UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE
Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV)

INSERM UMR 1069 « Nutrition Croissance et Cancer »

THÈSE présentée par :

Alison ROBERT

soutenue le : **24 novembre 2023**

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

Rôle des protéines d'absorption du calcium mitochondrial MICUs dans la progression du cancer colorectal

THÈSE dirigée par :

M GUEGUINOU Maxime	Chargé de Recherche, Inserm UMR 1069, HDR, Université de Tours
M RAOUL William	Chargé de Recherche, Inserm UMR 1069, HDR, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M CONSTANTIN Bruno	Directeur de Recherche, CNRS UMR 6041, Université de Poitiers
Mme DESQUIRET-DUMAS Valérie	Ingénieure Hospitalière, HDR, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers

---

JURY :

Mme ALLARD-VANNIER Emilie	Professeure des Universités, Université de Tours
M CONSTANTIN Bruno	Directeur de Recherche, CNRS UMR 6041, Université de Poitiers
Mme DESQUIRET-DUMAS Valérie	Ingénieure Hospitalière, HDR, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers
M GUEGUINOU Maxime	Chargé de Recherche, Inserm UMR 1069, HDR, Université de Tours
Mme NEUZILLET Cindy	Professeure des Universités, Praticienne Hospitalière, Institut Curie, Université de Versailles Saint-Quentin
M RAOUL William	Chargé de Recherche, Inserm UMR 1069, HDR, Université de Tours

MEMBRE INVITÉ :

M LECOMTE Thierry	Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Tours

A ma famille,

Remerciements

Mes premiers remerciements sont pour le Dr Valérie Desquiret-Dumas et le Dr Bruno Constantin d'avoir accepté de lire et d'évaluer mes travaux de thèse, ainsi que le Pr Cindy Neuzillet et le Pr Emilie Allard-Vannier qui ont accepté d'examiner ma thèse. Je remercie également le Pr Thierry Lecomte d'avoir accepté mon invitation à participer à ma soutenance.

Je souhaite remercier le Pr Christophe Vandier, directeur de l'unité Inserm U1069 Nutrition, Croissance et Cancer de m'avoir permis de réaliser mon stage de master 2 et mes travaux de thèse au sein du laboratoire, merci également pour ton accessibilité et ton soutien.

J'aimerai remercier mes directeurs de thèse Maxime et William,
Maxime, mon papa de thèse, merci pour ta confiance, ton encadrement tout au long de cette thèse faisant de moi ta première étudiante doctorante (si ce n'est pas la classe ça !), ta patience (surtout pour la rédac') et d'avoir toujours été présent pour moi. Promis j'arrête les donc, donc et donc. Finalement nos caractères ont plutôt fait bon ménage ! Merci également pour ces trois années rythmées de bonnes blagues. Merci pour tout !
William, pour ton soutien tout au long de ces années de thèse (même si tu m'as cassé les oreilles plus d'une fois avec ta musique boum boum !). Merci de m'avoir accompagné dans ce parcours scientifique et reboosté dans les moments plus compliqués. En espérant partager un 10kms prochainement avec toi.

Je te remercie Isa, pour le temps investi dans mes travaux et ton aide précieuse. Merci de m'avoir appris la culture cellulaire, d'avoir rempli un nombre incalculable de plaques de PCR, sans parler des plaques de SRB. Ta présence au laboratoire était précieuse et nos discussions du matin me manquent déjà, je te souhaite une belle retraite entourée de toute ta famille.

Un grand merci David (le Docteur Crottès) pour ta bienveillance, ton soutien et tes conseils avisés qui m'ont aidé à surmonter les présentations orales ! Merci également pour ton

investissement dans mes travaux de thèse, sans oublier tes beaux graphiques que tu as pu réaliser avec Rrrrrrr.

Je tiens à remercier Jérôme pour son implication dans mes travaux de thèse et son travail effectué sur la partie métabolisme. Et Naig pour sa gentillesse, sa disponibilité et son implication dans la relecture de mon article, ainsi que pour m'avoir aidé sur la partie des supercomplexes.

Je remercie également,
Marie de m'avoir encouragé à postuler en thèse, finalement, je n'ai aucun regret ! Ma mamie de thèse, merci pour ta joie de vivre et ton humour (oléolé).
Jean-François, Stéphane et Nastaran de m'avoir appris les (durs) rudiments de l'Oroboros. D'ailleurs merci à ma vachette pour ces longues journées pleines de rebondissements.
Cyrille, Michelle et Violetta je vous remercie de votre aide pour mon projet. Cyrille pour ta bonne humeur, tes très bons gâteaux. Je te souhaite une bonne continuation au sein du labo.
Stéphanie je te remercie pour ton aide sur la manip' Red Oil, ta bonne humeur, et tes gniagniagnia qui m'ont beaucoup fait rire.
Gunther, merci pour ton aide, pour les moments passés en WB et en culture cell avec toujours ta bonne humeur et pour tes insultes allemandes contre l'imprimante.
Romain, merci de ton aide pour mon introduction de thèse et pour ton implication.

Merci Catherine et Murielle, nos secrétaires du laboratoire pour leur gentillesse et leur travail.
Merci ORL, Karine, Olivier, Karo, Aurore, ainsi qu'à l'ensemble des membres de l'équipe de m'avoir accueilli parmi vous, de votre disponibilité et vos conseils qui ont participé grandement à ce projet.

Je souhaite également remercier tous les stagiaires que j'ai pu encadrer : Océane, Beatrice, Juliette, Audrey pour leur sympathie et leur travail.
Merci aux anciennes thésardes, Fanny, Sana et Nastaran pour votre aide lors de mon arrivée au laboratoire. Mathilde, Sarah, Olivier je vous souhaite une bonne continuation pour la suite.
J'aimerais également souhaiter une bonne continuation aux nouveaux thésards.
Camille je te souhaite une belle thèse !

Merci Marion, pour ta bonne humeur, ta zen attitude qui m'a rassuré dans les moments de doute (et de panique !!!) et nos réunions potins dans ton bureau. Bonne chance pour ton post doc'.

Agathe, ta présence dans le bureau 5 m'a manqué pour cette fin de thèse, merci pour les bons moments passés ensemble.

Un merci tout particulier à toi Aude, collègue mais surtout amie, pour nos discussions (très intellectuelles !), nos fous rires et les moments passés ensemble même en dehors du labo. Mes trois années de thèse auraient été bien moins agréables sans toi, ma voisine de bureau. On a partagé de bons souvenirs, certains resteront entre nous (#taiedoreiller). Les minutes à t'attendre derrière la porte du bureau pour te faire peur vont me manquer. Je suis heureuse que tu te lances dans cette aventure de la thèse, ça n'a pas pris longtemps pour que tu te décides, juste un verre (plutôt bouteille) à la main. Je te souhaite le meilleur dans cette nouvelle aventure !

Aux copains,

Merci Marie, Maelys et Lisou pour nos aventures gastronomiques à Tours (spécialement chez Sésame), ainsi que pour votre amitié. Lisou, un énorme merci pour tes précieux conseils, ton soutien, surtout pendant cette période de rédac', sans oublier tes spritz divins qui font tout oublier !

Ma Cécé, merci pour ton soutien.

Un grand merci à mes amis du SAS Triathlon 37, de Tribue et du projet sportif duathlon/triathlon pour les week-ends mémorables que nous avons partagés et pour les souvenirs inoubliables. Je suis prête pour la saison 2024 !

Guigui, Andréa, Yom et Clara merci pour ces apéros improvisés.

Andrea, un grand merci pour nos déjeuners, ton écoute et ton soutien depuis toutes ces années (ça commence à faire !). Caro, merci pour tous les bons moments passés à la fac ou le temps m'a paru beaucoup moins long avec toi, et à nos swim and run trèèès long. Les filles vivement notre prochain voyage ensemble !

Maylis, un immense merci pour ton amitié depuis 27 ans (wow !).

Myriam, merci pour tout, c’est aussi un peu grâce à toi si j’en suis là, aujourd’hui.

Mathieu et Nathalie merci de m’avoir si bien accueilli, et pour tous les bons moments passés ensemble. Julie merci pour ton écoute et tes vocaux à se raconter nos vies. Clément merci pour ta joie de vivre.

Une pensée particulière à toi ma petite mamie… partie lors de la rédaction de cette thèse. Merci à l'ensemble de ma famille, qui a toujours occupé une place spéciale dans mon cœur.

Jojo, mon frérot, merci d’avoir toujours été là pour moi, même avec la distance, ton soutien et tes conseils ont été précieux. Maintenant à ton tour de boucler ta thèse !

Maman et Papa, merci de croire en moi et de me soutenir depuis toutes ces années. Je vous en suis tellement reconnaissante. L’école est finie, place à de nouvelles aventures !

Mon Valou, toi qui partage ma vie, merci pour ton amour et ton soutien quotidien.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique en raison de sa forte fréquence et de sa gravité. La croissance incontrôlée, l'invasion et la formation de métastases sont les facteurs clefs de la progression cancéreuse. Pour soutenir ces processus, les cellules cancéreuses subissent de nombreuses transformations dont une reprogrammation métabolique permettant de s'adapter et d'acquérir des nouvelles propriétés phénotypiques. Le fonctionnement du cycle de Krebs et de la chaine respiratoire la mitochondriale est régulé en partie par l'absorption de calcium (Ca^{2+}) dans la mitochondrie *via* un uniporteur d'influx de Ca^{2+} (MCU). Cet uniporteur est un grand complexe multimoléculaire composé du canal calcique MCU et de diverses protéines régulatrices d'absorption du Ca^{2+}, tels que MICU1, MICU2, MICU3, MCUb et d'autres protéines stabilisatrices de ce complexe comme la protéine EMRE.

Dans le cadre du CCR, des études récentes montrent que l'expression de MCU est fortement augmentée dans les tissus tumoraux et associée à un mauvais pronostic chez les patients. L'augmentation d'expression de MCU augmente l'influx de Ca^{2+} mitochondrial afin de promouvoir la biogenèse mitochondriale et la croissance des cellules de CCR *in vitro* et *in vivo*.

Ce travail de thèse avait pour but d'étudier le rôle potentiel des protéines régulatrices de l'absorption du Ca^{2+} MICUs (MICU1-2-3) dans les propriétés oncogéniques du CCR. Nos résultats mettent en avant une augmentation des transcrits de MICU2 dans les stades IV des patients CCR. Nous montrons via l'utilisation de modèle KO MICU2 un rôle de ce dernier dans la prolifération et la migration des cellules CCR *in vivo* et *in vitro*. Nos résultats montrent également un rôle spécifique de MICU2 dans l'équilibre des flux métaboliques entre la glycolyse et l'OXPHOS notamment par son action sur l'absorption du Ca^{2+} mitochondrial, le réseau mitochondrial et son rôle dans l'assemblage et le fonctionnement corrects de la chaîne respiratoire. De manière conjointe, nos résultats mettent en avant le rôle important des régulateurs de MCU pour façonner les flux calciques et métaboliques durant le développement tumoral.

Résumé en anglais

Colorectal cancer (CRC) represents a significant public health concern due to its high incidence and clinical severity. Cancer progression, characterized by uncontrolled growth, invasion, and metastasis, necessitates numerous transformative changes in cancer cells, including metabolic reprogramming, to adapt and acquire new phenotypic traits. A pivotal aspect of this metabolic regulation involves the Krebs cycle and the mitochondrial respiratory chain, which are partially governed by calcium (Ca^{2+}) influx into mitochondria via the Ca^{2+} uniporter (MCU). The MCU constitutes a large, multi-subunit complex composed of the MCU Ca^{2+} channel and various Ca^{2+} uptake regulatory proteins, including MICU1, MICU2, MICU3, MCUb, as well as complex-stabilizing proteins like EMRE.

In the context of CRC, recent studies have unveiled a significant upregulation of MCU expression in tumor tissues, which correlates with poor prognosis among patients. Enhanced MCU expression contributes to increased mitochondrial Ca^{2+} influx, subsequently promoting mitochondrial biogenesis and facilitating CRC cell growth both in vitro and in vivo.

The primary objective of this thesis was to investigate the potential involvement of Ca^{2+} uptake regulatory proteins known as MICUs (MICU1, MICU2, MICU3) in the oncogenic properties of CRC. Our findings reveal a marked elevation in MICU2 transcripts among stage IV CRC patients. By employing a MICU2 knockout model, we have established the role of MICU2 in CRC cell proliferation and migration, both in vivo and in vitro. Furthermore, our results underscore the specific influence of MICU2 on the equilibrium of metabolic fluxes, particularly between glycolysis and oxidative phosphorylation (OXPHOS). This influence is mediated through its regulation of mitochondrial Ca^{2+} uptake, modulation of the mitochondrial network, and its crucial role in the proper assembly and function of the respiratory chain. Collectively, our findings shed light on the critical role of MCU regulators, particularly MICU2, in orchestrating Ca^{2+} and metabolic fluxes during the progression of tumors. These insights contribute to a deeper understanding of the mechanisms driving tumor development.

Publications et communications

Articles originaux dans des revues avec comité de lecture :

1. L'échangeur ionique NCLX. Un rôle ambivalent dans la chronologie du cancer colorectal. Maxime Gueguinou, Trayambak Pathak, **Alison Robert**, Christophe Vandier, Mohamed Trebak, Thierry Lecomte, William Raoul. Med Sci (Paris). 2021 Feb;37(2):124-126. doi: 10.1051/medsci/2020274. Epub 2021 Feb 16.

2. Curcumin and NCLX inhibitors share anti-tumoral mechanisms in microsatellite-instability-driven colorectal cancer. Maxime Guéguinou, Sajida Ibrahim, Jérôme Bourgeais, **Alison Robert**, Trayambak Pathak, Xuexin Zhang, David Crottès, Jacques Dupuy, David Ternant, Valérie Monbet, Roseline Guibon, Hector Flores-Romero, Antoine Lefèvre, Stéphanie Lerondel, Alain Le Pape, Jean-François Dumas, Philippe G. Frank, Alban Girault, Romain Chautard, Françoise Guéraud, Ana García-Sáez, Mehdi Ouaissi, Patrick Emond, Olivier Sire, Olivier Hérault, Gaëlle Fromont-Hankard, Christophe Vandier, David Tougeron, Mohamed Trebak, William Raoul, Thierry Lecomte. Cell Mol Life Sci. 2022 May 8;79(6):284. doi: 10.1007/s00018-022-04311-4.

3. Calcium signaling : A therapeutic target to overcome resistance to therapies in cancer. Olivier Romito, Maxime Gueguinou, William Raoul, Ophélie Champion, **Alison Robert**, Mohamed Trebak, Caroline Goupille, Marie Potier-Cartereau. Cell Calcium. 2022 Dec;108:102673. doi: 10.1016/j.ceca.2022.102673. Epub 2022 Nov 12.

Communications orales dans des congrès nationaux :

1. Communication Flash - Journée MeetOchondrie Paris « Rôle de la protéine MICU2 dans l'initiation et la progression du cancer colorectal » (12/09/2023)

Communications orales dans des congrès inter-régionaux :

1. Colloque Réseau Molécules marines, métabolisme et cancer édition 2021 Mansigné, France. « Rôle des acteurs clés de la signalisation calcique mitochondriale dans le cancer colorectal » (25/06/2021)

2. Colloque Réseau Molécules marines, métabolisme et cancer édition 2022 Mansigné, France. « Rôle de MICU2 dans le cancer colorectal » (13/05/2022)

3. 16èmes Journées du Cancéropôle Grand Ouest Angers, France. « Rôle des protéines MICU dans le cancer colorectal » (24/06/2022)

4. Colloque Réseau Molécules marines, métabolisme et cancer édition 2023 Mansigné, France. « MICU2 : une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer colorectal ? » (12/05/2023) - ***Prix de la meilleure présentation***

Communications affichées dans des congrès internationaux :

1. Ion Channel & Cancer Meeting and Calcium Signaling in Cancer Lille, France. « Role of the MICU2 protein in colorectal cancer hallmarks » (07/12/2022)

2. Journées Francophones d'Hépato-gastroentérologie et d'Oncologie Digestive Paris, France. « Rôle de la protéine MICU2 dans le développement du cancer colorectal » (e-poster) (17/03/2023)

Table des matières

Remerciements 3
Résumé 7
Résumé en anglais 8
Publications et communications 9
Liste des tableaux 16
Liste des figures 17
Liste des abréviations 20
Introduction 25
Chapitre 1 : Le cancer colorectal 25
1. Epidémiologie 25
2. Facteurs de risques 27
2.1 L'âge 27
2.2 Le régime alimentaire et l'obésité 27
2.3 Les antécédents familiaux et prédisposition génétique 27
2.4 L'environnement et l'hygiène de vie 28
3. Physiopathologie 29
4. Diagnostic et dépistage 31
5. Les classifications du CCR 32
5.1 La classification TNM (Tumor Node Metastasis) 32
5.2 La classification CMS (Consensus Molecular Subtypes) 34
5.3 Classification anatomique 35
6. Traitements 36
6.1 La chirurgie 36
6.2 La chimiothérapie 36
6.3 Les thérapie ciblées 38
6.4 La radiothérapie 39
6.5 Les stratégies thérapeutiques 39
Chapitre 2 : La signalisation calcique 42

1. Les acteurs de la membrane plasmique 43
1.1 Les différentes voies d'entrée du Ca^{2+} 43
1.1.1 L'entrée SOCE 43
1.1.2 Les entrées SICE 44
1.2 Les différents influx calcique dans le cancer colorectal 46
1.2.1 L'influx calcique SOCE dans le cancer colorectal 46
1.2.2 Les influx calciques SICE dans le cancer colorectal 46
1.3 La signalisation calcique du réticulum endoplasmique 47
1.3.1 Le réticulum endoplasmique dans le cancer colorectal 47
1.4 L'interaction réticulum endoplasmique – mitochondrie 48
1.4.1 Les MAMs dans le cancer colorectal 48
2. La signalisation calcique mitochondriale 48
2.1 La structure de la mitochondrie 49
2.2 L'entrée de calcium dans l'espace intermembranaire mitochondrial 50
2.3 L'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale 50
2.3.1 Les régulateurs de la signalisation calcique mitochondriale au sein du complexe MCU 54
a. MCUR1 54
b. MCUb 54
c. EMRE 54
d. MICU1 55
e. MICU2 58
f. MICU3 59
2.4 L'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale 59
2.5 Sortie du calcium de la mitochondrie 60
2.5.1 L'échangeur NCLX 60
2.5.2 Les échangeurs Ca^{2+}/H^{+} 61
2.6 Le pore de transition de perméabilité (PTP) 62
3. Liens entre signalisation calcique mitochondriale, métabolisme et cancer 62
3.2 Le complexe MCU dans le cancer 64
3.3 L'échangeur NCLX dans le cancer 65
3.4 La protéine LETM1 dans le cancer 66

4. Dynamique mitochondriale 68
4.1 Mécanisme de la fission 68
4.2 Mécanisme de la fusion 70
Chapitre 3 : Le métabolisme énergétique 72
1. Les fonctions énergétiques mitochondriales 72
1.1 La β-oxydation des acides gras 72
1.1.1 Les étapes enzymatiques de la β-oxydation des acides gras 72
1.1.2 La régulation de la β-oxydation des acides gras 75
1.2 Le cycle de Krebs 75
1.2.1 Les différentes étapes du cycle de Krebs 75
1.2.2 La régulation du cycle de Krebs 76
1.3 La phosphorylation oxydative 77
1.3.1 Complexe I 78
1.3.2 Complexe II 78
1.3.3 Complexe III 78
1.3.4 Complexe IV 79
1.3.5 Complexe V 79
1.3.6 L'organisation des complexes de la phosphorylation oxydative mitochondriale 79
2. La reprogrammation métabolique 80
2.1 Effet Warburg 81
2.2 La glycolyse 83
2.2.1 Les étapes enzymatiques de la glycolyse 84
2.2.2 La régulation du flux glycolytique 86
a. Par le glucose 86
b. Par allostérie 86
c. Par l'induction enzymatique 86
2.3 Altérations des voies de signalisation métaboliques 87
2.4 Activation des oncogènes et reprogrammation métabolique 87
2.5 La reprogrammation métabolique du glucose dans le cancer colorectal 88
2.6 La reprogrammation métabolique du cycle de Krebs dans le cancer colorectal 88
2.7 La reprogrammation métabolique de la glutamine dans le cancer colorectal 89

2.8 La reprogrammation métabolique des lipides dans le cancer colorectal 89
3. La production des espèces réactives de l'oxygène dans le cancer 89
Objectifs de thèse 92
Matériel et Méthodes 96
I. Matériel biologique 96
1. Lignées cellulaires 96
1.1 Cellules colorectales non cancéreuse 96
1.2 Cellules colorectales cancéreuses 96
2. Test de viabilité cellulaire 97
3. Test de prolifération cellulaire 97
4. Cycle cellulaire 98
5. Migration par recouvrement cellulaire après cicatrice 98
6. Migration cellulaire par sphéroïdes 99
7. Immunohistochimie 100
8. Mesure du potentiel de membrane 100
II. Etude des mesures calciques 100
1. Mesure du calcium mitochondrial 100
2. Mesure des réserves calciques 101
3. Mesure de l'entrée SOCE 102
III. Mesure de la production des ROS 102
IV. Etude des différentes voies métaboliques 102
1. Utilisation de milieux et inhibiteurs spécifiques 102
2. Dosage du lactate 103
3. Dosage de la pyruvate déshydrogénase 104
4. Dosage de l'Acétyl-CoA 104
5. Activité d'oxydation des acides gras 104
6. Caractérisation des lipides 105
V. Etude du métabolisme mitochondrial 106
1. Mesure de la consommation d'oxygène 106
1.1 Sur cellules entières 107
1.1.1 Principe 107

