*(7), 927-939. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.006

Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). Epithelial-Mesenchymal Transition : At the Crossroads of Development and Tumor Metastasis. *Developmental Cell*, *14*(6), 818-829. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.05.009

Yang, M., Kozminski, D. J., Wold, L. A., Modak, R., Calhoun, J. D., Isom, L. L., & Brackenbury, W. J. (2012). Therapeutic potential for phenytoin : Targeting Na(v)1.5

sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *134*(2), 603-615. https://doi.org/10.1007/s10549-012-2102-9

Yao, D., Dai, C., & Peng, S. (2011). Mechanism of the mesenchymal-epithelial transition and its relationship with metastatic tumor formation. *Molecular Cancer Research: MCR*, *9*(12), 1608-1620. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0568

Ye, Y., Xiao, Y., Wang, W., Yearsley, K., Gao, J. X., Shetuni, B., & Barsky, S. H. (2010). ERα signaling through slug regulates E-cadherin and EMT. *Oncogene*, *29*(10), 1451-1462. https://doi.org/10.1038/onc.2009.433

Yeaman, C., Grindstaff, K. K., Hansen, M. D., & Nelson, W. J. (1999). Cell polarity : Versatile scaffolds keep things in place. *Current Biology: CB*, *9*(14), R515-517. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80324-8

Yook, J. I., Li, X.-Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H. S., Kim, N. H., Cha, S. Y., Ryu, J. K., Choi, Y. J., Kim, J., Fearon, E. R., & Weiss, S. J. (2006). A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nature Cell Biology*, *8*(12), 1398-1406. https://doi.org/10.1038/ncb1508

Yoshida, K., & Miki, Y. (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Science*, *95*(11), 866-871. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x

Yu, F. H., Westenbroek, R. E., Silos-Santiago, I., McCormick, K. A., Lawson, D., Ge, P., Ferriera, H., Lilly, J., DiStefano, P. S., Catterall, W. A., Scheuer, T., & Curtis, R. (2003). Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(20), 7577-7585.

Yu, Jun, Wu, W. K. K., Li, X., He, J., Li, X.-X., Ng, S. S. M., Yu, C., Gao, Z., Yang, J., Li, M., Wang, Q., Liang, Q., Pan, Y., Tong, J. H., To, K. F., Wong, N., Zhang, N., Chen, J., Lu, Y., … Sung, J. J. Y. (2015). Novel recurrently mutated genes and a prognostic mutation signature in colorectal cancer. *Gut*, *64*(4), 636-645. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306620

Yu, Junhui, Li, S., Xu, Z., Guo, J., Li, X., Wu, Y., Zheng, J., & Sun, X. (2021). CDX2 inhibits epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer by modulation of Snail expression and β-catenin stabilisation via transactivation of PTEN expression. *British Journal of Cancer*, *124*(1), 270-280. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01148-1

Yu, W., Kamara, H., & Svoboda, K. K. H. (2008). The role of twist during palate development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *237*(10), 2716-2725. https://doi.org/10.1002/dvdy.21627

Yurko-Mauro, K., Van Elswyk, M., & Teo, L. (2020). A Scoping Review of Interactions between Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and Genetic Variation in Relation to Cancer Risk. *Nutrients*, *12*(6). https://doi.org/10.3390/nu12061647

Zahraoui, A. (2004). Les junctions serrées : Plate-forme de régulation de la prolifération et de la polarité cellulaires. *médecine/sciences*, *20*(5), 580-585. https://doi.org/10.1051/medsci/2004205580

Zajchowski, D. A., Bartholdi, M. F., Gong, Y., Webster, L., Liu, H. L., Munishkin, A., Beauheim, C., Harvey, S., Ethier, S. P., & Johnson, P. H. (2001). Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer Research*, *61*(13), 5168-5178.

Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, *24*(37), 5764-5774. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208927

Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., & Kalluri, R. (2003). BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine*, *9*(7), 964-968. https://doi.org/10.1038/nm888

Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1429-1437. https://doi.org/10.1172/JCI36183

Zheng, X., Carstens, J. L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.-C., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is

dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature*, *527*(7579), 525-530. https://doi.org/10.1038/nature16064

Zhou, B. P., Deng, J., Xia, W., Xu, J., Li, Y. M., Gunduz, M., & Hung, M.-C. (2004). Dual regulation of Snail by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Cell Biology*, *6*(10), 931-940. https://doi.org/10.1038/ncb1173

Zhuge, Y., & Xu, J. (2001). Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. Role in cell invasion across collagen barrier. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(19), 16248-16256. https://doi.org/10.1074/jbc.m010190200

Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., Boubaker, J., & Filali, A. (2013). Rôle de la cellule épithéliale dans l'homéostasie intestinale et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. *médecine/sciences*, *29*(12), 1145-1150. https://doi.org/10.1051/medsci/20132912019

Adélaïde DORAY

Rôle de la protéine Navβ4 dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses et non-cancéreuses

Résumé

Des résultats acquis de notre laboratoire ont montré que l'expression de la sous-unité auxiliaire de canaux sodiques dépendants du voltage Navβ4 (gène *SCN4B*) est réduite dans les tissus cancéreux mammaires par rapport aux tissus non cancéreux. Cependant, le rôle de cette protéine dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses n'est pas caractérisé.

Pour répondre à cette question, nous avons modifié son expression dans les cellules de la lignée épithéliale mammaire non cancéreuse MCF10A, par des techniques de CRISPR/Cas9 et d'ARN interférents. Nous montrons que la réduction d'expression de Navβ4 entraîne une désorganisation cellulaire, augmente la dégradation de la matrice extracellulaire et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse. La réduction d'expression de Navβ4 dans ces cellules induit également une diminution d'expression de la β-caténine par une augmentation de sa dégradation. Par ailleurs, la réexpression plasmidique de Navβ4 dans les cellules CRISPR induit une diminution de l'expression transcriptionnelle des marqueurs mésenchymateux vimentine et N-cadhérine. La réduction d'expression de Navβ4 dans les cellules de la lignée cancéreuse mammaire humaine MDA-MB-231 entraîne une augmentation de l'invasion cellulaire et diminue l'expression transcriptionnelle de la β-caténine et E-cadhérine.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats suggèrent que l'expression de Navβ4 participerait au maintien du phénotype épithélial dans les cellules mammaires et la réduction de son expression pourrait être une étape déterminante de la carcinogenèse.

Mots clés : Navβ4, β-caténine, migration/invasion cellulaire, transition épithélio-mésenchymateuse.

Abstract

Results from our laboratory show that expression of Navβ4 voltage gated sodium channel auxiliary subunit (*SCN4B* gene) is decreased in cancer tissues compared to non-cancerous ones. However, its role in non-cancerous mammary epithelial cells is not described.

To answer this question, we used the MCF10A mammary cell line in which we genetically modified for the Navβ4 gene by CRISPR/Cas-9 and siRNA techniques. We show that down-expression of Navβ4 leads to cellular disorganisation, increases extracellular matrix degradation, and promotes epithelial-mesenchymal transition. The down-expression of Navβ4 in these cells also decreases β-catenin expression by an increase of its degradation.

The overexpression of Navβ4 in these cells leads to a decrease of mesenchymal markers such as vimentin and N-cadherin. The down-expression of Navβ4 in the MDA-MB-231 human cancer mammary cell line promotes cellular invasiveness and decreases transcriptional expression of β-catenin and E-cadherin.

Overall, our results suggest that Navβ4 may participate in the maintenance of the epithelial phenotype in mammary cells and that its down-expression might be a determining step in the carcinogenesis.

Key words: Navβ4, β-catenin, cell migration/invasion, epithelial-mesenchymal transition.