1.1.2 Protocole d'oxygraphie 107
1.2 Sur cellules perméabilisées 108
1.2.1 Principe 108
1.2.2 Protocole d'oxygraphie 109
1.3 Analyse par Seahorse 110
2. Mesure de l'expression des supercomplexes 111
3. Activités enzymatiques mitochondriales 112
4. Coloration des gouttelettes lipidiques 113
5. Microscopie à fluorescence 3D 113
VI. Etude de l'expression génique par RT-qPCR 114
1. Extraction et dosage des ARN totaux 114
2. Transcription inverse 114
3. Réaction de polymérisation en chaîne 115
VII. Etude de l'expression protéique par Western Blot 120
1. Préparation du lysat cellulaire 120
2. Séparation du lysat protéique sur gel de polyacrylamide 120
3. Transfert sur membrane de nitrocellulose 121
4. Marquage et révélation des protéines 121
VIII. Modèle de xénogreffe de tumeur CRC sous-cutanée 122
IX. Etudes bio-informatiques 123
1. Analyse transcriptomique 123
X. Tests statistiques 123
Résultats 125
I. Article : Encodage du programme métabolique dans le cancer colorectal par MICU2 .. 125
II. Résultats complémentaires 186
Conclusion générale et perspectives 199
Bibliographie 214
Annexes 235

Liste des tableaux

Tableau I : Classification TNM 33
Tableau II : Classification CMS et corrélation phénotypique tumorale colorectale 34
Tableau III : Stratégie thérapeutique suivant les stades du cancer colorectal 40
Tableau IV : Inhibiteurs des différentes voies métaboliques 103
Tableau V : Amorces utilisées pour quantifier les transcrits des gènes cibles 116
Tableau VI : Composition du TBST (10X) 122
Tableau VII : Anticorps utilisés 122
Tableau VIII : Analyse de la masse des acides gras 190

Liste des figures

Figure 1: Taux d'incidence du cancer colorectal dans le monde (D'après Globocan 2020) ... 26
Figure 2 : Taux de mortalité du cancer colorectal dans le monde (D'après Globocan 2020).. 26
Figure 3 : Etapes de la progression du cancer colorectal 29
Figure 4 : Stades et développement du cancer colorectal 30
Figure 5 : Classification anatomique des cancers colorectaux (D'après Dekker et al. 2019)... 35
Figure 6 : Schéma représentatif des différents acteurs impliqués dans les voies d'influx et d'efflux de Ca^{2+} au niveau de la membrane plasmique et des compartiments subcellulaires (D'après Tajada and Villalobos 2020) 45
Figure 7 : Structure schématique d'une mitochondrie (D'après Microbial Notes in Cell Biology, M.IQBAL 2022) 49
Figure 8 : Chronologie de l'identification des composants du complexe MCU (D'après Pallafacchina, Zanin, and Rizzuto 2021) 52
Figure 9 : Schéma représentatif de l'uniporteur MCU et de ses protéines régulatrices en présence de concentration faible ou élevée de Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire (D'après d'Angelo and Rizzuto 2023) 53
Figure 10 : Caractérisation structurelle du complexe MCU (D'après Wu, Zheng, and Jia 2021) 57
Figure 11 : Représentation schématique des aspects clés de la dynamique calcique mitochondriale en lien avec le métabolisme mitochondrial (D'après Wacquier, Combettes, and Dupont 2019) 63
Figure 12 : Expression des acteurs du complexe MCU, de l'échangeur NCLX, de la protéine LETM1/TMBIM5 et du canal VDAC dans le cancer 67
Figure 13: La fission mitochondriale (D'après Uchikado, Ikeda, and Ohishi 2022) 70
Figure 14 : La fusion des mitochondries (D'après Uchikado, Ikeda, and Ohishi 2022)..... 71
Figure 15 : Organisation schématique de la β-oxydation mitochondriale des acides gras (D'après Bastin and Djouadi 2019) 73
Figure 16 : Réactions d'oxydations de l'hélice de Lynen 74
Figure 17 : Le cycle de Krebs 76
Figure 18 : Les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale 77

Figure 19 : Modèle du métabolisme de l'effet Warburg (Modifié d'après Unterlass and Curtin 2019)..... 83
Figure 20 : Les différentes étapes de la glycolyse 85
Figure 21 : Liens entre ROS et Ca^{2+} (D'après Görlach et al. 2015) 91
Figure 22 : Représentation de l'expérience de migration (D'après le site du fournisseur Ibidi.com) 99
Figure 23 : Schéma montrant la conception des séquences des sondes calciques fluorescentes ciblant le RE et la mitochondrie. 101
Figure 24 : Principe de la sonde fluorescente FAOBlue (Funakoshi.co)..... 105
Figure 25 : Schéma représentatif du mécanisme de « cellules entières » 108
Figure 26: Schéma représentatif du mécanisme de « cellules perméabilisées »..... 110
Figure 27 : Paramètres respiratoires issus d'une mesure d'OCR (D'après Van Den Bossche, Baardman, and De Winther 2015) 111
Figure 28 : Schéma de conclusion du rôle du modèle KO pour MICU2 126
Figure 29 : Consommation d'oxygène mitochondriale dans les lignées cellulaire contrôle et KO MICU2 en absence de glucose supplémenté en acide oléique avec ou sans traitement à l'etomoxir 187
Figure 30 : Production d'ATP mitochondriale médiée par l'utilisation d'acide gras dans les lignées cellulaire contrôle et KO MICU2 188
Figure 31 : Viabilité cellulaire des cellules contrôle et KO MICU2 avec ou sans carnitine . 189
Figure 32 : Analyse de l'expression de Myc par immunofluorescence 193
Figure 33 : Analyse de l'intensité de fluorescence de c-Myc 194
Figure 34 : Analyse de l'expression des transcrits de HIF1α..... 194
Figure 35 : Analyse de l'expression des transcrits de MTFA 194
Figure 36 : Analyse de l'expression des transcrits de PGC1α 195
Figure 37 : Analyse du potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la sonde fluorescente TMRE..... 196
Figure 38 : Analyse du potentiel de membrane mitochondrial avec la sonde fluorescente TMRE 196
Figure 39 : Viabilité cellulaire des lignées contrôle et KO MICU2 en présence de l'inhibiteur de l'AMPK..... 197
Figure 40 : Expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tumeurs primaires de différents cancer 201

Figure 41 : Expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tissus normaux 202
Figure 42 : Modèles proposés sur le potentiel rôle de MICU2 au sein des MAMs 204
Figure 43 : Expression des transcrits des gènes Miro 1 et Miro 2 par RT-qPCR 207
Figure 44 : Effet de l'expression de MICU2 sur la biogenèse mitochondriale 209

Liste des abréviations

AA : Acide Arachidonique
AcMo : Anticorps Monoclonaux
ACO : Aconitase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADP : Adénosine di-phosphate
AMPK : AMP-activated Protein Kinase
APC : Adenomatous Polyposis Coli
ARC : Arachidonic acid-Regulated Calcium-selective channel
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine tri-phosphate
α-KG : α-cétoglutarate

BPG : Biphosphoglycérate

Ca^{2+} : Calcium
CCR : Cancer Colorectal
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype
CIN : Chromosomal instability
CL : Cardiolipine
CMS : Consensus Molecular Subtypes
CoQ : Coenzyme Q
CO_2 : Dioxyde de Carbone
CpG : Cytosine phosphate Guanine
CPT: Carnitine Palmitoyl Transferase
CRM : Chaîne Respiratoire Mitochondriale
CS : Citrate Synthase

DAG : Diacylglycérol
DHAP : Dihydroxyacétone Phosphate
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO : Diméthyl Sulfoxyde
DRP1 : Dynamin-Related Protein 1

EDTA : Trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique
EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EMRE : Essential MCU Regulator
ETC : Electron Transport Chain

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
FBP : Fructose 1,6-Biphosphate
FCCP : Carbonyl Cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
Fis1 : Fission protein 1
F6P : Fructose-6-Phosphate

GAP : Glycéraldéhyde 3-Phosphate
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate dehydrogenase
GDAP1 : Ganglioside induced Differentiation Associated Protein 1
GSH : Glutathion
G6P : Glucose-6-Phosphate

H^+ : Proton
HIF1α : Hypoxia Inducible Factor 1α

IARC : International Agency for Research on Cancer
IDH : Isocitrate Déshydrogénase
INCa : Institut National du Cancer
INF2 : Inverted Formin 2
IP3 : Inositol-1,4,5-triphosphate
IP3R : Inositol-1,4,5-triphosphate Receptor

KO : Knock-Out

LDH : Lactate dehydrogenase
LETM1 : Leucine zipper and EF-hand containing transmembrane protein 1
Li^+ : Lithium
LOH : Loss Of Heterozygoty

MAMs : Mitochondria Associated Membranes
MC : Maladie de Crohn
MCAD : *Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*
MCU : Mitochondrial Calcium Uniporter
MCUR1 : Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1
MCT : Monocarboxylate transporters
Mfn : Mitofusine
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MICU : Mitochondrial Calcium Uptake
MP : Membrane Plasmique
mPTP : Mitochondrial Permeability Transition Pore
MSI : MicroSatellite Instability
MSS : MicroSatellite Stability
MTP18 : Mitochondrial fission Protein 18 kDa

Na^+ : Sodium
NAD^+ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NCLX : $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ exchange
NOS : Nitrogen Oxygen Species

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPA1 : Optic Atrophy 1
OXPHOS : Phosphorylation oxydative

PBS : Phosphate-buffered salin
PC : PhosphatidylCholine
PDH : Pyruvate Déshydrogénase
PE : PhosphatidylEthanolamine
PEP : Phosphoénol Pyruvate
PFK : Phosphofructokinase
PGA : Phosphoglycérate
Pi : Phosphate inorganique
PIP2 : Phosphatidylinositol-4-5- biphosphate
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PKC : Protéine Kinase C
PKM : Pyruvate Kinase M
PLA2 : Phospholipase A2
PLC : Phospholipase C
PMCA1 : Plasma Membrane Ca^{2+}-ATPase 1
PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog
PTP : Permeability Transition Pore

RCH : Rectocolite Hémorragique
RCPG : Récepteur Couplé aux Protéines G
RE : Réticulum Endoplasmique
ROC : Receptor-Operated Channel
ROS : Reactive Oxygen Species
RT : Reverse Transcription

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
RS : Réticulum Sarcoplasmique
RyR : Ryanodine Receptor

SAC : Stretch-Activated Channel
SCAD : *Short Chain Acyl-CoA DBPehydrogenase*
SCS : Succinyl-CoA Synthétase
SDH : Succinate Déshydrogénase
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SERCA : Sarcoplasmic/Endosplamic Recitulum Ca^{2+}-ATPase
SICE : Store Independent Calcium Entry
SK3/SK4 : Small-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channel 3/4
SMOC : Second Messager-Operated Channel
SOCE : Store Operated Calcium Entry
SPCA : Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase
SRB : Sulforhodamine B
STIM : Stromal Interacting Molecule
SVF : Sérum de Veau Fœtal

TCA : Acide Trichloroacétique
TIM : Translocase Inner Membrane
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNM : Tumor Node Metastasis
TOM : Translocase Outer Membrane
TRP : Transient Receptor Potential
TRPC : Transient Receptor Potential Canonical
TRPV : Transient Receptor Potential Vanilloid

UCP : Uncoupling Protein

VDAC : Voltage Dependant Anionic Channel
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLCAD : *Very Long Chain Acyl-Coa Dehydrogenase*

2-DG : 2-Deoxy-D-glucose
5-FU : 5-Fluorouracile

Introduction

Chapitre 1 : Le cancer colorectal

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est une maladie pouvant apparaître dans presque tous les organes ou les tissus du corps. Il se caractérise par un développement cellulaire anormal, de manière incontrôlée, qui peut ensuite envahir des zones voisines et se propager à d'autres organes, on parle alors de métastases. Le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde, avec 9,6 millions de morts en 2018. Chez l'homme, les cancers les plus mortels en France sont les cancers du poumon, colorectal et de la prostate, tandis que chez la femme, ce sont les cancers du sein, colorectal et du poumon (Institut National du cancer (INCa)).

1. Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est le plus fréquent des cancers digestifs. C'est le troisième cancer en terme d'incidence et le deuxième en terme de mortalité tous sexes et âges confondus dans le monde (Sung et al. 2021).

En Europe c'est le plus courant, avec 430 000 nouveaux cas et plus de 200 000 décès (Globocan 2020). En 2020, selon l'INCa, le CCR est l'un des cancers les plus fréquents avec plus de 44 000 nouveaux cas recensés et le deuxième cancer le plus mortel en France avec 17 000 décès tous sexes et âge confondus. Une nette diminution de l'incidence et de la mortalité est observée avec respectivement -1,4 % et -1.8% par an entre 2010 et 2018. Cette diminution est plus significative chez les hommes que chez les femmes (Sung et al. 2021).

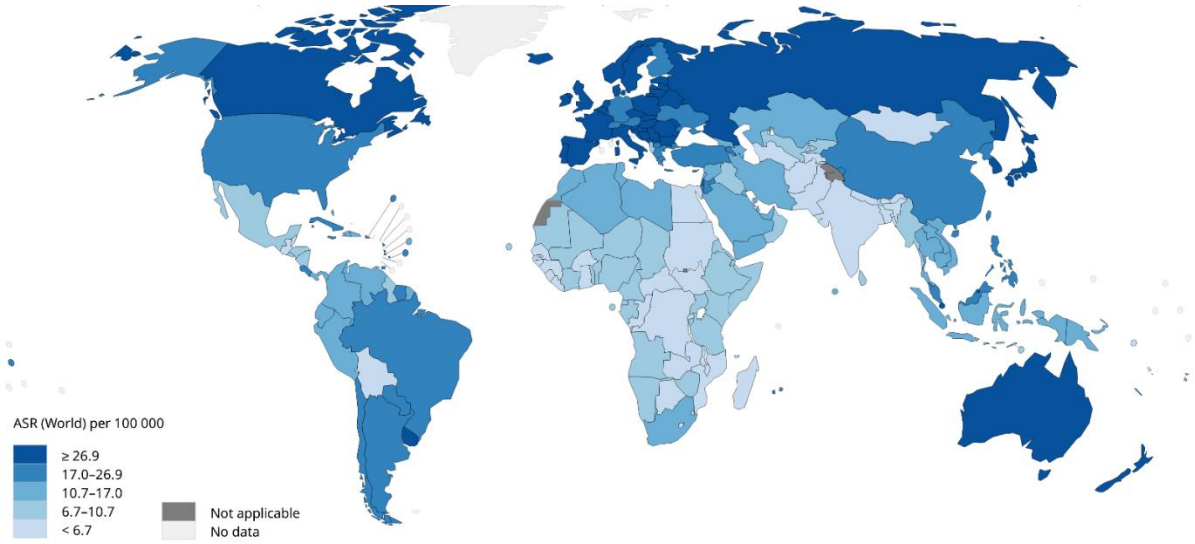


Figure 1: Taux d'incidence du cancer colorectal dans le monde (D'après Globocan 2020)

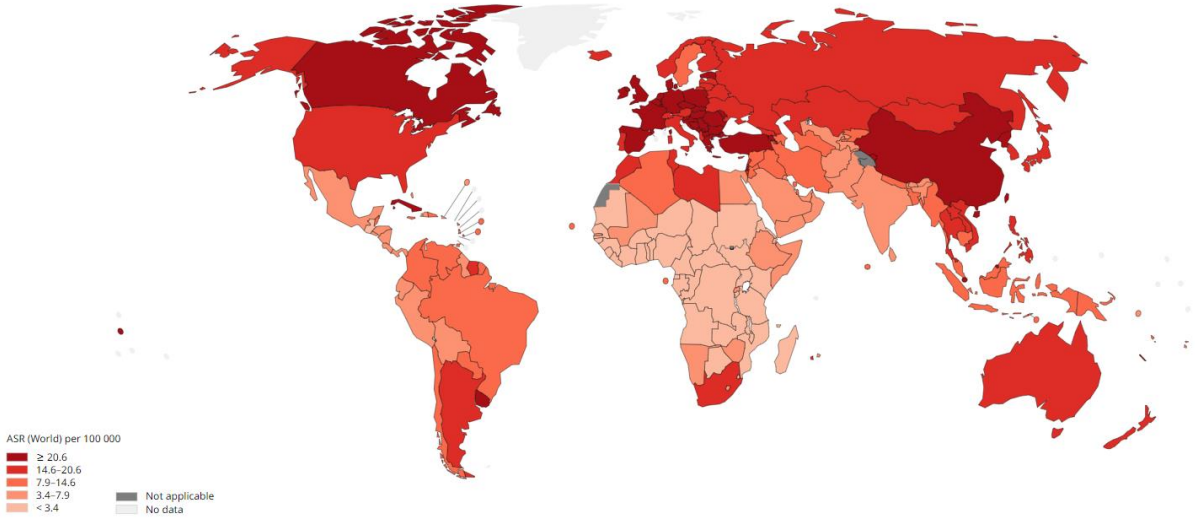


Figure 2 : Taux de mortalité du cancer colorectal dans le monde (D'après Globocan 2020)

2. Facteurs de risques

2.1 L'âge

Le CCR est un cancer dont la fréquence augmente avec l'âge, il touche dans 95 % des cas des personnes de plus de 50 ans. Il est à noter que parmi cette population 46 % des cas ont plus de 74 ans. L'âge moyen de survenue est de 71 ans chez l'homme et de 73 ans chez la femme. Le risque d'avoir un CCR entre 50 et 75 ans sans autre facteur de risque est de 3.5 %.

2.2 Le régime alimentaire et l'obésité

La consommation excessive ou à long terme d'une alimentation riche en graisse, en viande rouge et en viande transformée est associée à un risque augmenté de CCR (Bernstein et al. 2015). Une alimentation riche en calories et pauvre en fibres est également associée à une augmentation du risque de CCR. A l'inverse, les fibres contenues dans les céréales ainsi que les produits laitiers diminuent le risque d'apparition du CCR (IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Interventions 2019).

L'alimentation riche en graisse et en viande contribue au développement de l'obésité, qui augmente le risque d'apparition du CCR. L'obésité favorise l'inflammation du côlon contrôlée par les graisses abdominales qui sécrètent des adipokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF) et moins d'adiponectine, l'hormone qui permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline (Samaras et al. 2010). L'inflammation du côlon va favoriser un microenvironnement inflammatoire favorale à l'initiation et le développement de CCR (Erez et al. 2010).

2.3 Les antécédents familiaux et prédisposition génétique

Les CCR liés à une mutation génétique représentent environ 5 % des cas. Malgré ce faible pourcentage, le risque d'avoir un CCR est plus élevé en cas d'antécédents familiaux au premier degré de CCR et/ou d'adénome. Il existe plusieurs syndromes avec des prédispositions génétiques dont les deux principaux sont : la polypose adénomateuse familiale, liée à la mutation germinale inactivatrice du gène APC, responsable de l'apparition de centaines voire de milliers de polypes colorectaux dès l'adolescence (Dinarvand et al. 2019) ; et le syndrome de Lynch qui est dû à une ou des mutations germinales sur les gènes MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ou EPCAM responsables d'une dysfonction du système de réparation des

mésappariements de l'ADN favorisant le développement du CCR (Biller, Syngal, and Yurgelun 2019).

Les CCR liés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) représentent 20 % des cas au cours des trois premières années d'évolution de la MICI. Les MICI présentent une prédisposition génétique, liées aux gènes NOD2, ATG16L1 ou encore CARD9, associées à une réponse immunitaire excessive (Lamas et al. 2016). Elles regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH), qui sont responsables de lésions tissulaires et entraînent des douleurs abdominales et des diarrhées récidivantes en raison de l'inflammation du gros intestin. La MC et la RCH présentent de nombreuses similitudes mais il est parfois difficile de les reconnaître. En effet, il existe quelques différences, la maladie de Crohn peut toucher la totalité du tube digestif, alors que la rectocolite hémorragique concerne presque toujours le rectum et le côlon. L'inflammation chronique est considérée comme un promoteur du mécanisme de cancérogenèse. En effet cette inflammation génère une production de radicaux libres, comme les ROS (Reactive Oxygen species) et les NOS (Nitrogen Oxygen Species) qui affectent la régulation d'un nombre important de gènes impliqués dans les processus de mutagenèse (Svrcek et al. 2018).

2.4 L'environnement et l'hygiène de vie

D'autres observations ont montré un lien entre le tabagisme et le risque d'une prédisposition au CCR, en effet la fumée de cigarette contient des composés contenus dans le goudron (benzène), les gaz toxiques (monoxyde de carbone) et métaux lourds (mercure ou cadmium). Ces composés peuvent atteindre la muqueuse colorectale par le système circulatoire ou par ingestion directe et induire des anomalies génétiques ou épigénétiques (Scherübl 2022). De plus, la consommation d'alcool est également un facteur de risque, puisque l'alcool ingéré atteint les colonocytes par la circulation systémique, ce qui provoque des lésions au niveau des muqueuses et une prolifération cellulaire régénérative (Seitz and Stickel 2007).

Le CCR est l'un des rares cancers pour lequel le manque d'activité physique est reconnu comme facteur de risque (Rezende et al. 2018). En effet, l'activité physique pourrait réduire le risque de CCR grâce à ses effets bénéfiques sur la motilité intestinale, le système immunitaire, l'inflammation et les hormones métaboliques (Ruiz-Casado et al. 2017). D'autres facteurs de risques ont été observés tels que l'exposition à des radiations ionisantes, la sédentarité et la composition du microbiote intestinal.

3. Physiopathologie

Le CCR est une tumeur maligne de la muqueuse de la paroi interne du côlon ou du rectum. Dans plus de 98 % des cas, le processus de carcinogénèse colorectale suit une séquence de dégénérescence adénocarcinomateuse à partir d'une excroissance polyploïde de la muqueuse : séquence adénome-cancer. L'adénome fait suite au développement d'un polype qui est une lésion bénigne de la muqueuse digestive consécutive à la prolifération excessive de cellules épithéliales favorisée par leur exfoliation permanente. Les polypes suivent deux voies de carcinogénèse : « classique » dans plus de 90 % des cas ou « festonnée ». Dans les autres cas, la transformation néoplasique est induite par l'inflammation chronique de la muqueuse. Les cellules cancéreuses se développent localement puis migrent pour constituer des métastases, dont les sites préférentiels sont hépatiques, pulmonaires et péritonéaux (Santé publique France). Différents stades existent selon la propagation du cancer (*cf* figure 3).

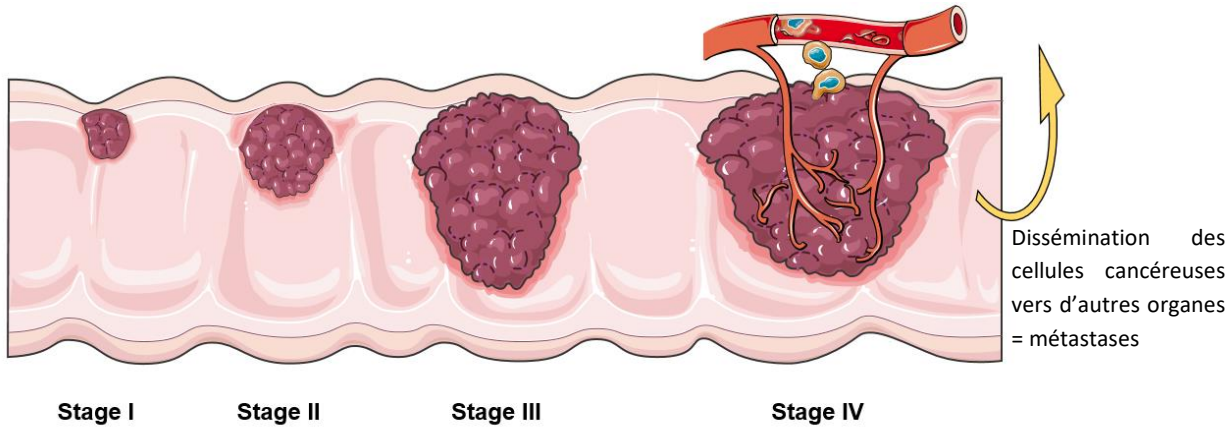


Figure 3 : Etapes de la progression du cancer colorectal

Le cancer de stade I se développe au-delà de la couche interne du côlon ou du rectum, mais les cellules cancéreuses n'ont pas traversé la couche musculaire du gros intestin. Le cancer de stade II se développe à travers la couche musculaire du côlon ou du rectum. Le cancer de stade III se propage à un ou plusieurs ganglions lymphatiques proches ou au tissu proche des ganglions lymphatiques. Le cancer de stade IV dit métastatique se propage à des organes distants ou à la paroi de l'abdomen. Les sites les plus communs pour les métastases sont le foie puis le poumon.

L'instabilité génétique et épigénétique est à l'origine du dérèglement cellulaire primitif de la carcinogénèse colorectale. Cette instabilité est la conséquence d'anomalies chromosomiques, micro-satellitaires et/ou de méthylation d'ADN. Ces trois mécanismes sont conducteurs dans le développement tumoral (Kim et al. 2022). Ils ne sont pas exclusifs, souvent simultanés et parfois corollaires.

- L'instabilité chromosomique (CIN : Chromosomal Instability ou LOH : Loss of heterozygoty) concerne 65 à 70 % des cancers colorectaux sporadiques (Ginkel, Tomlinson, and Soriano 2023). Elle correspond à des anomalies chromosomiques en nombre et/ou en structure par une dysfonction de réparation des bases/cassures, par des cassures télomériques ou encore des anomalies centrosome. La conséquence de cette instabilité chromosomique est l'accumulation de mutations inhibitrices sur certains gènes suppresseurs de tumeurs (APC, p53 et SMAD4 : mutations présentes dans plus de 60 % des CCR) et activatrices sur certains gènes pro-tumoraux (KRAS, PIK3CA : mutations présentes dans respectivement 40 % et 15 % des CCR). Il peut également exister une perte d'hétérozygotie sur le chromosome 18q dans près de 70 % des CCR et plus fréquemment dans les tumeurs avancées suggérant une apparition tardive de cette anomalie. Cette instabilité chromosomique est plus fréquente dans la séquence adénome-cancer « classique ».

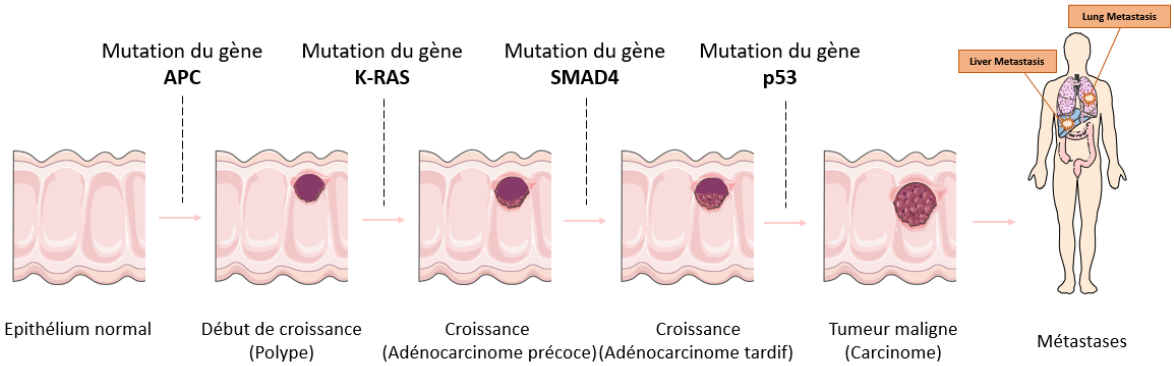


Figure 4 : Stades et développement du cancer colorectal

La perte du gène suppresseur de tumeur APC entraîne un épithélium hyperprolifératif dû à une perte d'adhésion cellulaire et à une dérégulation du cycle cellulaire. D'autres mutations du gène KRAS, du gène SMAD4 et du gène p53 s'accumulent pour donner un carcinome qui va par la suite disséminer vers d'autres organes (métastases).

- L'instabilité micro-satellitaire (MSI), observée dans environ 15 % des CCR dont 3 % dans le cadre du syndrome de Lynch sont dus à un déficit de réparation des mésappariements de l'ADN (Evrard et al. 2019). Le statut MSI est un facteur pronostic favorable pour des stades précoces de la maladie mais est associé à une résistance à la chimiothérapie par le 5-fluorouracile (5-FU) (Ribic et al. 2003; Sargent et al. 2010). A l'inverse lorsque les micro-satellites sont stables, on parle de stabilité des micro-satellites (MSS). Les CCR MSI localisés ont un meilleur pronostic que les CCR MSS localisés (Taieb et al. 2022).

- L'hyperméthylation des îlots CpG (statut CIMP), retrouvée dans environ 20 % des CCR et près de 2/3 des tumeurs MSI, est le fruit de différents mécanismes qui ne sont pas tous élucidés. L'hyperméthylation des îlots CpG est caractérisée par l'inactivation de gènes favorisant la carcinogénèse : gènes suppresseurs de tumeurs (p16INK4a, APC, WIF1, UCHL1), les gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (MLH1), de l'apoptose (DAPK, RASSF1A et RARβ2) et de l'adhésion cellulaire (CDH1). Le phénotype tumoral est associé dans 75 % des cas à la mutation activatrice de l'oncogène BRAF et au statut MSI par hyperméthylation MLH1. L'hyperméthylation des îlots CpG est plus fréquente dans la voie adénome-cancer « festonnée » (Puccini et al. 2017).

4. Diagnostic et dépistage

Le pronostic du CCR est fortement lié au stade d'avancement de la tumeur lors du diagnostic. Si le cancer est découvert à un stade précoce, les chances de guérison et de survie sont les meilleures. La coloscopie est l'examen dit « Gold Standard » pour la détection des polypes et des CCR. Elle permet la détection et l'ablation des lésions précancéreuses ce qui diminue de 50 % la mortalité liée au CCR (Zauber et al. 2012). En France, il existe deux stratégies de dépistage : organisé et ciblé.

Le dépistage organisé concerne la population générale entre 50 et 74 ans asymptomatique et n'ayant aucun antécédent familial ni antécédent personnel de CCR ni adénome. Il est proposé de réaliser tous les deux ans un test immunologique fécal détectant du sang dans les selles. En cas de test positif, une coloscopie sera réalisée par la suite.

Le frein majeur de ce dépistage organisé est le taux de participation pourtant de nombreuses campagnes de communication auprès de la population cible tentent de favoriser l'adhésion au dépistage. D'après des études transversales françaises, les facteurs évoqués de ce manque de dépistage sont la nécessité de faire la démarche par l'individu, l'absence de symptôme, la peur liée au résultat, le fait de ne pas se sentir concerné et la méconnaissance des modalités du dépistage (Hewitson et al. 2007; Faivre et al. 2004). Pourtant si le taux de participation atteignait les 50 %, il serait possible de diminuer de 15-20 % la mortalité du CCR.

L'autre dépistage cible les populations à risque élevé (antécédents personnels et/ou familial de CCR et/ou adénome, MICI depuis plus de 10 ans, acromégalie, symptômes évocateurs de cancer digestif) et très élevé (syndrome de prédisposition génétique). Il est alors indiqué de réaliser de suite une coloscopie. Le rythme de surveillance dépend des coloscopies antérieures et des facteurs influençant ce risque (Haute autorité de Santé).

5. Les classifications du CCR

5.1 La classification TNM (Tumor Node Metastasis)

Dans la stratégie thérapeutique, pour trouver le traitement adéquat, un bilan préalable est effectué. Le traitement va dépendre de plusieurs facteurs : du patient, de la classification TNM, des caractéristiques anatomopathologiques (emboles, engainement, différenciation, *budding*, nombre N), projet de résécabilité, anomalies moléculaires (RAS, BRAF, MSI et autres). La classification TNM décrit le stade de la tumeur comme localisé, localement avancé ou métastatique en prenant en compte la taille de la tumeur, l'envahissement des ganglions lymphatiques et la présence ou non de métastases (*cf* tableau I) (TNM classification of malignant tumours, UICC).

Tableau I : Classification TNM

Catégorie	**Tunique atteinte**
Tis	Muqueuse
T1	Sous-muqueuse
T2	Musculeuse
T3	Sous-séreuse
T4	Séreuse franchie et/ou organes

Catégorie	**Atteinte ganglionnaire**
N0	Pas d'atteinte ganglionnaire
N1	1-3 ADP régionale(s)
N2	≥ 4 ADP régionales

Catégorie	**Métastase**
M0	Pas d'atteinte métastatique
M1	Métastase(s) à distance

Stade	**Classification TNM**	**Survie à 5 ans (%)**
Stade 0	Tis N0 M0	≈ 100 %
Stade I	T1-T2 N0 M0	94 %
Stade II	T3-T4 N0 M0	80 %
Stade III	Tx N1-N2 M0	47-70 %
Stade IV	Tx Nx M1	10-20 %

5.2 La classification CMS (Consensus Molecular Subtypes)

Un consortium international d'experts a récemment permis de classifier 4 sous-types de CCR : « immunogène », « canonique », « métabolique » et « stromal ». Ceci a été réalisé sur plus de 4 000 patients. Il s'agit de la classification CMS caractérisée par des facteurs moléculaires, biologiques et cliniques (Guinney et al. 2015). A noter que 20 % des CCR n'appartiennent à aucun de ces 4 groupes (*cf* tableau II).

Tableau II : Classification CMS et corrélation phénotypique tumorale colorectale

CMS	**CMS1** **« Immunogène »**	**CMS2** **« Canonique »**	**CMS3** **« Métabolique »**	**CMS4** **« Stromal »**
% CCR	14%	37%	13%	23%
MSI/MSS	MSI + méthylation des îlots CpG + Hyper-mutation	MSS ; Mutations somatiques fréquentes	MSS ; Peu de mutations somatiques et de méthylation des îlots CpG	MSI ; Mutations somatiques fréquentes
Mutation	Mutation *BRAF*	Mutation *APC*	Mutations *RAS*	
Voies impliquées	Infiltration immunologique	Surexpression EGFR et activation des voies Wnt/Myc	Dérégulations métaboliques	Infiltration stromale Activation TGFß Angiogenèse
Pronostic	Bon pronostic si localisé ; mauvais pronostic si métastatique	Pronostic intermédiaire	Pronostic intermédiaire	Mauvais pronostic si métastatique
Localisation	Colon droit	Colon gauche	Homogène	Colon gauche

5.3 Classification anatomique

Depuis plusieurs années, des études montrent des disparités entre les CCR développés dans le côlon gauche et ceux développés dans le côlon droit. En effet, il existerait une influence de la localisation de la tumeur primaire sur le type de voie de carcinogénèse colique. Les tumeurs du colon droits sont plus fréquemment MSI et BRAF mutées alors que les tumeurs du colon gauches sont plus fréquemment CIN et p53 (ou TP53 pour tumor protein 53) altérées (Loree et al. 2018). A noter que les cancers du côlon gauche sont de meilleur pronostic indépendamment du stade ou de la chimiothérapie adjuvante (Petrelli et al. 2017). De plus, les aliments et nutriments peuvent agir de manière spécifique et variable suivant la localisation colique. Les acides biliaires ont une action pro-inflammatoire dans le côlon droit alors que dans le côlon gauche il est observé une action anti-oxydante des vitamines A, C et E.

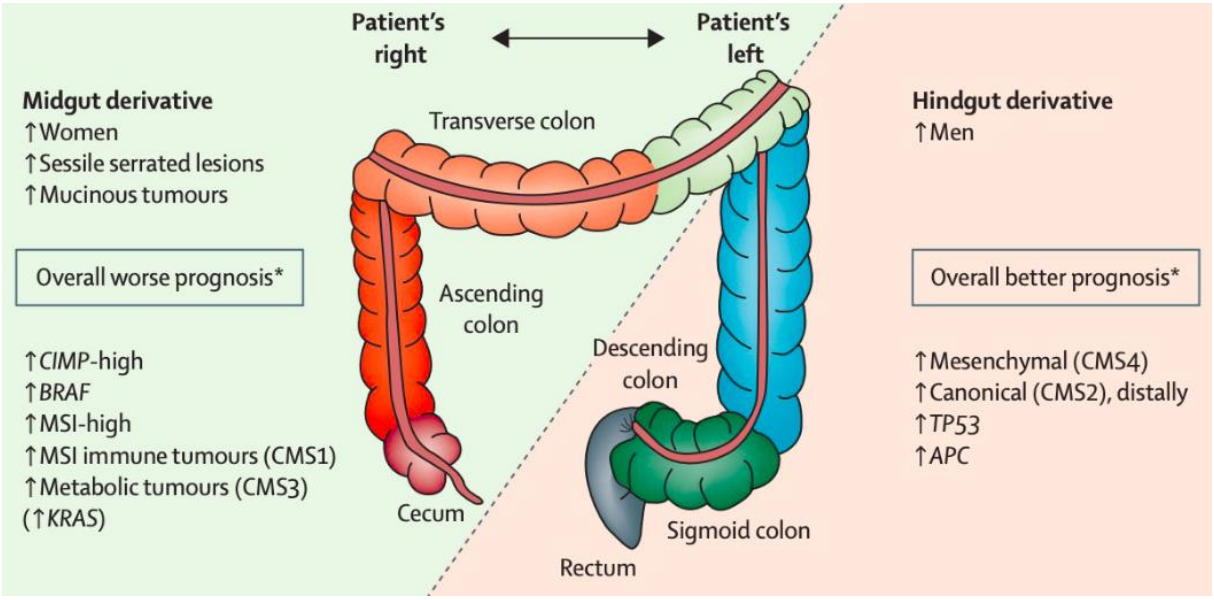


Figure 5 : Classification anatomique des cancers colorectaux (D'après Dekker et al. 2019)

Représentation schématique de l'influence de la localisation de la tumeur primaire. En bleu les patients avec une tumeur localisée au niveau du colon droit, et en rose les patients avec une tumeur localisée au niveau du colon gauche.

6. Traitements

Selon les phases d'évolution du cancer et les types de CCR, différents traitements ou séquences de traitements seront envisagés.

6.1 La chirurgie

La chirurgie est le traitement de première intention, si la tumeur est peu développée et bien localisée. Elle consiste à retirer la tumeur avec une marge de tissu sain autour. Le type de chirurgie réalisé dépend de la partie du côlon où est située la tumeur. Le chirurgien retire également les ganglions lymphatiques voisins de la tumeur. C'est ce qu'on appelle un curage ganglionnaire. Les ganglions sont ensuite analysés à l'aide d'un microscope pour déterminer s'ils contiennent ou non des cellules cancéreuses. C'est un facteur pronostique, c'est-à-dire que cela donne une indication sur l'évolution possible de la maladie.

Pour les cancers du côlon, la chirurgie est le traitement de référence pour les stades I (traitement endoscopique possible en cas de tumeur superficielle), II et III. Pour les tumeurs de stade III et certaines tumeurs de stade II, une chimiothérapie adjuvante (c'est-à-dire réalisée après la chirurgie) est indiquée (Messersmith 2019). Pour les stades IV, il est possible d'effectuer une chirurgie destinée à retirer la tumeur primitive (du côlon) et les métastases. Son intérêt est évalué en fonction de l'étendue de la maladie, de l'efficacité de la chimiothérapie, le cas échéant, et de l'état général (Institut National du Cancer).

6.2 La chimiothérapie

Les chimiothérapies sont utilisées pour traiter le CCR. Ces médicaments cytotoxiques peuvent être prescrits à tous les stades de la maladie, sauf pour les cancers de stade I qui sont traités exclusivement par chirurgie. Pour les stades II et III, elle est prescrite après chirurgie pour réduire le risque de récidive, on parle de chimiothérapie adjuvante. Enfin, pour le stade IV, avec métastases, la chimiothérapie est recommandée avant la chirurgie pour faciliter celle-ci. Elle est également prescrite lorsque la chirurgie n'est pas envisageable.

Ces médicaments de chimiothérapie agissent sur les mécanismes de la division cellulaire. Les plus couramment utilisés sont :

- Le 5-fluorouracile (5-FU) (voie intraveineuse),
- La capécitabine ou Xéloda® (voie orale),
- L'oxaliplatine ou Eloxatine® (voie intraveineuse),
- L'irinotécan ou Campto® (voie intraveineuse),
- Le trifluridine/tipiracil ou Lonsurf® (voie orale)

Les principaux protocoles de chimiothérapie indiqués en situation adjuvante dans le CCR sont les protocoles FOLFOX qui associent plusieurs médicaments: le 5-FU associé à l'oxaliplatine et à leucovorine (André and Cohen, 2018.) Le 5-FU et l'oxaliplatine sont deux agents chimiothérapeutiques qui tuent les cellules tumorales en interférant avec le processus de réplication cellulaire. Le 5-FU appartient à la classe des anti-métabolites de type anti-pyrimidique dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la méthylation de l'uracile en thymine aboutissant à une inhibition de la synthèse de l'ADN (Pinedo and Peters 1988; Diasio and Harris 1989). L'oxaliplatine, lui, prévient la croissance des cellules cancéreuses en parasitant l'action de l'ADN qui est nécessaire à leur reproduction. Cependant, ces types de traitements peuvent aboutir à de nombreux effets secondaires par une activité sur les cellules normales. La leucovorine n'est pas un médicament chimiothérapeutique mais elle est administrée pour améliorer l'activité du 5-FU. D'autres protocoles existent : FOLFIRI (leucovorine, 5-FU et irinotécan), FOLFIRINOX (leucovorine, 5-FU, oxaliplatine et irinotécan), CAPOX (capécitabine et oxaliplatine) et CAPIRI (capécitabine et irinotécan). Cependant, la chimiothérapie a certaines limites, telles que la toxicité systémique existante, un taux de réponse insatisfaisant, une résistance innée et acquise imprévisible et une faible sélectivité spécifique à la tumeur. Par conséquent, des investissements massifs ont été réalisés pour développer de nouvelles approches pour affiner ou même remplacer la chimiothérapie (Y. Xie et al. 2020).

6.3 Les thérapie ciblées

Les thérapies ciblées peuvent agir sur les cellules cancéreuses en inhibant directement les processus de prolifération, de différenciation ou de migration cellulaire.

Les anticorps monoclonaux (AcMo) sont des acteurs majeurs des thérapies ciblées (Oh and Bang 2020). Ces AcMo sont soit anti-angiogéniques bloquant la formation de nouveaux vaisseaux à l'intérieur et autour de la tumeur en ciblant essentiellement la voie VEGF/VEGR2 soit des molécules ciblant le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF, un des facteurs de croissance majeur responsable de la division des cellules cancéreuses), empêchant ainsi la tumeur de proliférer (Buecher and Blottière 2004).

Le premier AcMo ayant reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le CCR a été le cétuximab (Erbitux®), un anti-EGFR. D'autres AcMo ont ensuite été validés et commercialisés tels que le bévacizumab (Avastin®) qui a pour but de bloquer l'action du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le panitumumab (Vectibix®), qui est un anti-EGFR. Par la suite, ont été développés l'aflibercept (protéine de fusion pouvant se lier au VEGF, Zaltrap®), le régorafénib (inhibiteur de tyrosine kinases, Stivarga®) et l'encorafénib (inhibiteur de la kinase RAF, Braftovi®). Ces molécules occupent dorénavant une place importante dans le traitement du CCR avancé en association avec différents schémas de chimiothérapie (Van Cutsem et al. 2012). En revanche, le cétuximab et le panitumumab sont inefficaces chez les patients mutés RAS (Kassouf, Tabchi, and Tehfe 2016).

Plus récemment, il faut noter le développement des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire : l'ipilimumab (Yervoy®) et le nivolumab (Opdivo®). Ces deux traitements s'associent pour aider à réduire la taille d'un CCR métastatique MSI et à en maîtriser la croissance. De même le Pembrolizumab bloque le récepteur PD-1, bloquant ainsi son interaction avec le ligand PD-L1. Les inhibiteurs anti-CTLA-4 et anti-PD-1 (ou ciblant la protéine ligand PD-L1) permettent de lever l'anergie des lymphocytes, notamment les $CD8^+$ cytotoxiques, qui vont de nouveau pouvoir attaquer les cellules tumorales. Les cancers MSI et les lymphomes de Hodgkin sont parmi les meilleurs répondeurs aux anti-PD-1 et anti-PD-L1 (Dieu-Nosjean and Caux 2019).

6.4 La radiothérapie

Il existe deux formes de radiothérapie : la radiothérapie externe est le traitement de référence, au cours de celui-ci des radiations sont émises à travers la peau jusqu'à la tumeur et une partie du tissu qui l'entoure. La radiothérapie détruit les cellules cancéreuses grâce à des rayons ou à des particules de haute énergie pouvant réduire la taille de la tumeur avant d'autres traitements comme la chirurgie. Elle est le plus souvent administrée pour traiter le cancer du rectum et est souvent associée à la chimiothérapie. La radiothérapie peut être aussi administrée après un traitement pour détruire les cellules cancéreuses qui persistent après la chirurgie afin de réduire le risque de récidive ou pour traiter le cancer si le patient n'est pas en état de subir une chirurgie ou pour soulager la douleur ou contrôler les symptômes à un stade avancé (Häfner and Debus 2016; Tam and Wu 2019).

Il existe également la radiothérapie interne, ou curiethérapie, qui permet de placer une substance radioactive appelée radio-isotope directement au niveau de la tumeur (Tam and Wu 2019).

6.5 Les stratégies thérapeutiques

Les stratégies thérapeutiques diffèrent en fonction du stade tumoral, de l'état général du patient et des critères histologiques et moléculaires. Ci-dessous un tableau récapitulatif des différentes approches possibles dans le CCR (*cf* tableau III).

Tableau III : Stratégie thérapeutique suivant les stades du cancer colorectal

	Cancer colorectal localisé		Cancer colorectal métastatique		
	Colon	**Rectum**	**MSI**	**MSS**	**BRAF mutée**
1)	**Chirurgie**	**Radio-chimiothérapie :** 5-FU et 50 Gy +/- **Chimiothérapie préalable :** FOLFIRINOX	**Immunothérapie :** Pembrolizumab (anti PD1) Ipilimumab + Nivolumab	**Chimiothérapie :** FOLFOX FOLFIRI FOLFIRINOX Trifluridine-Tipiracil + **Thérapie ciblée :** Bévacizumab Aflibercept Cétuximab (non KRAS mutée) Panitumumab (non KRAS mutée)	**Chimiothérapie :** FOLFOX FOLFIRINOX + **Thérapie ciblée :** Bévacizumab
2)	**Chimiothérapie adjuvante :** 5-FU - oxaliplatine (CAPOX ou FOLFOX) 3 à 6 mois	**Chirurgie**	**Si progression :** **Chimiothérapie :** FOLFOX FOLFIRI FOLFIRINOX Trifluridine-Tipiracil + **Thérapie ciblée :** Bévacizumab Aflibercept Cétuximab (non KRAS mutée) Panitumumab (non KRAS mutée)	**Dernière ligne thérapeutique :** Régorafénib	**Seconde lignée thérapeutique :** Encorafénib-cétuximab
3)		**Chimiothérapie adjuvante :** 5-FU – oxaliplatine (CAPOX ou FOLFOX) 3 à 6 mois	**Dernière ligne thérapeutique :** Régorafénib		**Troisième lignée thérapeutique :** FOLFIRI + Aflibercept ou Bévacizumab

Malgré des avancées majeures depuis une vingtaine d'années, certains patients répondent encore peu ou pas du tout aux traitements et il est nécessaire de valider de nouvelles cibles et de nouvelles molécules afin de combattre ces phénomènes de résistance. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à la signalisation calcique et plus particulièrement à la signalisation calcique mitochondriale. Voir l'annexe III dont je suis co-auteure sur la signalisation calcique comme nouvelle voie thérapeutique des cancers.

Chapitre 2 : La signalisation calcique

Le calcium (Ca^{2+}) représente le minéral le plus abondant du corps humain. Les os et les dents en sont les sites de stockage principaux (99 %). Les 1 % restants sont retrouvés dans les liquides intra- et extracellulaires et participent à de nombreux processus physiologiques tels que la coagulation sanguine, la contraction musculaire, la conduction nerveuse, la libération d'hormones. Le Ca^{2+} est considéré comme un second messager moléculaire essentiel à la régulation de nombreux processus cellulaires dans les cellules excitables ou non excitables, tels que le métabolisme cellulaire, la sécrétion, le relargage de neurotransmetteurs, la migration et la prolifération cellulaire, l'apoptose et la transcription de gènes (M. J. Berridge, Lipp, and Bootman 2000; Michael J. Berridge, Bootman, and Roderick 2003). Le Ca^{2+} peut-être retrouvé dans divers organites intracellulaires fonctionnant comme des sites de réserves calciques, comme les mitochondries, le noyau, l'appareil de Golgi ainsi que le réticulum endoplasmique, ce dernier constitue la plus importante réserve calcique intracellulaire (Monteith, Prevarskaya, and Roberts-Thomson 2017). Il possède également une dynamique particulière via la régulation fine de sa répartition à travers les différents compartiments subcellulaires et des milieux intra/extracellulaires. La concentration de Ca^{2+} en condition physiologique dans le milieu extracellulaire se situe entre 1,2 mM et 2 mM, la concentration de Ca^{2+} intracellulaire dans le cytosol est aux alentours de 100 nM. Lorsque la cellule reçoit certains stimuli, comme les facteurs de croissances, extracellulaire au niveau de la membrane plasmique, l'activation de voie de signalisation spécifique peut permettre des variations de la concentration interne en calcium pouvant augmenter localement jusqu'au micromolaire.

Les cellules grâce à l'activité des différents transporteurs, pompes, canaux et échangeurs ioniques et des protéines de liaison ou de séquestration du Ca^{2+} disposent d'un arsenal d'outils permettant le contrôle précis de l'homéostasie calcique entre les différents compartiments extra et intracellulaire (Michael J. Berridge, Bootman, and Roderick 2003). Les différentes localisations de ces éléments aussi bien sur la membrane plasmique (MP) que sur la membrane des organites intracellulaires permettent de façonner spatialement les régulations des concentrations calciques. La spécificité d'un signal calcique peut être déterminée en fonction de la variation de plusieurs paramètres que sont la localisation, l'intensité, la fréquence et la durée de ces variations. Ces différentes particularités élaborent une réponse physiologique unique.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons principalement à la signalisation calcique mitochondriale. Nous aborderons plus succinctement les autres composantes impliquées dans le maintien de l'homéostasie calcique cellulaire.

1. Les acteurs de la membrane plasmique

Dans les cellules excitables, les canaux voltage-dépendants (Ca_v) sont majeurs dans les processus cellulaires tels que la contraction musculaire, la neurotransmission et la sécrétion, permettant de convertir les variations de potentiel de membrane en un signal calcique intracellulaire. Les canaux Ca_v sont des hétéromultimères composés d'une sous-unité α1 formant des pores, d'une sous-unité régulatrice β et de sous-unités α2, γ et δ (Tevoufouet et al. 2014).

Dans les cellules non excitables, les canaux indépendants du voltage sont les canaux Transient Receptor Potential (TRP) et les canaux Orai sont localisés au niveau des membranes plasmiques. L'entrée de Ca^{2+} via ces deux familles de canaux peut se faire par plusieurs voies telles que l'entrée de calcium dépendante du relargage des réserves calciques intracellulaires que l'on nomme entrée SOCE pour Store Operated Calcium Entry ou par un type d'entrée de calcium totalement indépendante des vidanges intracellulaires de Ca^{2+} que l'on nomme entrée SICE pour Store Independent Calcium Entry. Cette dernière entrée englobe à la fois la voie d'entrée constitutive de Ca^{2+} et la voie ARC (Arachidonic acid-Regulated Calcium-selective channel) (*cf* figure 6).

1.1 Les différentes voies d'entrée du Ca^{2+}

1.1.1 L'entrée SOCE

L'entrée SOCE est définie par un influx calcique provenant du milieu extracellulaire activé suite à une libération des réserves de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (RE). Dans des conditions physiologique ce type d'influx est initié par la fixation d'un agoniste, sur un récepteur couplé aux protéine G (RCPG) ou encore sur un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), situés sur la membrane plasmique. Ce processus active la phospholipase C (PLC) qui transforme le PIP_2 (phosphatidylinositol-4-5- biphosphate) en deux composés distincts : le diacylglycérol (DAG) et l'IP_3 (inositol-1,4,5-triphosphate). Ce dernier se fixe ensuite sur ses récepteurs (IP_3R) situés à la membrane du RE provoquant la sortie de Ca^{2+} depuis le compartiment endoplasmique

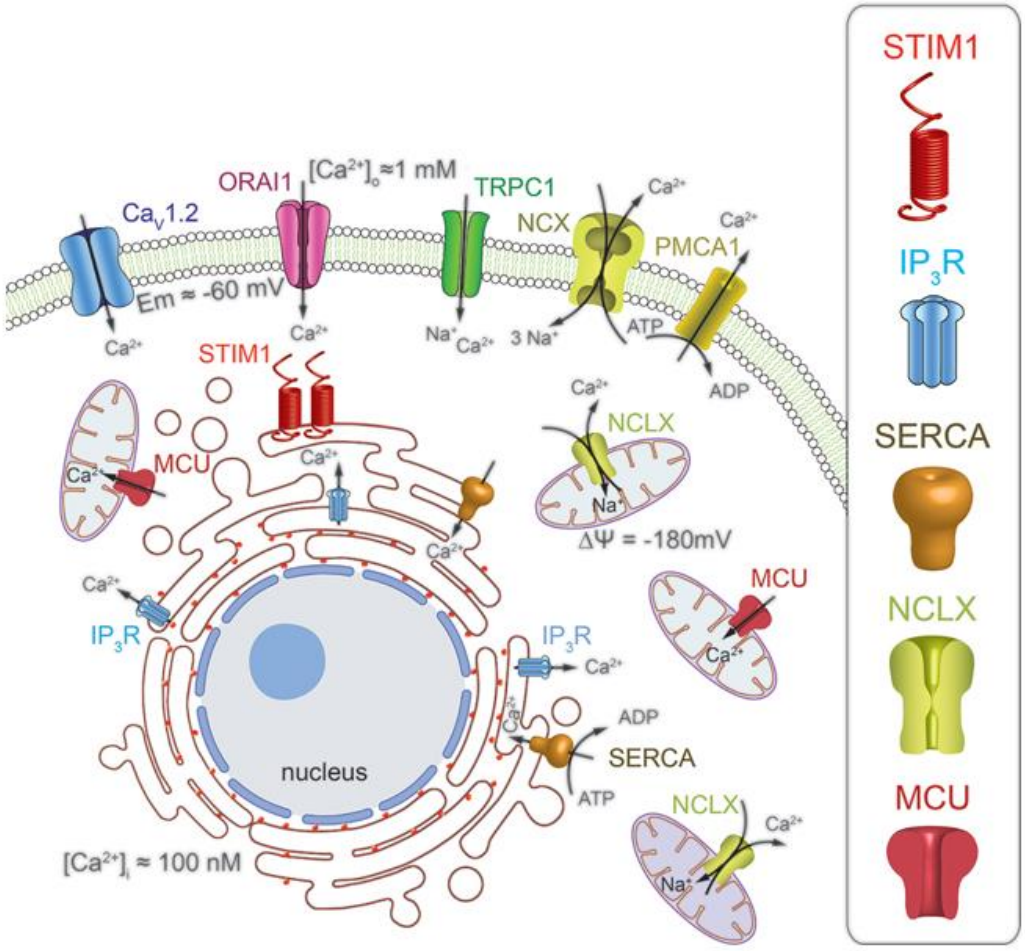
vers le cytosol. Suite à la vidange du RE de ces réserves calciques, les protéines STIM1/2 (stromal interaction molecule 1 ou 2) localisées au niveau de la membrane du RE, s'oligomérisent et vont se transloquer à la membrane plasmique pour se lier aux canaux Orai et TRPC. Cette liaison physique entraîne un changement conformationnel des protéines Orai/ TRPC, permettant de les activer et par conséquent aboutir à une entrée de Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le cytosol (Prakriya and Lewis 2015).

1.1.2 Les entrées SICE

A contrario des entrées de type SOCE, les entrées SICE se caractérisent par une absence de vidange des réserves de Ca^{2+} réticulaire. Cette voie rassemble des canaux tels que les ROC (Receptor-Operated Channel), les SMOC (Second Messager-Operated Channel), les ARC et les SAC (Stretch-Activated Channel). L'influx calcique induit par les ROC passe par l'activation de RCPG. Cela provoque l'activation de la PLC qui clive le PIP_2 en IP_3 et DAG. Le DAG peut activer de façon directe certains TRPC. Il existe également une activation indirecte des autres TRPC par leur phosphorylation par la protéine kinase C (PKC). Par ailleurs, de faibles concentrations en agoniste sont capables d'activer les RCPG et de produire de l'acide arachidonique (AA) via la PLC et la phospholipase A2 (PLA2) ce qui induit des signaux calciques oscillatoires identifiés comme des influx ARC (Arachidonate Regulated Calcium entry) (Mignen et al. 2005). Cet influx de Ca^{2+} repose sur la présence d'un pool de la protéine STIM1 constitutivement active à la membrane plasmique et permettant l'activation d'un hétéropentamère formé de Orai1/3 sensible à l'AA (Mignen, Thompson, and Shuttleworth 2009).

La voie SICE rassemble également l'influx constitutif correspond à une entrée de Ca^{2+} favorisé par le gradient électrochimique du milieu extracellulaire vers le cytosol sans implication des stocks calciques du RE, indépendante des protéines STIM réticulaire. Ce type d'entrée est favorisé dans le cadre d'une hyperpolarisation membranaire ou certaines composantes ioniques différentes comme les canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} et certains canaux calciques non voltage dépendant vont s'unir pour former des complexes fonctionnels permettant des entrées de calcium de manière constitutives. Plus particulièrement les travaux du laboratoire N2C ont montré l'activation d'un canal potassique SK3 activé par le calcium intracellulaire entraîne une sortie d'ions K^+ qui hyperpolarise la membrane augmentant ainsi

la force électromotrice pour le Ca^{2+} conduisant à son entrée par les canaux Orai1 et TRPC1 (Chantôme et al. 2013) (pour revue Mignen et al. 2017).



<u>Figure 6 : Schéma représentatif des différents acteurs impliqués dans les voies d'influx et d'efflux de Ca^{2+} au niveau de la membrane plasmique et des compartiments subcellulaires (D'après Tajada and Villalobos 2020)</u>

La voie d'influx de Ca^{2+} depuis l'espace extracellulaire est médiée par l'action combinée des canaux calciques voltage-dépendants, des canaux calciques SOCE (Orai) et les protéines associées (STIM) et les canaux TRP. La voie de libération du Ca^{2+} du RE est médiée par le récepteur IP_3R. La voie d'influx de Ca^{2+} dans la mitochondrie est médié par l'uniporteur MCU et la voie d'efflux de Ca^{2+} dans la mitochondrie est médiée par NCLX. Les SERCA sont qualifiées de pompes à Ca^{2+} responsables de la recapture du Ca^{2+} cytosolique par le RE. Enfin, la voie d'extrusion du Ca^{2+} du cytoplasme est régulée par la Ca^{2+} ATPase de la membrane plasmique (PMCA) et l'échangeur Na^{+} /Ca^{2+} (NCX).

1.2 Les différents influx calcique dans le cancer colorectal

L'ensemble des flux calciques SOCE, SICE et constitutif contrôlent l'homéostasie calcique cellulaire et ces acteurs sont particulièrement dérégulés lors du processus cancéreux (Déliot and Constantin 2015; Smani et al. 2015; Prevarskaya, Skryma, and Shuba 2018). Dans cette partie un bref état de la littérature a été réalisé, l'ensemble des acteurs ne sont pas détaillés.

1.2.1 L'influx calcique SOCE dans le cancer colorectal

L'influx SOCE est décrit comme jouant un rôle critique dans les différentes étapes du processus tumoral, telles que la prolifération des cellules cancéreuses, le développement de métastases, la néo-vascularisation tumorale, ainsi que dans l'immunité antitumorale (pour revue Xie et al. 2016). De plus en plus de preuves démontrent que dans divers types de cancer dont le cancer colorectal, l'influx calcique SOCE est augmenté. Les protéines essentielles au SOCE comme STIM1 et les canaux Orai (Orai1) peuvent être surexprimées dans le CCR (Zang et al. 2019; Huang et al. 2020). La surexpression de STIM1 provoque une expression régulée positivement de la COX-2 et de PGE2 favorisant ainsi la transition épithélio-mésenchymateuse et l'augmentation de la motilité cellulaire dans le CCR (Zhang et al. 2015; Wang et al. 2015). De plus, la formation d'un complexe tel que TRPC1, Orai1 et SK3 (canal potassique 3 activé par le Ca^{2+}) favorise l'augmentation de la migration cellulaire dans le CCR (Guéguinou et al. 2016). La canal potassique de conductance intermédiaire activé par le Ca^{2+} (SK4) augmente l'influx SOCE et la production de ROS favorisant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses de CCR (Ibrahim et al. 2021).

1.2.2 Les influx calciques SICE dans le cancer colorectal

L'augmentation du ratio Orai3/Orai1 a été observée lors du développement tumoral dans plusieurs types de cancers, comme les cancers du sein, de la prostate et colorectal (Azimi et al. 2019; Dubois et al. 2014; Ibrahim et al. 2019). Dans le cas du cancer de la prostate, la surexpression du canal Orai3 favorise une augmentation de l'entrée de Ca^{2+} induite par l'AA, stimulant ainsi la prolifération cellulaire (Dubois et al. 2014). De plus, le rapport Orai3/Orai1 au cours du développement du CCR suggère un remodelage de l'entrée calcique, caractérisé par la transition d'une voie SOCE vers une voie SICE (Ibrahim et al. 2019).

En dehors des influx SICE stimulés par l'AA, des travaux proposent la présence d'un autre type d'influx calcique induit sans stimulation par un agonistique que l'on nomme influx constitutif

de Ca^{2+}. Ce type d'influx est souvent la résultante d'une association entre des canaux potassiques sensibles aux variations de calcium intracellulaire et les canaux Orai ou TRP (pour revue Mignen et al. 2017). Au cours de cet influx, l'activation des canaux potassiques sensibles aux Ca^{2+} va produire une hyperpolarisation membranaire augmentant ainsi la force électromotrice en faveur d'une entrée de Ca^{2+} par les canaux Orai/TRP. Dans le cas du CCR, aucune étude ne démontre une fonction cellulaire liée spécifiquement à ce type d'influx de Ca^{2+}. A l'heure actuelle, il a seulement été démontré que la surexpression du canal SK4 favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses en augmentant à la fois les influx constitutif et SOCE (Ibrahim et al. 2021).

1.3 La signalisation calcique du réticulum endoplasmique

Le RE est l'organite principal de stockage intracellulaire de Ca^{2+} et il est capable de maintenir l'homéostasie calcique (Krebs, Agellon, and Michalak 2015). Sur sa membrane, le RE contient divers canaux tels que l'IP_3R qui est responsable de la libération du Ca^{2+}, le récepteur de la ryanodine (RyR) qui est un analogue des récepteurs IP_3, stimulant la sortie de Ca^{2+} vers le cytosol (Yamaguchi 2020), la pompe Ca^{2+} du reticulum sarco/endoplasmique (SERCA) qui est le principal transporteur du Ca^{2+} du cytosol vers le réticulum sarco-endoplasmique (Rahate, Bhatt, and Prabhavalkar 2020) et d'autres protéines liant le Ca^{2+}, comme par exemple la calséquestrine, la sarcoluménine ou la calréticuline (Rossi et al. 2014).

1.3.1 Le réticulum endoplasmique dans le cancer colorectal

Il existe 3 sous-types de récepteurs IP_3 : IP_3R1, IP_3R2, IP_3R3. Dans le CCR l'expression des transcrits des gènes IP_3R1 et IP_3R3 sont surexprimées alors que l'expression des transcrits du gène IP_3R2 est diminuée (Pérez-Riesgo et al. 2017). Le récepteur IP_3R3 lié à l'agressivité du CCR (Shibao et al. 2010). Il a également été décrit que l'expression des transcrits des isoformes 1 et 3 du gène RyR est augmentée et à l'inverse diminuée pour l'isoforme 2 dans le CCR (Pérez-Riesgo et al. 2017). En ce qui concerne les pompes SERCA, il a été démontré que l'expression des transcrits du gène SERCA1 est diminuée alors que l'expression des transcrits du gène SERCA2 est augmentée dans le CCR (Pérez-Riesgo et al. 2017).

1.4 L'interaction réticulum endoplasmique – mitochondrie

Les MAMs (mitochondria-associated membrane), sont le lieu d'échange privilégié du Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie. La distance entre le RE et la mitochondrie est de l'ordre de 10 à 60 nm (Rizzuto et al. 1998). La libération de Ca^{2+} par le RE *via* l'IP_3R localisé au niveau des MAMs, expose la mitochondrie à une augmentation importante de la concentration locale de Ca^{2+}, jusqu'à 10 fois supérieure au reste du cytoplasme (M et al. 2010). Plusieurs protéines localisées dans les MAMs telles que AKT, GRP75, Sigma-1R, Mfn-1/-2, BiP, *PERK, FATE* et IP_3R/VDAC régulent la libération de Ca^{2+} du RE et l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} aboutissant à des résultats fonctionnels différents. Les MAMs jouent également un rôle important dans le transport et le métabolisme des lipides, dans la dynamique mitochondriale et dans l'autophagie (Perrone et al. 2020).

1.4.1 Les MAMs dans le cancer colorectal

La mutation KRAS peut contrôler la signalisation calcique et la diaphonie du RE et de la mitochondrie au niveau des MAMs. Dans le CCR cette mutation diminue l'efflux de Ca^{2+} induite par l'IP_3 en raison d'une diminution de la quantité de Ca^{2+} dans le RE (Pierro et al. 2014). De nombreuses protéines impliquées dans les MAMs ont des expressions dérégulé dans le CCR. La surexpression de la protéine GRP75 a été associée à la progression tumorale dans de nombreux cancers (Wadhwa et al. 2006; Dundas et al. 2005) dont le CCR (Dai et al. 2021). De plus, la protéine Sigma-1R est connue pour réguler la survie cellulaire et les flux calciques dans les MAMs en pilotant les interactions ou l'activité des récepteurs IP_3 et les canaux VDAC. Sigma-1R est surexprimée dans le CCR et dans divers cancers (Pontisso and Combettes 2021).

2. La signalisation calcique mitochondriale

La mitochondrie est considérée comme un site de stockage de Ca^{2+} pouvant varier d'un faible contenu en Ca^{2+} (100 nM) jusqu'à de fortes concentrations (0,5 à 2 µM). Cette modulation fine de l'homéostasie calcique mitochondriale joue un rôle fondamental dans les processus physiologiques (Rizzuto et al. 2012). L'absorption de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale nécessite le passage de cet ion à travers les membranes mitochondriales interne et externe via des canaux ou échangeurs spécifiques. Les variations de concentration calcique cytosolique peuvent être absorbées par les mitochondries. En effet, la mitochondrie est capable de stocker transitoirement le Ca^{2+} sous forme libre ou sous forme de phosphate de

Ca^{2+}. Les mitochondries jouent donc un rôle de tampon calcique gérant des niveaux de calcium intracellulaire compris entre 50 et 500 nM dans de nombreux types cellulaires (Romero-Garcia and Prado-Garcia 2019).

2.1 La structure de la mitochondrie

La structure de la mitochondrie a été mise en évidence par Palade et Sjöstrand grâce à l'utilisation de la microscopie électronique (Palade 1953; Sjöstrand 1953). Les mitochondries sont des organelles cytosoliques entourées de deux membranes (externe et interne) (*cf* figure 7). Le nombre de mitochondries est compris entre 500 et 2 000 par cellule mais varie en fonction du type cellulaire. Sa taille varie de 0,1 à 0,5 µm de diamètre et 0.1 à 2 µm de longueur.

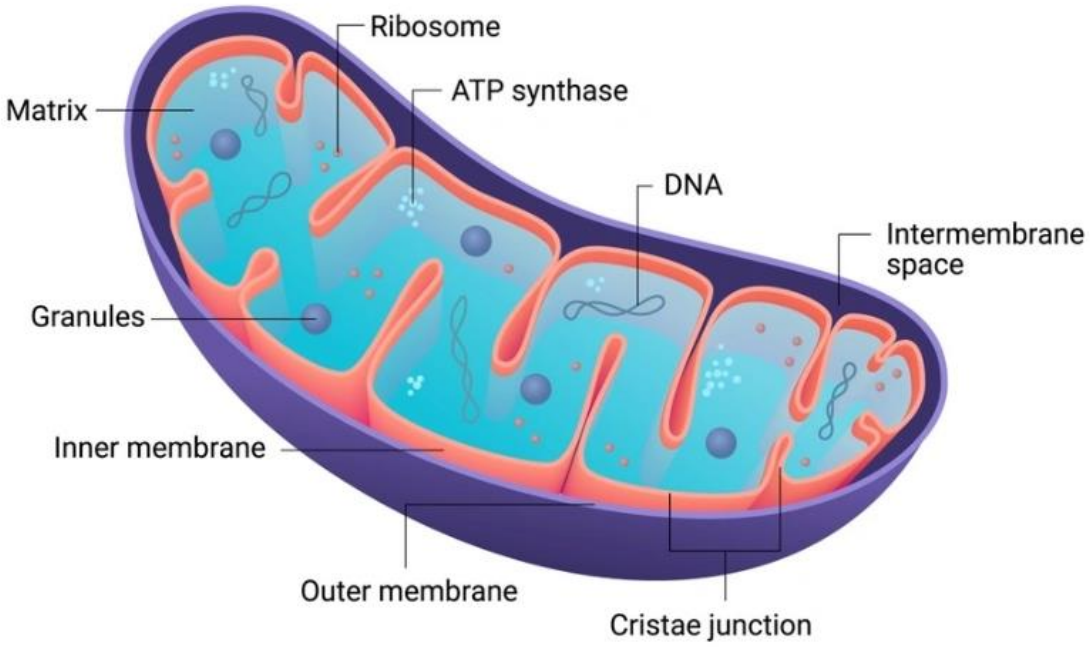


Figure 7 : Structure schématique d'une mitochondrie (D'après Microbial Notes in Cell Biology, M.IQBAL 2022)

Les « Cristae » ou crêtes sont les plis irréguliers de la membrane interne, ils augmentent l'espace nécessaire aux réactions chimiques (cycle de Krebs, synthèse d'ATP…). Les « granules » sont des granules d'ARN mitochondriaux. Les « ribosomes mitochondriaux » permettent la biosynthèse de protéines membranaires pour la chaîne de transport d'électrons (ETC) et le

complexe protéique générant l'ATP. La membrane externe et interne, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale sont décrites ci-dessous.

2.2 L'entrée de calcium dans l'espace intermembranaire mitochondrial

L'entrée de Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie se fait via la membrane externe, celle-ci entoure la totalité de la mitochondrie par une bicouche lipidique composée d'environ 50 % de protéines et 50 % de lipides (principalement des phospholipides insaturés et un peu de cholestérol), pouvant atteindre 7 nm d'épaisseur. Cette membrane dispose de nombreux canaux ou transporteurs ioniques tels que le canal VDAC (Voltage-dependent anion channels) et les porines qui rendent cette membrane perméable aux ions et à de petites molécules ou protéines pouvant atteindre jusqu'à 5 KDa .

Le canal anionique dépendant du voltage non spécifique VDAC est très perméable aux ions comme le Ca^{2+} (Rostovtseva et al. 2008). VDAC possède trois isoformes : VDAC1, VDAC2 et VDAC3 chez les mammifères. Les VDAC sont des protéines transmembranaires de 30 à 35 kDa composées d'environ 280 à 300 acides aminés, selon l'isoforme et l'espèce. Les isoformes de VDAC forment des pores en forme de tonneau constitués de feuillets β alignés dans une orientation antiparallèle. Une hélice N-terminale localisée dans le pore permet de réguler l'ouverture du canal (Ujwal et al. 2008). La régulation de l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} au niveau de la membrane mitochondriale externe peut se faire via la connexion étroite entre VDAC1 et le récepteur IP_3 (De Stefani et al. 2012; Azoulay-Zohar et al. 2004). Les protéines, quant à elles, passent à travers cette bicouche lipidique grâce à un signal d'adressage mitochondrial via des translocases (TOM : translocase of the outer membrane) (Wiedemann and Pfanner 2017). Les VDAC sont également impliqués dans le métabolisme cellulaire, en laissant passer l'ATP et d'autres petits métabolites à travers la membrane mitochondriale externe (Shoshan-Barmatz and Gincel 2003; Noskov, Rostovtseva, and Bezrukov 2013).

Dans divers types de cellules cancéreuses, il a été admis que VDAC1 est surexprimé mais son rôle reste ambigu (Shoshan-Barmatz et al. 2015). Il est quand même admis que VDAC1 est le principal canal qui laisse passer le Ca^{2+}.

2.3 L'entrée de calcium dans la matrice mitochondriale

L'entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale se fait au niveau de la membrane interne. Cette dernière possède comme la membrane externe, une bicouche lipidique mais différente

par sa composition avec 80 % de protéines et 20 % de lipides (phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) et les cardiolipines qui sont spécifiques de la membrane interne mitochondriale). Les cardiolipines sont des phospholipides qui rendent la membrane interne imperméable aux ions notamment aux protons. En raison de l'imperméabilité de cette membrane, celle-ci est riche en transporteurs (transport actif) et en complexes protéiques enzymatiques (chaîne respiratoire mitochondriale (CRM)). C'est dans la membrane interne que les replis complexes, appelés « crêtes » se forment et où se trouvent les protéines membranaires, ce qui permet d'optimiser le rendement énergétique global de la mitochondrie dans les processus de phosphorylation oxydative (OXPHOS). Les complexes de la CRM et les protéines UCP sont également insérés dans la membrane interne mitochondriale. Les UCP sont des protéines découplantes responsables de la thermogenèse, qui en catalysant les protons, les insèrent dans la matrice en court-circuitant l'ATP-synthase. Comme dans la membrane externe, il existe dans la membrane interne des translocases avec un moteur fonctionnant à l'ATP pour l'importation des protéines : Les TIM (Translocase of inner membrane) (Neupert and Herrmann 2007).

L'entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale interne est facilitée par le canal ou uniport hautement sélectif du Ca^{2+} MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). L'entrée de Ca^{2+} est favorisée par le fort potentiel électronégatif de la membrane mitochondriale interne ($\Delta\Psi m$) qui est d'environ -180 mV, et cette absorption est inhibée par le rouge de ruthénium (Y. Sharma and Garabadu 2020). Le $\Delta\Psi m$ est donc favorable à une entrée de cations, tels que le Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale (Giorgi, Marchi, and Pinton 2018). C'est l'activité de la CRM située sur la membrane interne mitochondriale qui est responsable de ce potentiel négatif (De Stefani et al. 2011). MCU est un complexe multimoléculaire de 480 kDa, s'activant pour des concentrations localisées de 10 µM à 20 µM de Ca^{2+}, qui présente une conductance relative aux cations divalents ($Ca^{2+} \approx Sr^{2+} \gg Mn^{2+} \approx Ba^{2+} > Mg^{2+}$) (Delgado and Long, 2022). Le pore est composé de MCU organisé en tétramère complexé pour chaque sous-unité MCU d'un peptide EMRE, qui est un régulateur de l'intégralité structural de l'uniporteur MCU. Cependant nous pouvons mentionner ici, que la stœchiométrie de la sous unité MCU et nombre du EMRE par tétramère de MCU est encore controversée, effet une étude démontre que deux peptides EMRE suffisent pour un tétramère MCU (Payne, Li, and Foskett 2020). Les sous-unités MCU formant le pore peuvent être assemblées avec des sous-unités inhibitrices

de MCU telles que MCUb ou MCUR1. Le complexe MCU est également composé de trois sous-unités protéiques régulatrices de l'absorption du Ca^{2+} : MICU1, MICU2 et MICU3 qui se trouvent dans l'espace intermembranaire (Baughman et al. 2011; Diego De Stefani et al. 2011; Sancak et al. 2013). L'uniport possède une forme en L inversé. Récemment, des bases de données structurales ont démontré que le complexe MCU présente une stœchiométrie 4:4:1:1 de MCU, EMRE, MICU1 et MICU2 (Fan et al. 2020). Lorsque la concentration de Ca^{2+} cytosolique est élevée, les protéines MICUs agissent comme des régulateurs positifs de l'activité du canal MCU, permettant l'absorption efficace du Ca^{2+} mitochondrial.

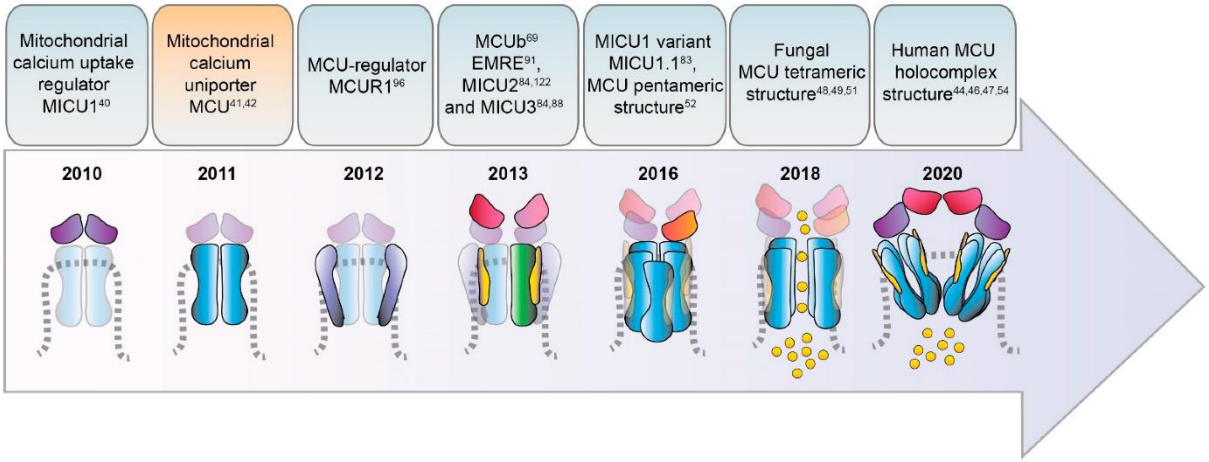


Figure 8 : Chronologie de l'identification des composants du complexe MCU (D'après Pallafacchina, Zanin, and Rizzuto 2021)

Ce schéma chronologique montre les différents composants du complexe MCU en fonction de la date de leur découverte. Dans l'année 2010, le régulateur MICU1 fut découvert, puis en 2011, l'uniporteur MCU. C'est à partir de 2012 que les différents régulateurs de MCU furent découverts (MCUR1, MCUb, EMRE, MICU2 et MICU3). A partir de 2016, les recherches concernant la véritable structure cristallographique du complexe MCU ont été réalisées.

L'activation de MCU peut se produire par deux mécanismes différents (*cf* figure 9) : un mécanisme de « gating », de manière dépendante du Ca^{2+} suite à la fixation des ions calcium sur les motifs EF-Hand des dimères des protéines MICU1 / MICU2 dans l'espace intermembranaire (Patron et al. 2014; Tsai et al. 2016). Le second mécanisme d'activation de MCU se fait de manière indépendante du Ca^{2+}, MCU nécessite une liaison avec la sous-unité EMRE pour présenter une activité de transport du Ca^{2+} (Tsai et al. 2016; Sancak et al. 2013; Kovács-Bogdán et al. 2014). Le dimère MCU/EMRE est relié par l'extrémité N-terminale de MCU dans la matrice et les sous-unités MICUs localisées dans l'espace intermembranaire (Fan et al. 2020; Zhuo et al. 2021; Wang et al. 2019; Wang, Baradaran, and Long 2020).

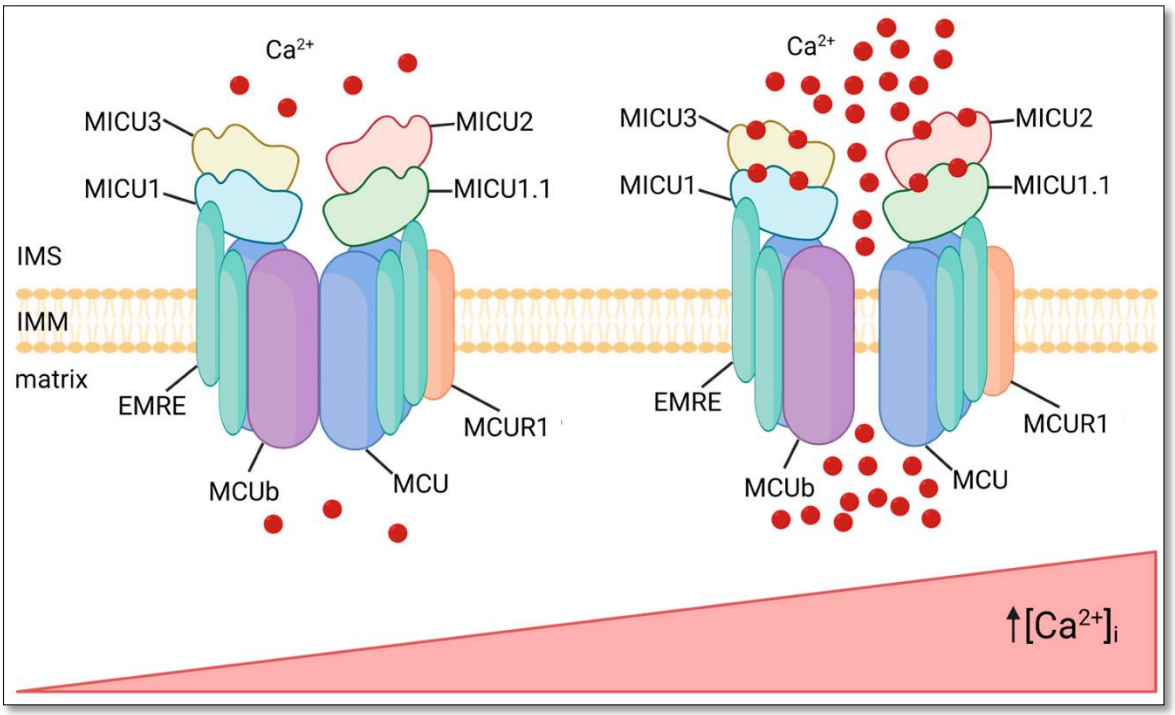


Figure 9 : Schéma représentatif de l'uniporteur MCU et de ses protéines régulatrices en présence de concentration faible ou élevée de Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire (D'après d'Angelo and Rizzuto 2023)

Le complexe MCU localisé dans la membrane interne mitochondriale (IMM) est composé des sous-unités formant le pore MCU et MCUb, des sous-unités régulatrices MICU1, MICU2 et MICU3 et de la protéine structurelle EMRE. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS) est détecté par les MICUs via les motifs EF, subissant ainsi des changements de conformation et permettant par la suite l'entrée de Ca2+ dans la matrice mitochondriale (matrix).

2.3.1 Les régulateurs de la signalisation calcique mitochondriale au sein du complexe MCU

a. MCUR1

MCUR1 (Mitochondrial Calcium Uniporter Regulator 1) est une protéine qui régule par sa stabilité MCU, ainsi que le métabolisme cellulaire (Adlakha et al. 2019). En effet, il a été démontré que la perte de MCUR1 ne modifiait pas la localisation de MCU, mais supprimait l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial, perturbait l'OXPHOS, diminuait la production d'ATP et activait l'autophagie dépendante de l'AMPK (Mallilankaraman et al. 2012; Tomar et al. 2016). L'interaction MCUR1-MCU, se fait *via* le « segment de tête » de MCUR1, qui est la partie responsable de sa liaison directe avec l'extrémité N-terminale de MCU (Adlakha et al. 2019).

b. MCUb

MCUb est un isoforme de MCU de 33 KDa, qui s'associe à ce dernier, formant des hétéro-oligomères (Raffaello et al. 2013) partageant 50 % de similarité de séquence avec MCU. Malgré cette forte similitude avec MCU, MCUb ne peut pas transporter le Ca^{2+} en raison de deux substitutions d'acides aminés. Cette différence d'acides aminés entre MCU et MCUb se situent au niveau de la région TM1 (Arginine pour MCU et Tryptophane pour MCUb) et de la région L1 (Acide glutamique pour MCU et Valine pour MCUb) (Raffaello et al. 2013). Des études démontrent que MCUb exerce un effet négatif sur MCU, réduisant l'absorption du Ca^{2+} (Lambert et al. 2019; Raffaello et al. 2013). La stœchiométrie de MCUb et de MCU est importante pour assurer le flux calcique mitochondrial. De plus, un rapport MCUb/MCU élevé présente un flux calcique mitochondrial diminué, à l'inverse un rapport MCUb/MCU faible présente un flux calcique mitochondrial augmenté et donc une accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie (Lambert et al. 2019; Huo et al. 2020).

c. EMRE

La protéine EMRE (gène *SMDT1*), est une protéine régulatrice de MCU (Sancak et al. 2013) de 10 KDa, possédant un domaine transmembranaire, un domaine N-terminal dans la matrice mitochondriale et un domaine C-terminal dans l'espace intermembranaire (Yamamoto et al. 2016; Tsai et al. 2016). EMRE est décrite comme essentielle dans l'interaction et l'assemblage de MCU avec MICU1 et MICU2 puisque la perte d'EMRE induit une diminution de l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} (Sancak et al. 2013; Tsai et al. 2016). EMRE stabilise également

l'ensemble du pore lorsque celui-ci est ouvert par son domaine N-terminal (Wang et al. 2019). Une étude plus récentes, a démontré que EMRE serait crucial pour la dimérisation du MCU puisque, en son absence, le canal MCU se retrouve sous forme de monomère (Wang et al. 2019). De plus , Vais et al proposent un rôle de EMRE comme senseur de la concentration calcique matriciel empêchant ainsi la surcharge de Ca^{2+} mitochondriale dans des conditions physiologiques (Vais et al. 2016).

d. MICU1

MICU1 est une protéine régulatrice de MCU, de 54 KDa, localisée dans la membrane mitochondriale interne (Hoffman et al. 2013), possédant deux motifs EF-hand essentielles à sa fonction (Plovanich et al. 2013; Perocchi et al. 2010). MICU1 s'ancre à MCU grâce à une interaction avec la protéine EMRE (Tsai et al. 2016). MICU1 n'est pas seulement une protéine régulatrice car elle semble également favoriser l'expression de MCU par des mécanismes de régulations encore inconnus. En ce sens, Csordás et al ont montré une réduction de l'expression de MCU suite à la suppression de MICU1 (Csordás et al. 2013). Lors d'une élévation du Ca^{2+} (supérieure à 1 µM) dans l'espace intermembranaire mitochondrial, le Ca^{2+} se lie aux motifs EF de MICU1 provoquant un changement conformationnel qui diminue l'interaction MCU-MICU1 et ouvre le pore MCU (Garg et al. 2021; Csordás et al. 2013; Petrungaro et al. 2015). A l'inverse lorsque la concentration de Ca^{2+} dans l'espace intermembranaire mitochondrial est inférieure à 1 µM, le pore MCU se ferme *via* des interactions électrostatiques apportées par le domaine alcalin pour MICU1 et l'anneau aspartate pour MCU (Paillard et al. 2018; Fan et al. 2020).

Pour des concentrations de Ca^{2+} élevées (supérieure à 1 µM) dans l'espace intermembranaire mitochondrial, la diminution d'expression de MICU1 entraîne une réduction de l'entrée du Ca^{2+} mitochondrial sans affecter ni la respiration mitochondriale, ni le potentiel membranaire (Perocchi et al. 2010). Pour des concentrations de Ca^{2+} faibles dans l'espace intermembranaire mitochondrial, l'absence de MICU1 entraîne la surcharge calcique mitochondriale qui confère une augmentation du stress oxydatif et l'induction de l'apoptose (Mallilankaraman et al. 2012). MICU1 est donc à la fois gardien de MCU à faible concentration de Ca^{2+} et régulateur positif de MCU à forte concentration de Ca^{2+}. La protéine MICU1 peut se lier à son paralogue MICU2 pour former un hétérodimère de 95 KDa, elle peut aussi se lier à MICU3 dans les

cellules ayant le même site d'interaction, par la cystéine. MICU1 peut également former des homodimères MICU1-MICU1 (Patron et al. 2019a).

En 2016, un variant de MICU1 a été découvert : MICU1.1, qui est un produit d'épissage alternatif de l'ARNm de MICU1 dans les muscles squelettiques (Reane et al. 2016) de 40 KDa se comportant comme un régulateur positif de MCU. En effet, l'expression de MICU1.1 augmente l'absorption mitochondriale de Ca^{2+}. La protéine MICU1.1 lie le Ca^{2+} avec une affinité plus élevée que MICU1 et, lorsqu'elle est hétérodimérisée avec la protéine MICU2, MCU est activé à des concentrations de Ca^{2+} inférieures à celles des hétérodimères MICU1 / MICU2 (Reane et al. 2016).

Les mécanismes d'ouverture ou fermeture du pore MCU par la protéine MICU1 sont contestés. Des études structurelles et biochimiques démontrent que MICU1 régule MCU en bloquant le pore lorsque le Ca^{2+} intermembranaire mitochondrial est faible. D'autres études suggèrent que MICU1 potentialise l'activité MCU de façon allostérique par l'intermédiaire de EMRE favorisant une stimulation de la production d'ATP (Garg et al. 2021; Fan et al. 2020; Zhuo et al. 2021). Récemment, Tsai et al ont proposé un mécanisme d'occlusion de MCU par MICU1 à l'encontre du modèle de potentialisation de MCU (Garg et al. 2021).
En effet, certains travaux n'ont pas détecté d'obstruction du pore, non pas parce que MICU1 ne pouvait pas bloquer le pore, mais parce que MICU1 se dissociait physiquement de MCU (Tsai et al. 2023).

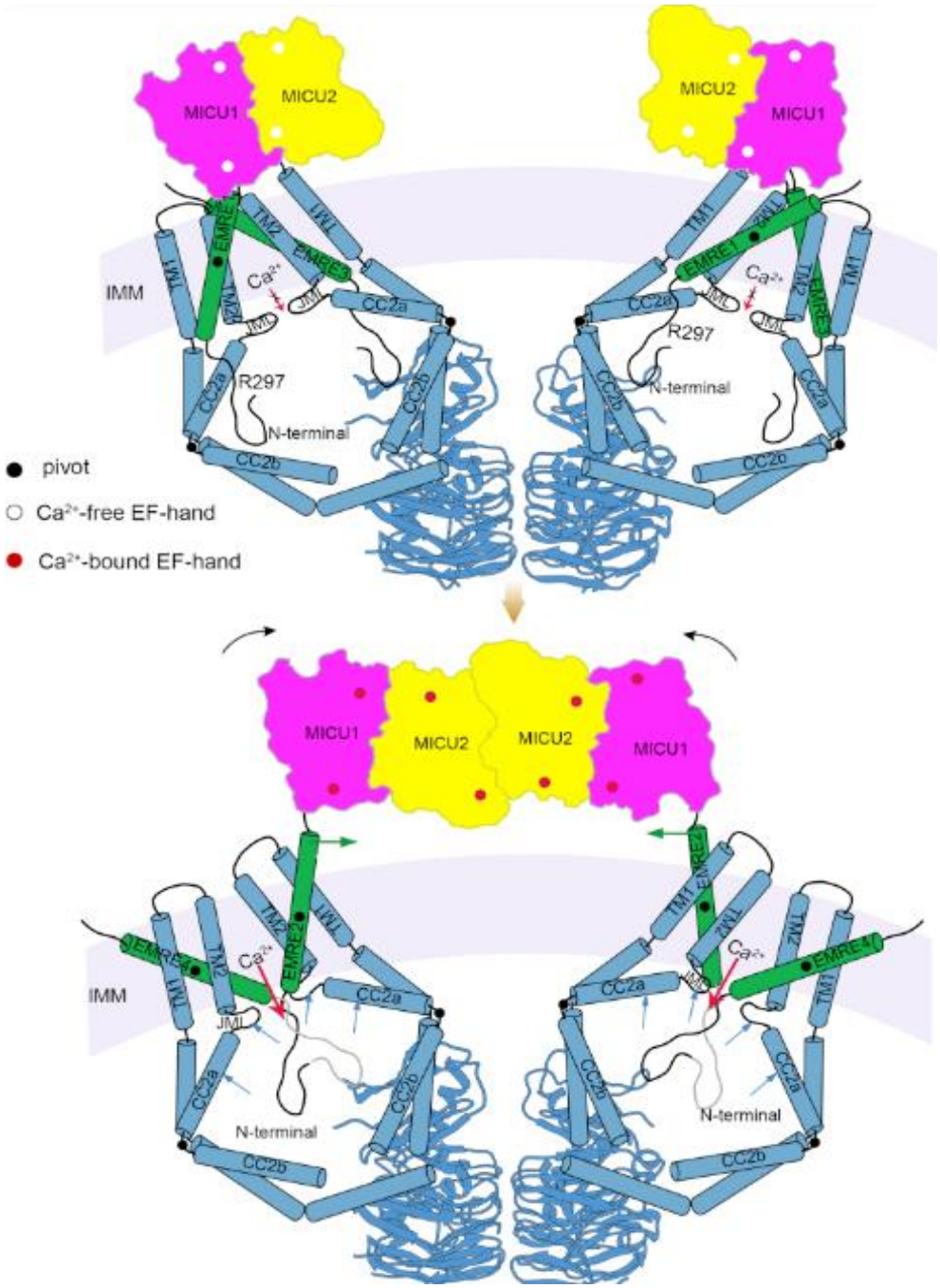


Figure 10 : Caractérisation structurelle du complexe MCU (D'après Wu, Zheng, and Jia 2021)

L'EMRE est attaché à la cavité ionique via l'épingle à cheveux β N-terminale et à l'hétérodimère MICU1-MICU2 via la queue C-terminale, respectivement. L'hélice CC2a est attachée à l'hélice transmembranaire (TM2) et à l'épingle à cheveux β de EMRE. Lorsque la concentration de Ca^{2+} cytosolique augmente, l'hétérodimère MICU1-MICU2 se dissocie du MCU et se déplace via des actions de levier entre EMRE et l'hélice CC2a de MCU, se réassemblant dans une configuration linéaire hétérotétramère.

e. MICU2

La protéine régulatrice MICU2 est composée d'un dimère, dans lequel chaque monomère possède une structure canonique à deux lobes avec une paire de motifs EF dans chaque lobe, liés ou non au Ca^{2+} (Wu et al. 2019). MICU2 est un paralogue de MICU1, qui partage 42 % de séquence homologue avec la protéine MICU1. MICU2 présente une séquence d'adressage mitochondriale sur sa partie N-terminal, les domaines de liaison aux Ca^{2+} avec les motifs EF sont quant à eux localisés sur C-terminal de la protéine (Plovanich et al. 2013). Le rôle de MICU2 dans la régulation de l'activité de MCU est médié par sa liaison à MICU1 et par la fixation des ions Ca^{2+} sur les motifs EF (Wu et al. 2020b). L'expression de MICU2 dépend principalement de MICU1, mais la réciprocité n'est pas prouvée, en effet la perte d'expression de MICU1 entraîne la perte de la protéine MICU2 mais la perte de MICU2 ne module pas l'expression de MICU1 (Kamer and Mootha 2014; Patron et al. 2014). Le rôle de MICU2 dans la régulation des flux calciques mitochondriaux est encore controversé.

De manière générale, MICU2 est présenté comme inhibiteur de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial, cependant certaines études contredissent ce rôle inhibiteur et présentent MICU2 comme un élément activateur de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial. Dans certains travaux la perte de MICU2 a tendance globalement à augmenter la quantité de Ca^{2+} intra-mitochondrial (Patron et al. 2014). A contrario, une étude a démontré qu'un déficit en MICU2 réduit l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial, et entraine une diminution de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, perturbant les fonctions mitochondriales avec un abaissement du rapport ATP/ADP dans les cellules β pancréatique (Vishnu et al. 2021).

MICU2 serait également impliqué dans le maintien des échanges de Ca^{2+} entre IP_3R et MCU au niveau des MAMs (Payne et al. 2017). Il serait aussi capable de réguler l'activité de MCU *via* MICU1 (Payne et al. 2017; Patron et al. 2014).

De plus, il est intéressant de noter que la majorité des travaux sur MICU1 ont certes regardé les niveaux d'expression de MICU1 mais ils ont oublié que sans ce dernier MICU2 ne peut jouer son rôle de régulateur de MCU du fait de l'absence de lien entre MCU et MICU2.

f. MICU3

MICU3 est principalement exprimée dans le système nerveux central (Plovanich et al. 2013; Márkus et al. 2016). La structure de MICU3 présente 34 % d'homologie de séquence avec MICU1 et 47 % avec MICU2, possédant deux domaines de motifs EF et un signal de ciblage mitochondrial. Par rapport à MICU1 et MICU2, MICU3 possède un domaine supplémentaire de 50 acides aminés dans la partie centrale de la protéine (Patron et al. 2019b). En revanche, MICU3 ne peut pas former de complexe avec MICU2, mais peut former un complexe physique avec MICU1 par formation d'un pont disulfure entre MICU1 et MICU3. Au niveau de l'activité calcique du canal MCU et à l'inverse de MICU2, MICU3 améliorerait fortement l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} via le canal MCU (Patron et al. 2019b).

2.4 L'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale

L'espace intermembranaire de la mitochondrie contient des protons expulsés au cours de l'OXPHOS, ainsi que des molécules de cytochrome c, qui confère à cet espace une charge positive. Dans cet espace, les concentrations ioniques du potassium, du calcium, du sodium et du chlore sont proches de celles retrouvées dans le cytosol.

La matrice mitochondriale est le compartiment interne de la mitochondrie qui possède son propre génome : l'ADN mitochondrial. L'ADN mitochondrial diffère de l'ADN nucléaire, en effet, celui-ci est circulaire et possède 16 569 paires de bases, avec une hérédité maternelle et présente de nombreuses mutations (100 fois plus que le génome nucléaire). Les mutations dans le génome mitochondrial sont associées à diverses formes de maladies humaines et également au vieillissement (Chial and Craig 2008).

La mitochondrie est l'une des plus importantes réserves calciques. Cette capacité de stockage du Ca^{2+} est obtenue principalement par sa complexation par les phosphates libres de la matrice intra-mitochondriale, formant des précipités de $Ca_3(PO_4)_2$ (Zoccarato and Nicholls 1982; Samanta, Mirams, and Parekh 2018) mais aussi par la fixation du Ca^{2+} aux phosphates des cardiolipines. Le Ca^{2+} intervient dans la régulation de plusieurs mécanismes dans la matrice mitochondriale. Tout d'abord, il intervient dans la régulation de l'OXPHOS, par la stimulation du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide tricarboxylique TCA) en activant le pyruvate déshydrogénase (PDH), l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase (αKG) (McCormack and Denton 1980; Hansford 1994). Le Ca^{2+} peut également stimuler directement la production d'ATP (Territo et al. 2000), et le flux à travers le complexe III de la

chaîne de transport d'électrons (ETC) (Murphy et al. 1990). L'oligomycine et certains agents découplants inhibent l'absorption de Ca^{2+} en dépolarisant la membrane mitochondriale entraînant une diminution de l'entrée de Ca^{2+} et altèrent également la production d'ATP mitochondrial par le complexe V ou par l'ATP synthase (De Marchi, Thevenet, et al. 2014). L'absorption de Ca^{2+} est cependant préservée en présence d'inhibiteurs spécifiques des complexes de la chaîne respiratoire, prouvant que c'est bien le potentiel ΔΨ induit par l'hydrolyse de l'ATP qui la favorise (Lehninger 1970). Le Ca^{2+} intervient dans l'apoptose *via* l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) mitochondrial, déclenché par des niveaux élevés de Ca^{2+} ou de ROS (Brustovetsky et al. 2002).

2.5 Sortie du calcium de la mitochondrie

2.5.1 L'échangeur NCLX

L'extrusion mitochondriale du Ca^{2+} est médiée par l'échangeur ionique $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ (sodium/calcium/lithium), situé au niveau de la membrane mitochondriale interne. La protéine NCLX est codée par le gène *SLC8B1* et catalyse l'échange de Na^+ ou de Li contre du Ca^{2+} (Palty et al. 2010; Giladi et al. 2019). Contrairement au processus d'influx de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale qui dépend d'un gradient électrochimique, le mécanisme d'efflux de Ca^{2+} mitochondrial est un mécanisme nécessitant de l'énergie pour permettre l'influx de 3 Na^+ et l'efflux de 1 Ca^{2+}. Actuellement la source énergétique nécessaire au fonctionnement de NCLX est mal connue, celle-ci pourrait emaner de l'hydrolyse de l'ATP qui est fournie par la CRM ou bien simplement par le différentiel de charge résultant de l'échange de 3 Na^+ contre 1 Ca^{2+}. A l'opposé de ce mécanisme, une seule étude réalisée sur des mitochondries dépolarisées et en présence de concentration calcique importante montre que NCLX pourrait fonctionner en mode inverse et participer à l'influx de calcium mitochondrial. L'échangeur NCLX possède donc un rôle important dans les échanges de Ca^{2+} au niveau des mitochondries. Des études récentes montrent une faible affinité de NCLX pour le Ca^{2+} et son rôle important lors des changements rapides et robustes du Ca^{2+} matriciel (Stavsky et al. 2021; Görlach et al. 2015).

Luongo et al ont démontré que l'efflux de Ca^{2+} mitochondrial est essentiel au maintien de la fonction mitochondriale et à la survie cellulaire et que l'augmentation de l'expression ou de l'activité de NCLX pourrait constituer une voie thérapeutique potentielle pour lutter contre

les maladies caractérisées par une dérégulation du Ca^{2+} telles que les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires ou cancers (Luongo et al. 2017). Des études récentes proposent que NCLX alimente le RE et le réticulum sarcoplasmique (RS) en Ca^{2+}, pouvant moduler diverses fonctions cellulaires telles que la rythmicité des cardiomyocytes. Les auteurs ont démontré une co-localisation importante de NCLX et de SERCA2, sur un modèle de cardiomyocyte et dans des modèles de surexpression dans les HEK293 (cellules mammifères couramment utilisée), suggérant que NCXL et SERCA2 sont spatialement et fonctionnellement couplés (Takeuchi and Matsuoka 2022).

2.5.2 Les échangeurs Ca^{2+}/H^{+}

Dans les cellules non excitables, l'efflux de Ca^{2+} est également médié par un échangeur H^{+}/Ca^{2+}. La protéine transmembranaire leucine zipper EF-hand-containing 1 (LETM1), a été identifiée comme une protéine mitochondriale qui rassure les échanges Ca^{2+}/H^{+} pouvant fonctionner de manière électroneutre en échangeant $2H^{+}/Ca^{2+}$ (Jiang, Zhao, and Clapham 2009). Lorsque les concentrations calciques mitochondriales sont faibles, LETM1 se comporte comme un médiateur de l'influx de Ca^{2+} d'une manière électrogène : un Ca^{2+} entrant pour un H^{+} sortant. A l'inverse lorsque les concentrations calciques mitochondriales sont élevées ou que le pH cytoplasmique est faible, LETM1 favorise l'efflux de Ca^{2+}. Seules quelques publications tendent à montrer l'implication de cet échangeur dans l'efflux de Ca^{2+}. A l'inverse, le rôle clair de l'échangeur NCLX dans l'extrusion de Ca^{2+} mitochondrial a été décrit par De Marchi et al (De Marchi, Santo-Domingo, et al. 2014) et par notre laboratoire (voir notamment les annexes I et II dont je suis co-auteure).

Récemment un nouvel échangeur ionique Ca^{2+}/H^{+} a été découvert TMBIM5 (pour Transmembrane BAX Inhibitor Motif contenant la protéine 5) (Lisak et al. 2015) localisé exclusivement au niveau de la mitochondrie (Oka et al. 2008). TMBIM5 a été décrit comme un régulateur de Ca^{2+} et plus particulièrement de l'homéostasie calcique mitochondriale (Austin et al. 2022; Lisak et al. 2015; Zhang et al. 2022), impliqué dans les échanges Ca^{2+}/H^{+}, et avec une interaction physique possible avec LETM1 (Austin et al. 2022).

2.6 Le pore de transition de perméabilité (PTP)

La surcharge calcique mitochondriale peut conduire à l'ouverture du PTP membranaire de la mitochondrie entraînant la rupture de la membrane mitochondriale externe, puis à la libération de Ca^{2+} dans le cytosol et à la mort cellulaire (Bernardi and Di Lisa 2015). Le PTP mitochondrial peut également s'ouvrir lorsqu'il y a des concentrations élevées de ROS. L'activation du PTP est donc dépendante du potentiel de membrane mitochondrial de la concentration en Ca^{2+} et en ROS de la matrice mitochondriale. Le PTP possède une conductance élevée (~ 1,3 nS) pour les ions et est capable de faire transiter des petites molécules d'un poids n'excédant pas les 1500 Da.

Des études récentes ont démontré que le complexe V de la CRM (ATP synthase) était un acteur central dans la transition de perméabilité mitochondriale, en effet puisque l'ATP synthase est capable de former de courants calciques par le biais du PTP (Mnatsakanyan and Jonas 2020). Mais ces études sont controversées, car la suppression des sous-unités de l'ATP synthase a démontré qu'un pore était toujours capable de se former (Carroll et al. 2019).

3. Liens entre signalisation calcique mitochondriale, métabolisme et cancer

Dans de nombreuses pathologies dont le cancer, il est maintenant admis que la signalisation et l'homéostasie calcique sont fortement dérégulées (Monteith, Prevarskaya, and Roberts-Thomson 2017). La dérégulation des flux du Ca^{2+} peut perturber la plupart des processus cellulaires, en effet la modulation d'un même canal peut contribuer à plusieurs « hallmarks » du cancer pouvant promouvoir la cancérogenèse (Hanahan 2022). Lorsque la signalisation calcique est dérégulée, le métabolisme mitochondrial peut être aussi impacté, puisque le Ca^{2+} est un acteur essentiel du métabolisme mitochondrial et stimule la synthèse des molécules d'ATP (*cf* figure 11).

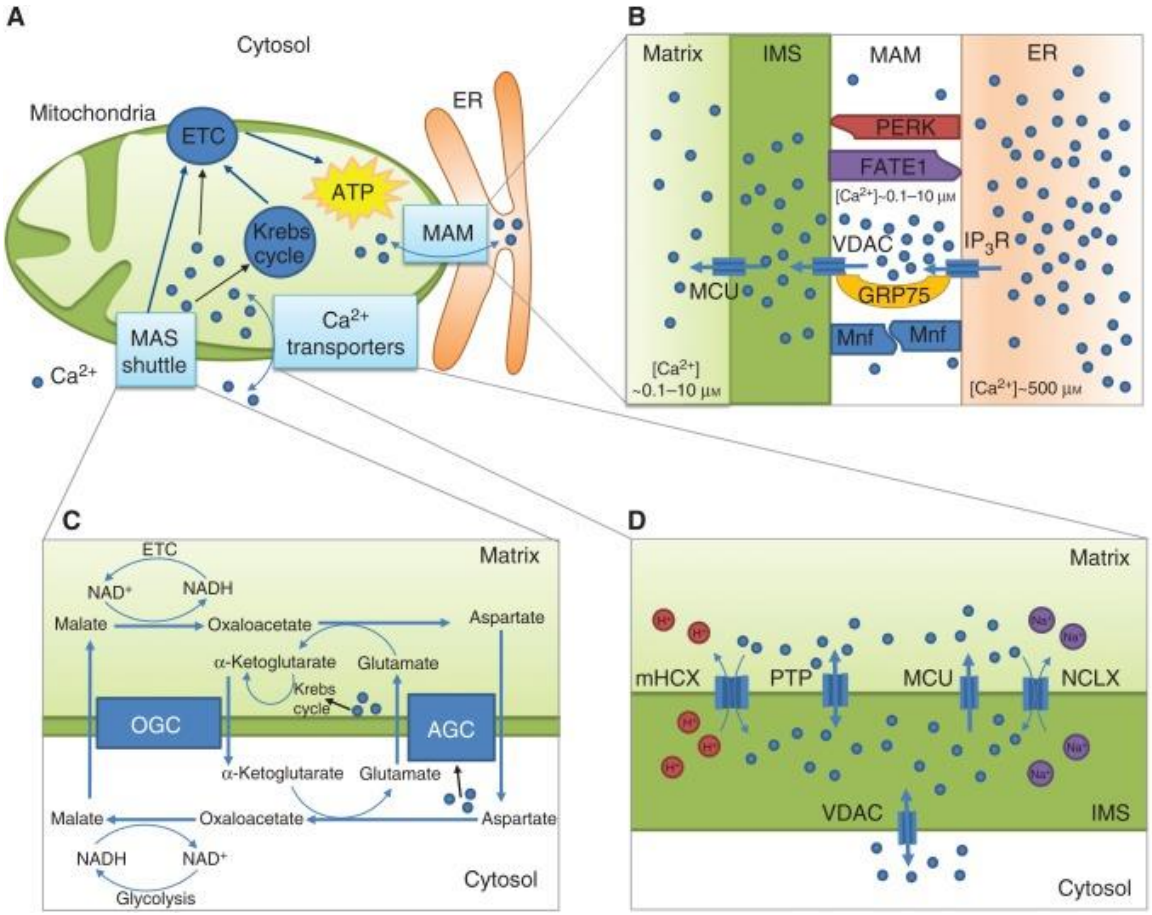


Figure 11 : Représentation schématique des aspects clés de la dynamique calcique mitochondriale en lien avec le métabolisme mitochondrial (D'après Wacquier, Combettes, and Dupont 2019)

(A) Les échanges de Ca^{2+} entre le cytosol et les mitochondries permettent l'activation du métabolisme mitochondrial, par stimulation du cycle de Krebs et de l'ETC. (B) Les MAM relient le RE et les mitochondries par des protéines de liaison telles que PERK, FATE, GRP75, Mfn, et d'autres. (C) Le NADH produit par la glycolyse est transféré dans les mitochondries par la navette malate-aspartate (MAS shuttle). Le transporteur aspartate-glutamate (AGC) est activé par le Ca^{2+} cytosolique. Lorsque la concentration de Ca^{2+} mitochondriale est élevée, l'activation du cycle de Krebs consomme de l'α-cétoglutarate et limite l'impact de la navette malate-aspartate. OGC signifie oxoglutarate ou α-cétoglutarate carrier. (D) Le Ca^{2+} traverse la membrane mitochondriale externe via le canal VDAC et la membrane mitochondriale interne par l'uniporteur MCU (absorption de Ca^{2+} mitochondriale), l'échangeur NCLX (extrusion de Ca^{2+} mitochondriale) et le PTP (lors d'une surcharge calcique mitochondriale).

3.1 Le canal VDAC dans le cancer

La signalisation calcique mitochondriale est modifiée dans les cellules cancéreuses. En raison de son emplacement dans la membrane externe mitochondriale et de sa fonction de transporteur et de régulateur, VDAC est un élément clé pour stimuler la glycolyse aérobie en activant le métabolisme mitochondrial (pour revue Heslop, Milesi, and Maldonado 2021). Il a donc été rapporté que la configuration du canal VDAC régule le flux des substrats respiratoires. Son activité influence les rapports ATP/ADP dans le cytosol pour favoriser ou inhiber le phénotype de prolifération cellulaire par modulation de l'effet Warburg (Spinelli and Haigis 2018). VDAC est considéré comme un biomarqueur pronostique dans certains types de cancer (Wersäll et al. 2021). Une expression élevée de VDAC1 est associée à un pronostic défavorable chez les patients atteints de cancers du poumon, du sein ou du foie (Yang et al. 2019).

3.2 Le complexe MCU dans le cancer

Depuis maintenant une dizaine d'année de nombreux travaux ont décrit le complexe MCU comme étant perturbé tant au niveau de son expression ou de son activité dans différents cancers. L'expression de MCU est élevée dans divers types de cancer, notamment le cancer du sein, le carcinome hépatocellulaire, le mélanome et le CCR (pour revue Vultur et al. 2018). Récemment il a été montré que l'expression accrue de MCU était associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR (Liu et al. 2020). Liu et al ont également démontré que la régulation de MCU augmente l'absorption du Ca^{2+} mitochondrial pour promouvoir la biogenèse mitochondriale et faciliter la croissance des cellules du CCR *in vitro* et *in vivo* (Liu et al. 2020). Dans le cancer du sein, l'expression de MCU est élevée, et la déplétion de MCU favoriserait l'apoptose (Curry et al. 2013). Par ailleurs, il a été rapporté que MCU jouait un rôle déterminant dans la croissance du cancer du sein triple négatif, en effet la suppression de MCU entraîne une diminution de la production de ROS mitochondriaux et de l'expression de HIF1α (Tosatto et al. 2016). Une étude a également indiqué que le Ca^{2+} mitochondrial élevé médié par MCU augmente la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate lorsque le PTP mitochondrial est altéré (Marchi et al. 2019). Il a été rapporté que RIPK1 interagit avec MCU pour favoriser la prolifération des cellules du CCR en augmentant l'absorption mitochondriale de Ca^{2+} et le métabolisme énergétique (Zeng et al. 2018). Dans le

CCR, l'inactivation de MCU présente une diminution de l'expression de DRP1 et de sa forme phosphorylée et une expression augmenté d'OPA1 (Liu et al. 2020).

Dans le mélanome, l'expression élevée de MCU entraîne l'augmentation de l'absorption de Ca^{2+} mitochondriale, l'augmentation de la synthèse d'ATP et de la production de ROS favorisant la prolifération et diminuant la migration et l'invasion augmentant ainsi la sensibilité aux traitements thérapeutiques et la survie des patients. A l'inverse, l'expression faible de MCU entraîne la diminution de l'absorption de Ca^{2+} mitochondriale, l'augmentation de la synthèse d'ATP et de la production de ROS et favorisant la diminution de la prolifération et l'augmentation de la migration et de l'invasion et participer à la résistance des traitements thérapeutiques et diminuant ainsi le taux de survie des patients (Stejerean-Todoran et al. 2022). D'autres études démontrent que le complexe MCU peut réguler la fonction des cellules immunitaires. En effet en absence de MCU, la prolifération des lymphocytes B est augmentée dans le CCR (Zhu et al. 2023; Yoast et al. 2021). De plus, les membres du complexe MCU ont été décrit également jouant un rôle dans la réponse immunologique dans le CCR (Zhu et al. 2023).

A l'heure actuel, la majorité des études dans le cancer se sont focalisées sur la protéine MCU codant le pore du canal MCU. Les études concernant le rôle des différents régulateurs de MCU sont encore peu investiguées.

Dans le cancer du sein, il a été décrit que l'expression de MCUb était diminuée (Tosatto et al. 2016). Mais très peu d'étude ont identifié le rôle de MCUb, EMRE et MCUR1 dans le cancer.

Dans le cancer de l'ovaire, l'inhibition de MICU1 inhibe la croissance, la migration et l'invasion *in vitro*, tandis que son inhibition *in vivo* inhibe la croissance tumorale et augmente l'efficacité du cisplatine et la survie globale (Chakraborty et al. 2017).

Chen et al ont démontré que l'expression des transcrits MICU2 était augmentée dans le cancer du pancréas (Chen et al. 2017) mais il n'y a pas d'autres articles publiés à ce jour étudiant le rôle de MICU2 dans un contexte cancéreux.

3.3 L'échangeur NCLX dans le cancer

L'échangeur NCLX est aussi dérégulé dans le cancer. Des études menées par Pathak et al ont démontré que l'expression de NCLX est diminuée dans les tumeurs de stades avancées du CCR. La régulation négative de NCLX favorise le développement métastatique par l'expression de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. La surcharge en Ca^{2+} dans la

matrice mitochondriale induite par la perte de NCLX est associée à une augmentation des ROS mitochondriaux qui activent l'expression de HIF1α soutenant la glycolyse, l'autophagie et le comportement métastatique des cellules tumorales coliques.

Cependant il a été montré que NCLX présente un rôle dichotomique dans le cancer colorectal, en effet bien que son absence favoriserait la progression tumorale et le développement métastatique sa présence serait nécessaire à l'initiation tumorale et développement de la tumeur primaire colique (Pathak et al. 2020).

Plus récemment il a cependant été montré que le sous type de patient CCR type MSI (10-20 %) surexprimé l'échangeur NCLX. Dans ces conditions, une étude réalisée au sein de notre laboratoire montre que le ciblage pharmacologique de NCLX réduit la prolifération *in vitro* et *in vivo* des CCR MSI. Ainsi l'inhibition de NCLX entraînent une augmentation des ROS et une dépolarisation de la membrane mitochondriale, conduisant à une réduction de la production d'ATP et à l'apoptose via l'activation du PTP (annexe II, Guéguinou et al. 2022).

3.4 La protéine LETM1 dans le cancer

L'expression de la protéine LETM1 est élevée dans le CCR, le cancer du sein et de la vessie et est de mauvais pronostic chez les patients (Piao et al. 2019; Huang et al. 2017; Li et al. 2015). Lorsque la protéine LETM1 est supprimée, la signalisation AMPK/mTOR est déclenchée, médiée par les ROS induisant l'autophagie et diminuant la prolifération des cellules du CCR (Che et al. 2021). De plus la surexpression de la protéine LETM1 induit une réduction du Ca^{2+} mitochondrial dans le cancer du poumon (Tran et al. 2022).

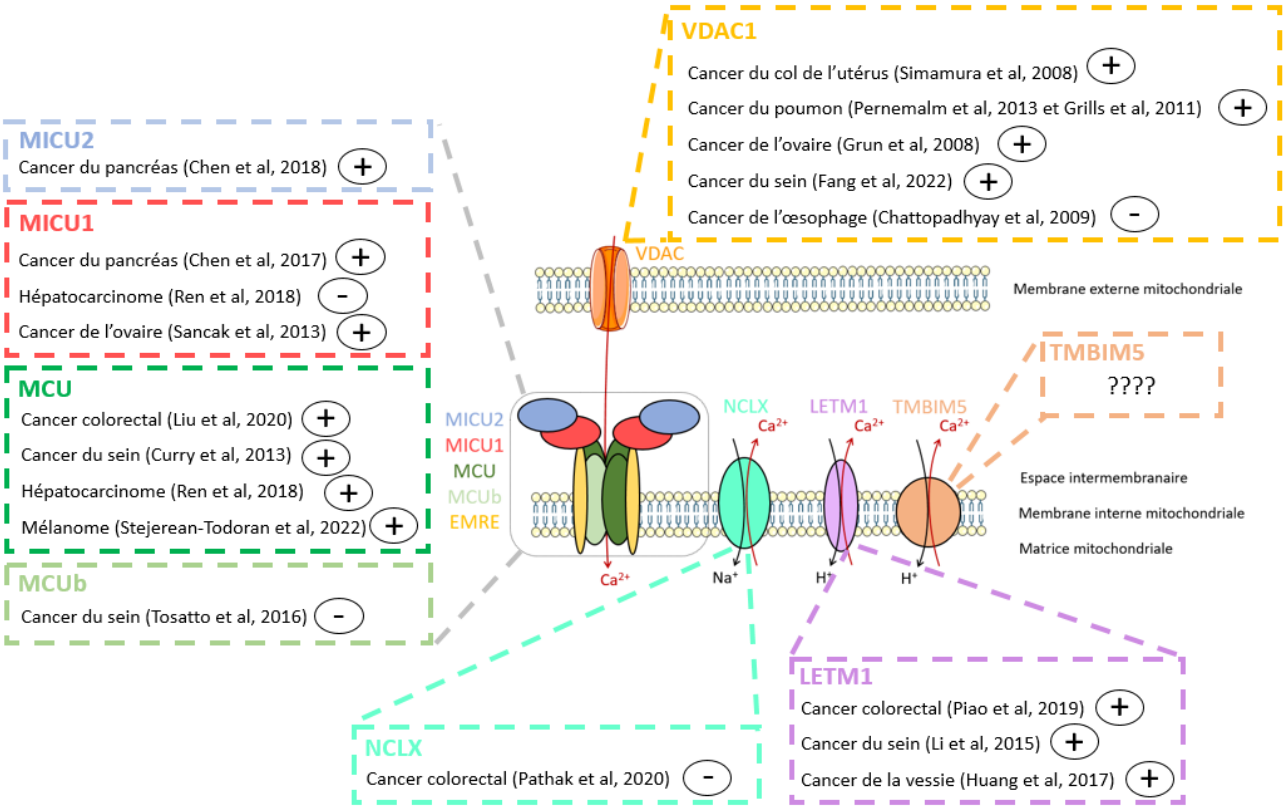


Figure 12 : Expression des acteurs du complexe MCU, de l'échangeur NCLX, de la protéine LETM1/TMBIM5 et du canal VDAC dans le cancer

Un équilibre entre l'influx et l'efflux de Ca^{2+} est essentiel pour maintenir l'homéostasie calcique mitochondriale, qui à son tour régule la dynamique mitochondriale, le métabolisme et le devenir cellulaire. Les perturbations de cette balance influx et efflux de Ca^{2+} pourrait être un élément central du développement physiopathologique comme le cancer (Diego De Stefani, Rizzuto, and Pozzan 2016; Pathak and Trebak 2018).

4. Dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont connues pour être des structures extrêmement dynamiques, avec une motilité et des déplacements constants dans la cellule. Cette dynamique permet d'assurer ainsi les échanges de contenu énergétique, et la production d'énergie au site d'utilisation. Ce dynamisme mitochondrial, en remodelage permanent, est opéré par des événements de fission et de fusion qui permettent de maintenir le transport orienté de mitochondries saines à travers la cellule, puis l'exécution d'événements cellulaires tels que la migration, la division et la polarisation. Lors de condition de stress, une perturbation de la dynamique mitochondriale est observée comme des altérations dans les processus de fission et de fusion. Par exemple, un stress léger induit une production de ROS modérée et une diminution de la production d'ATP, à l'inverse un stress excessif provoque une augmentation de ROS et une diminution de la production d'ATP, ce qui contribue à des anomalies au niveau des processus de dynamique mitochondriale. Lors d'un stress léger, les mitochondries ne sont pas affectées, puisqu'une réaction de compensation est mise en place par la dynamique mitochondriale, avec une fission pour éliminer les mitochondries anormales, ou par fusion pour échanger certains composants utiles pour la survie des mitochondries. En revanche, lors d'un stress élevé la dynamique mitochondriale est altérée et entraîne souvent la mort cellulaire (pour revue Ren et al. 2020). Le Ca^{2+} mitochondrial peut être régulé par la dynamique mitochondriale. Les Rho GTPase mitochondriales (Miro 1 et Miro 2) ont été décrits comme des senseurs cytosolique de Ca^{2+}, régulant la forme et le déplacement des mitochondries suite à des variations de concentrations de Ca^{2+} cytosoliques (Nemani et al. 2018). De plus, les auteurs ont démontré que l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique, sans augmentation de l'absorption de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale module la forme des mitochondries en « spaghetti ». Par opposition, une augmentation de la concentration de Ca^{2+} mitochondriale, sans l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique induit une mitochondrie en forme de « donut » (Nemani et al. 2018).

4.1 Mécanisme de la fission

La fission est un mécanisme par lequel une mitochondrie se divise, pour donner place à deux mitochondries distinctes (*cf* figure 13). Pour se diviser, les membranes interne et externe de la mitochondrie subissent une constriction puis une scission et, finissent par se refermer sur elles-mêmes pour constituer deux mitochondries non communicantes (Ji et al. 2015).

La constriction et la division de la membrane interne font suite à une augmentation du Ca^{2+} mitochondrial (Chakrabarti et al. 2018). La fission mitochondriale se produit donc toujours à proximité du RE permettant de subvenir aux besoins calciques (Hatch, Gurel, and Higgs 2014). La protéine Drp1, composante principale du mécanisme de fission, est une protéine de la famille des GTPases, celle-ci permet la constriction et la scission grâce à l'hydrolyse du GTP au niveau des sites de fission. L'extinction du gène DRP1 dans des cellules de mammifères (Smirnova et al. 1998) entraîne un réseau mitochondrial hyperfilamenteux et interconnecté. La phosphorylation de DRP1-S616 favorise la fission mitochondriale pendant la mitose (pour revue Liesa, Palacín, and Zorzano 2009). Cependant, la phosphorylation de DRP1-S637 induit le détachement de DRP1 des mitochondries et inhibe la fission mitochondriale (Wang et al. 2012). La protéine Fis1, fait également partie des composantes du mécanisme de fission, par sa surexpression qui induit une fragmentation mitochondriale dépendante de la protéine Drp1 (James et al. 2003). D'autres protéines telles que la GDAP1 interviennent grâce à une séquence riche en acides aminés basiques, à la fois dans la localisation mitochondriale et dans la fonction de fission mitochondriale (Wagner et al. 2009).

Twig et al ont démontré que la fission mitochondriale était un prérequis pour la mitophagie. En effet, ils ont observé que des mitochondries endommagées ne pouvant plus refusionner étaient dégradées par mitophagie (Twig et al. 2008).

Certains points sur les mécanismes de fission restent encore à être déterminés, notamment les acteurs de la fission et les signaux cellulaires à l'origine de ce mécanisme.

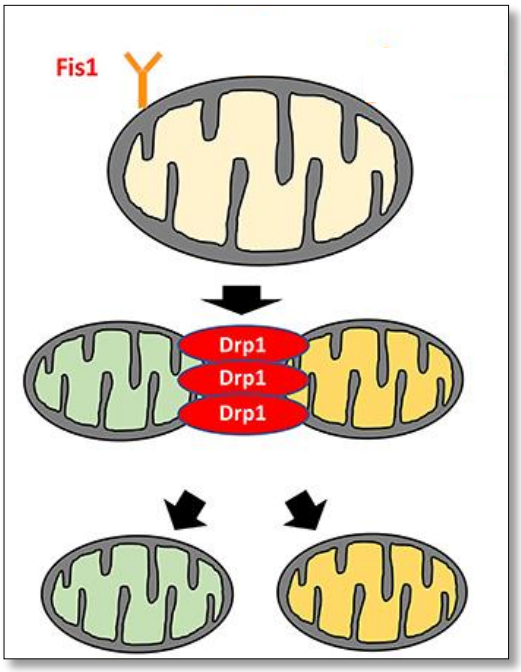


Figure 13: La fission mitochondriale (D'après Uchikado, Ikeda, and Ohishi 2022)

4.2 Mécanisme de la fusion

La fusion est un mécanisme par lequel deux mitochondries fusionnent entre elles pour former un réseau mitochondrial filamenteux (*cf* figure 14). La fusion mitochondriale nécessitent dans un premier temps la fusion de la membrane externe puis celle de la membrane interne (Malka et al. 2005). Différents partenaires moléculaires interviennent dans ce mécanisme. Tout d'abord, les protéines mitofusines 1 et 2 (Mnf1 et Mnf2), font parties de la famille des dynamines GTPases, impliquées dans la fusion de la membrane externe (pour revue Chandhok, Lazarou, and Neumann 2018). Le rôle de la Mfn2 dans les contacts entre le RS et les mitochondries, facilite la signalisation calcique (Twig et al. 2008). La protéine OPA1 (Optic Atrophy 1), quant à elle, catalyse la fusion de la membrane interne.

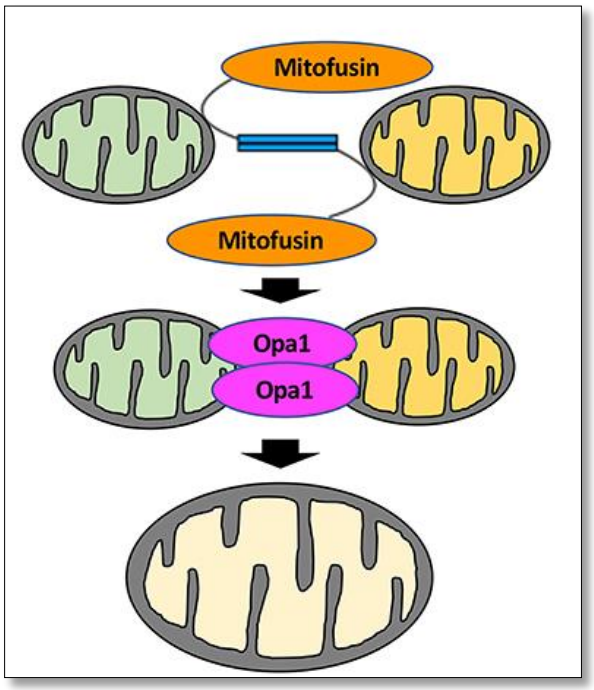


Figure 14 : La fusion des mitochondries (D'après Uchikado, Ikeda, and Ohishi 2022)

Des données récentes ont révélé la relation entre la fusion/fission mitochondriale et la signalisation Ca^{2+} (Guan et al. 2019). La régulation positive de MCU a diminué l'expression de l'atrophie optique de type 1 (OPA1) conduisant ainsi à un déséquilibre dynamique mitochondriale. De plus, la perte de fonction de DRP1 révèle une augmentation de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial en régulant l'expression de MCU et MICU1 (Favaro et al. 2019). La surexpression de MCU augmente la fission mitochondriale et inhibe la fusion mitochondriale (Guan et al. 2019).

Chapitre 3 : Le métabolisme énergétique

1. Les fonctions énergétiques mitochondriales

Les mitochondries sont le siège de nombreuses réactions du métabolisme oxydatif dont le cycle de Krebs, la β-oxydation des acides gras ou l'OXPHOS réalisée par la CRM, située au sein de la membrane interne mitochondriale. Les mitochondries sont impliquées également dans de nombreux processus tels que l'apoptose, la signalisation cellulaire, le stockage du calcium, la prolifération de cellules saines et tumorales ou le vieillissement (R. Rizzuto et al. 1998; Mammucari and Rizzuto 2010).

1.1 La β-oxydation des acides gras

La β-oxydation des acides gras au sein de la mitochondrie joue un rôle majeur au niveau de la production d'adénosine-triphosphate (ATP) dans de nombreux organes ou tissus à forts besoins en énergie, tels que les muscles squelettiques, le cœur, le foie ou les reins (Bastin and Djouadi 2019). Les fonctions énergétiques de la β-oxydation des acides gras sont régulées par des facteurs de type nutritionnels et hormonaux, agissant par des mécanismes divers tels que moléculaires, transcriptionnels ou allostériques. Cette voie métabolique repose sur une séquence récurrente de 4 réactions enzymatiques successives appelée hélice de Lynen permettant de convertir les acides gras en Acétyl-CoA qui sera oxydé par le cycle de Krebs, permettant de produire du NADH (nicotinamide adénine dinucléotide réduit) et du $FADH_2$ (flavine adénine dinucléotide réduite), dont les électrons à haut potentiel sont utilisés par la CRM.

1.1.1 Les étapes enzymatiques de la β-oxydation des acides gras

Les acides gras libres doivent être absorbés dans les cellules par un mécanisme médié par le FABPpm : transporteur impliquant la protéine membranaire de liaison aux acides gras. Par la suite, les acides gras absorbés par les cellules subissent plusieurs étapes pour arriver dans la mitochondrie afin d'être oxydés.

Avant leur oxydation, les acides gras libres au niveau de la membrane externe mitochondriale sont transformés en thioester d'acyl-CoA, un processus dépendant de l'ATP réalisé par les acyl-CoA synthétases, sensibles aux acides gras à chaine longue (12 à 20 carbones). Ces acides gras sont alors pris en charge par le transporteur mitochondrial d'acyl-CoA : la carnitine

palmitoyltransférase 1 ou 2 (CPT1 ou CPT2) ou par la carnitine acylcarnitine translocase (CAT ou CACT) (Bonnefont et al. 2004) à travers la membrane mitochondriale externe (*cf* figure 15).

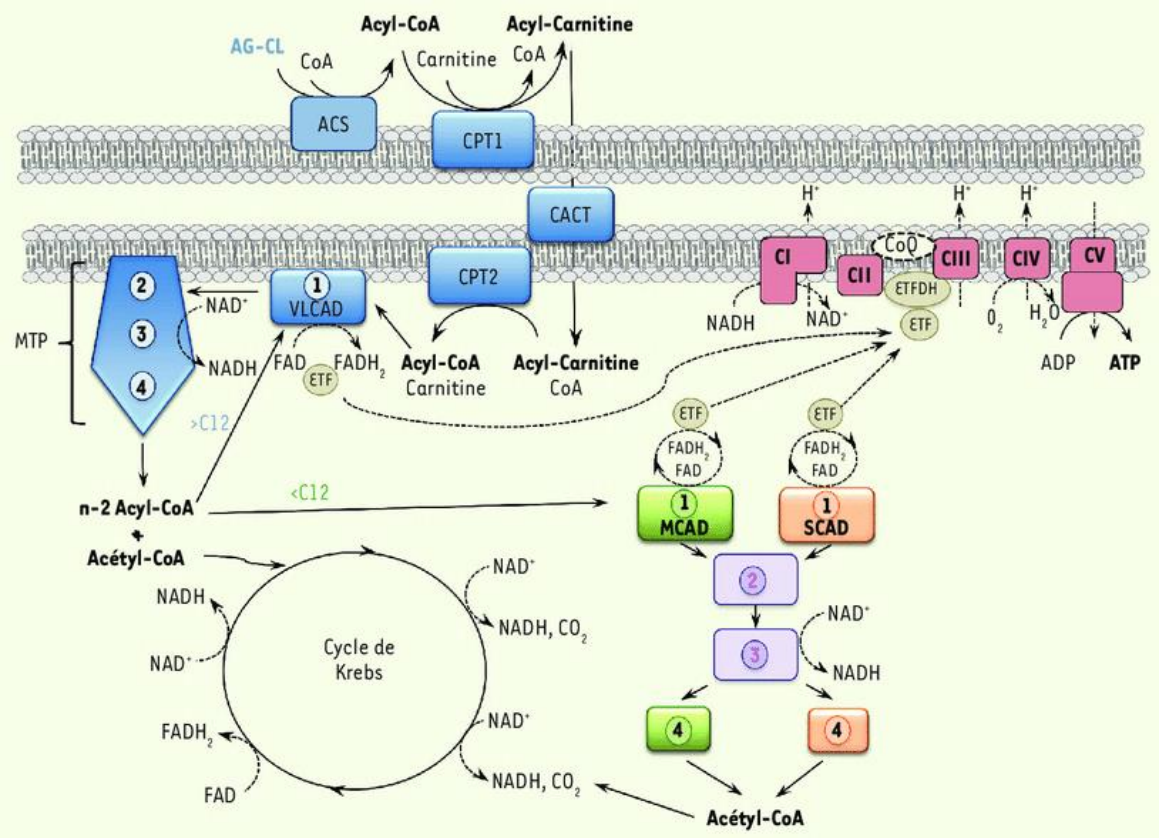


Figure 15 : Organisation schématique de la β-oxydation mitochondriale des acides gras (D'après Bastin and Djouadi 2019)

Les acides gras à chaîne longue (AG-CL) sont activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthetase (ACS) et pris en charge par la CPT1, par la CACT et pour finir par la CPT2. Les acyl-CoA dans la mitochondrie sont oxydés par la VLCAD (very-long-chain acyl-Coa dehydrogenase) (1) puis par la MTP (mitochondrial trifunctional protein) (étapes 2, 3, 4) qui aboutit à la formation d'un n-2 acyl-CoA, d'un acétyl-CoA, d'un NADH, et d'un $FADH_2$. Après l'obtention d'un acyl-CoA à 12 carbones celui-ci est dirigé vers la MCAD (medium chain acyl-CoA dehydrogenase) (1) puis vers des isoformes spécifiques (étapes 2, 3 et 4). Une fois réduit à 6 carbones, l'acyl-CoA se dirigera vers la SCAD (short chain acyl-CoA dehydrogenase) (1) et suivra les isoformes des étapes 2, 3 et 4) pour aboutir à la production d'Acétyl-CoA.

Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA précédemment activés, sont oxydés après 4 étapes (*cf* figure 16):

1. La déshydrogénation de l'acyl-CoA, avec production d'une double liaison, par l'acyl-CoA déshydrogénase en présence de FAD,
2. L'hydratation de la double liaison par l'Enoyl-CoA hydratase
3. La déshydrogénation par l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, en présence de NAD^+
4. Le clivage de l'acide gras, libération d'acyl-CoA par l'acyl-CoA thiolase

Pour que la dégradation de l'acide gras soit complète, la chaine carbonée doit être complétement découpée en molécule d'acyl-CoA. Chaque tour d'hélice de Lynen raccourcit l'acyl-CoA en deux atomes et libère une molécule d'Acétyl-CoA, une molécule de $FADH_2$ et une molécule de NADH.

L'Acétyl-CoA formé va ensuite être utilisé par le cycle de Krebs (dégradé en CO_2 + H_2O), ou donner des molécules d'intérêt biologique : corps cétoniques, cholestérol, isoprènes.

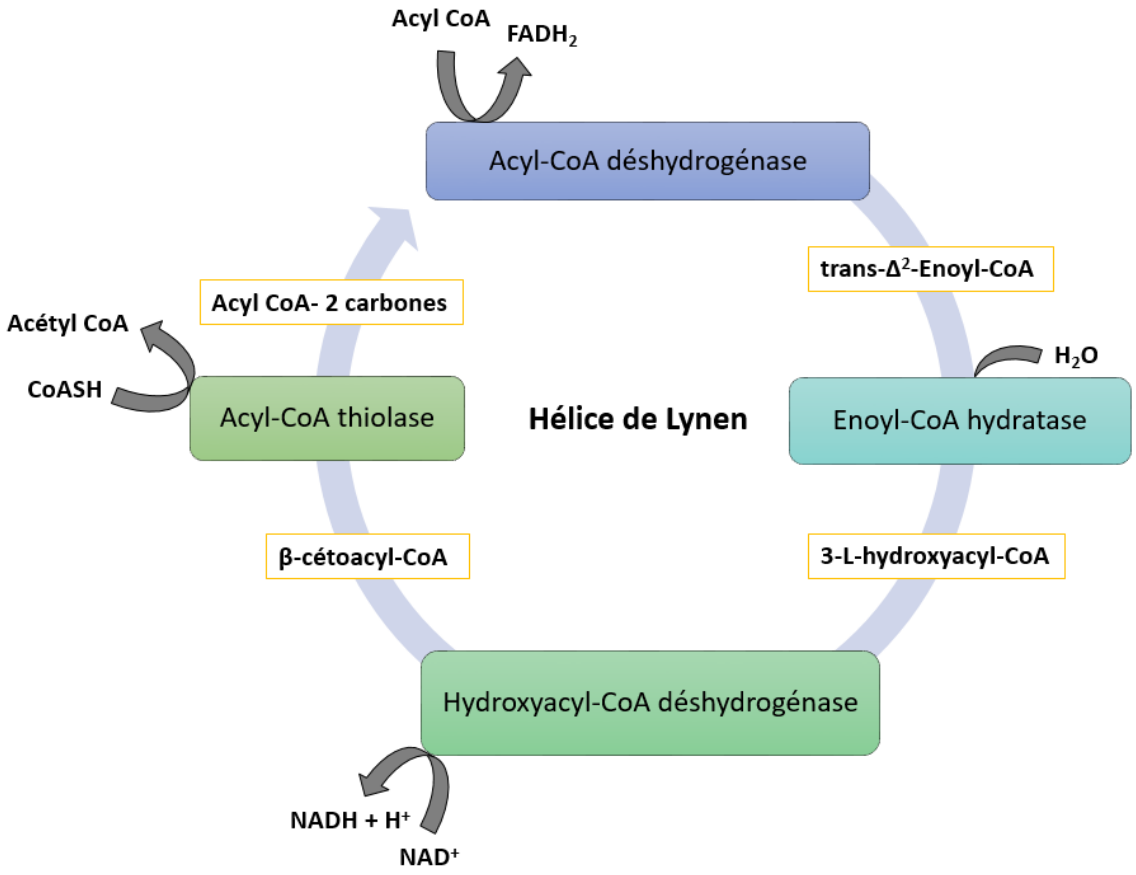


Figure 16 : Réactions d'oxydations de l'hélice de Lynen

1.1.2 La régulation de la β-oxydation des acides gras

La régulation de la β-oxydation peut se faire par l'inhibition de la CPT1 par le manolyl-CoA, qui carboxyle l'Acétyl-CoA. Lorsqu'une concentration élevé d'Acétyl-CoA est présente, l'enzyme : la thiolase est inhibée, pour arrêter l'hélice de Lynen. Si l'ATP ou l'ADP est élevé, cela inhibe l'entrée de NADH et du $FADH_2$, dans la CRM, qui inhibe également les 2 déshydrogénases de la β oxydation.

1.2 Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs permet l'oxydation du pyruvate en 8 étapes par les enzymes mitochondriales après le transport du pyruvate dans la mitochondrie puis la transformation en Acétyl-CoA par la PDH. Le cycle de Krebs permet la libération d'énergie transférée aux coenzymes NAD^+ et FAD. Cette énergie sera ensuite utilisée lors de la phosphorylation oxydative pour la synthèse d'ATP (Alabduladhem and Bordoni 2023). Le cycle de Krebs constitue donc une étape préalable à la réalisation de la phosphorylation oxydative.

1.2.1 Les différentes étapes du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est activé lorsque la molécule d'AcétylCoA se combine avec l'oxaloacétate, pour former du citrate grâce à la citrate synthase (CS) qui catalyse la condensation de l'Acétyl-CoA a l'aide d'une molécule d'oxaloacétate. Le citrate est ensuite converti en isocitrate par l'enzyme : l'aconitase (ACO). L'isocitrate est alors décarboxylé en αKG par l'isocitrate déshydrogénase (IDH), de manière dépendante du NAD^+/ NADH libérant par la suite du CO_2. L'αKG subit une décarboxylation en succinyl-CoA par la αKG déshydrogénase, produisant du NADH et libérant du CO_2. Le succinyl-CoA est ensuite converti en succinate par la succinyl-CoA synthétase (SCS). Cette étape utilise la phosphorylation puisqu'elle est couplée à la GTP (Guanosine Triphosphate) et à l'ATP. Ensuite, le succinate est converti en fumarate par la succinate déshydrogénase (SDH), qui réduit le FAD en $FADH_2$. Le fumarate est par la suite aussi converti, en malate par la fumarate hydratase (FH). Pour finir le malate est converti en oxaloacétate par la malate déshydrogénase (MDH), manière dépendante du NAD^+. L'oxaloacétate est la molécule de départ, le cycle est donc réversible, ce qui confère que chaque tour du cycle de Krebs génère trois molécules NADH et une $FADH_2$, qui cèdent leurs électrons au complexe I et au complexe II.

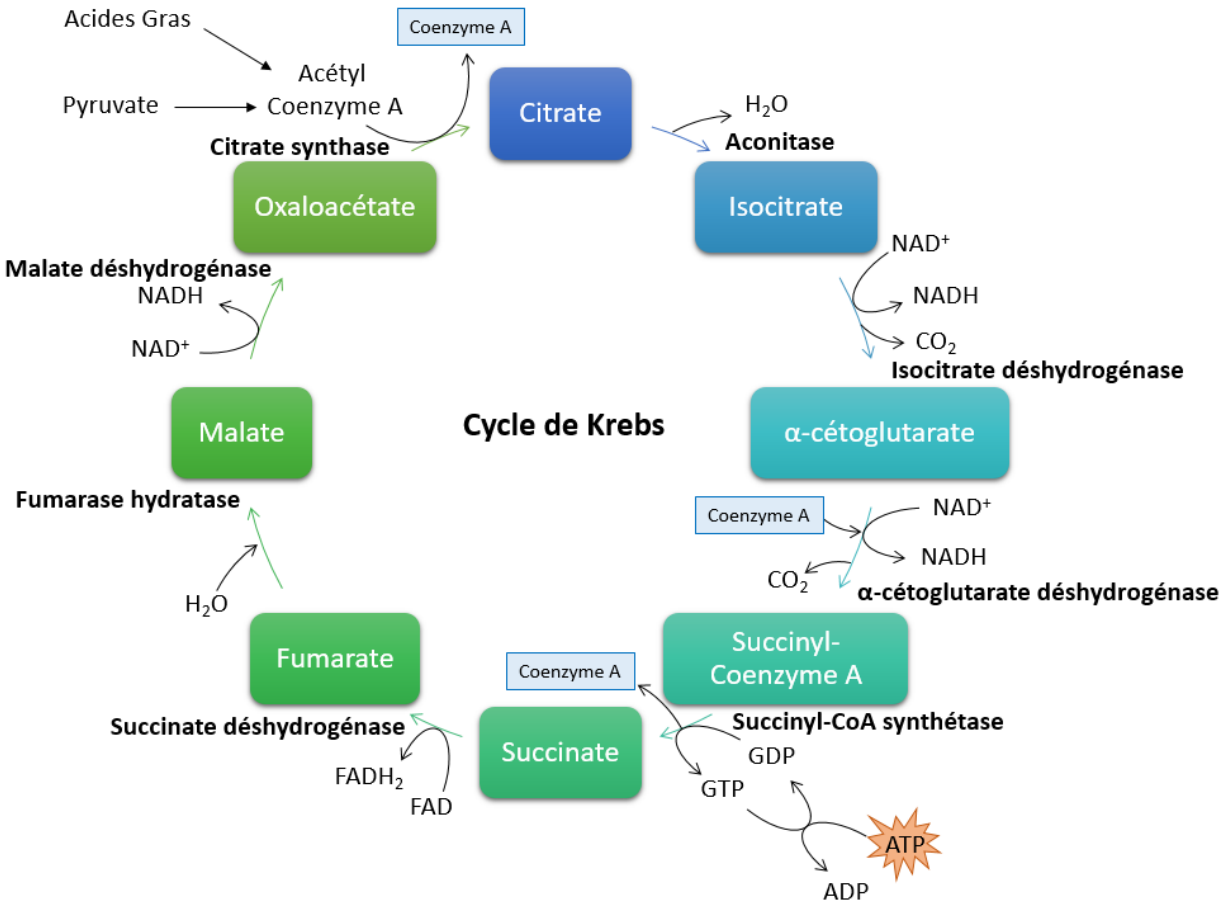


Figure 17 : Le cycle de Krebs

1.2.2 La régulation du cycle de Krebs

La première étape catalysée par la citrate synthase, la troisième étape réalisée par l'isocitrate déshydrogénase et la quatrième étape catalysée par l'αcétoglutarate déshydrogénase sont des étapes irréversibles et constituent donc des points de régulation importants.

L'activité de ces enzymes est régulée de façon allostérique par les produits des réactions, ainsi que par l'ATP. La disponibilité de ces substrats influe aussi sur les activités enzymatiques. L'action de la PDH est également importante pour le bon fonctionnement du cycle puisqu'elle produit l'Acétyl-CoA qui alimente le cycle de Krebs. Son activité est régulée de façon allostérique par l'Acétyl-CoA et le NADH produits, ainsi que par modification covalente de l'enzyme (phosphorylation).

1.3 La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative OXPHOS est un ensemble de réactions d'oxydo-réduction couplée à la synthèse d'ATP. La chaîne d'oxydo-réduction se compose des 5 complexes enzymatiques de la CRM (*cf* figure 18). Ces complexes sont ancrés dans la membrane interne de la mitochondrie et de deux transporteurs d'électrons mobiles : coenzyme Q (ou ubiquinone) et le cytochrome c. Les composés réduits : NADH, H^+ et FADH2 issus de la glycolyse, de la β-oxydation des acides gras et du cycle de Krebs sont oxydés au niveau des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Lors des réactions d'oxydo-réductions au sein des complexes de la chaîne respiratoire, des électrons s'échappent et peuvent ainsi réagir avec l'oxygène moléculaire générant des composés hautement réactifs : les ROS.

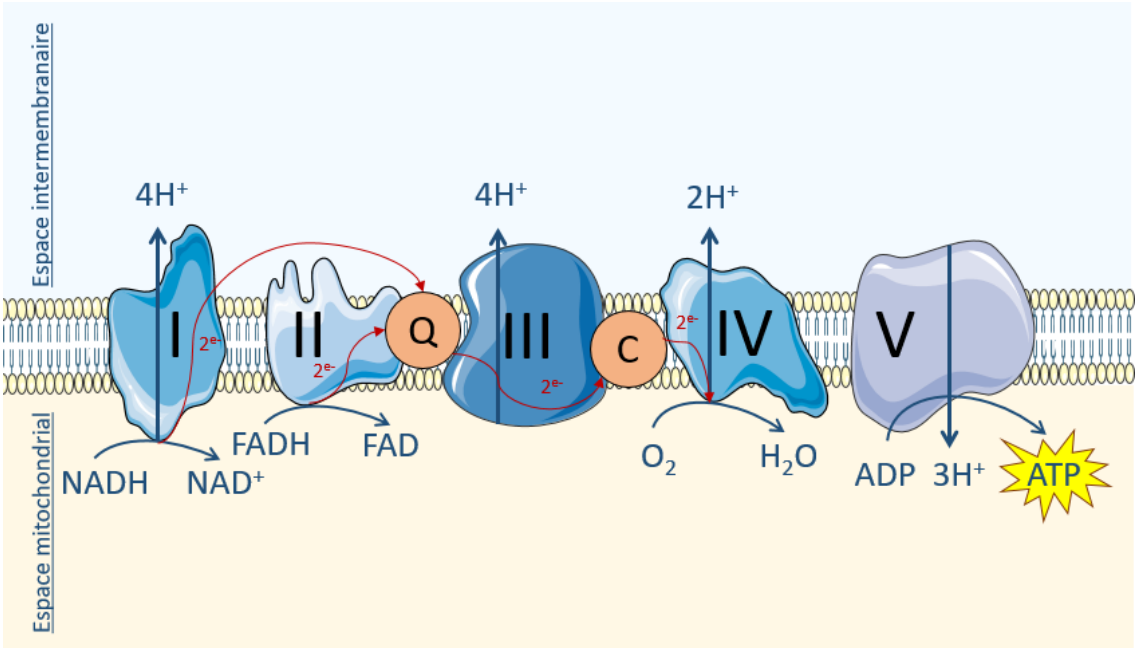


Figure 18 : Les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire mitochondriale

1.3.1 Complexe I

Le complexe I ou NADH coenzyme Q réductase est la première enzyme de la CRM, elle est le point d'entrée des électrons, et se situe dans la membrane interne de la mitochondrie et est composée de 45 sous unités, et présente une structure en forme de L avec deux bras distincts : le domaine membranaire hydrophobe et le domaine matriciel hydrophile (Weiss et al. 1991; Hofhaus, Weiss, and Leonard 1991). Suite à la déshydrogénation par l'hydroxyacyl-CoA déshydrogénase par le NAD^+ lors de la β-oxydation des acides gras ou de la dégradation du pyruvate au sein du cycle de Krebs, ce complexe permet le transfert de deux électrons (2^e) apportés par le NADH au coenzyme Q (CoQ) présent dans la membrane interne. Couplé à ce transport d'électrons, le complexe I transfère 4 protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (Sharma, Lu, and Bai 2009). La roténone est un puissant inhibiteur spécifique du complexe I, qui est le plus couramment utilisé.

1.3.2 Complexe II

Le complexe II ou Succinate coenzyme Q réductase est une enzyme majeure dans le métabolisme mitochondrial puisqu'elle connecte le cycle de Krebs et la CRM en appartenant à la fois aux deux processus biochimiques. Le complexe II est composé de 4 sous-unités (SDHA, SDHB, SDHC ET SDHD), les sous-unités A (contiennent les sites de fixation du succinate et du $FADH_2$) et B sont situées dans la matrice mitochondriale et forment le bras hydrophile de l'enzyme. Les sous-unités C et D sont enchâssées dans la membrane interne mitochondriale et contiennent le site de fixation du coenzyme Q. Le complexe II catalyse le transfert de deux électrons du $FADH_2$ au coenzyme Q. Ce transfert s'effectue suite à la déshydrogénation des acyl-CoA par le FAD au cours de la β-oxydation ou après oxydation du succinate en fumarate lors du cycle de Krebs (Sousa, D'Imprima, and Vonck 2018).

1.3.3 Complexe III

Le complexe III ou Coenzyme Q cytochrome C réductase est également appelé complexe bc_1, il est situé d'une part entre les complexes II et IV, et d'autre part entre le coenzyme Q et le cytochrome c. Le complexe III est composé de 12 sous-unités, il transporte les électrons à travers l'espace intermembranaire du coenzyme Q vers le cytochrome c, qui amène les électrons au complexe IV et transfert 4 protons dans l'espace intermembranaire. Le complexe III possède 4 groupes redox actifs dont 2 cytochromes b (site quinone Q0 et site quinone Qi),

le cytochrome c1 et la protéine Rieske Fer-Soufre (aussi appelée sous-unité 5 du complexe III) (Sousa, D'Imprima, and Vonck 2018).

1.3.4 Complexe IV

Le complexe IV ou Cytochrome C oxydase est constitué d'un dimère de 13 sous-unités, 3 codées par le génome mitochondrial (COX1 à 3) et les 10 autres par le génome nucléaire. Ce complexe est le dernier complexe qui catalyse la réaction finale d'oxydo-réduction de l'OXPHOS. Les électrons apportés par le cytochrome c sont transférés à l'oxygène qui sera réduit en H_2O par la suite. Ce transfert est couplé à un pompage de 4 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Cooper, Nicholls, and Freedman 1991).

1.3.5 Complexe V

Le complexe V ou F_0-F_1 ATP synthase est composé de 2 domaines : F0 formant un canal conduisant les protons vers la matrice mitochondriale et F1 contenu dans la matrice mitochondriale, composé de 5 sous-unités formant la partie catalytique de ce complexe. Il utilise l'énergie apportée par les protons dans l'espace mitochondrial pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et Pi (phosphate inorganique). Cette réaction se déroule au niveau du domaine F1 et nécessite la force générée grâce au passage de protons dans le domaine F0 (Neupane et al. 2019). L'activité enzymatique de cette enzyme s'effectue par catalyse rotative (Devenish, Prescott, and Rodgers 2008). En effet les rotations autour des sous-unités génèrent l'énergie nécessaire la phosphorylation de l'ADP.

1.3.6 L'organisation des complexes de la phosphorylation oxydative mitochondriale

Chaque complexe de la CRM a son propre rôle, mais des études ont montré qu'une organisation d'assemblage des complexes entre eux pouvaient avoir lieu. Ce modèle se nomme « supercomplexe ». Les complexes formant des structures supramoléculaires sont localisées à faible distance les uns des autres pour ne former qu'un seul et même bloc. Les supercomplexes les plus observés sont les associations I/III, I/III/IV et III/IV. Chaque supercomplexe, peut contenir un ou plusieurs mêmes complexes, par exemple il a été mis en évidence que le supercomplexe I/III est composé d'un complexe I et de 2 complexes III (I_1+III_2) (Letts et al. 2019). Le supercomplexe I/III/IV était composé d'un complexe I, de 2 complexes III et entre 0 et 4 complexe IV (I_1+III_2+IV_{0-4}) (Gu et al. 2016). Ce supercomplexe est aussi appelé « respirasome ». Le supercomplexe III/IV, lui est composé de 2 complexes III et de 4 complexes

IV (III_2+IV_4) (Acín-Pérez et al. 2008). En revanche, l'association du complexe II au supercomplexes, n'a jamais été décrite. Ces supercomplexes pourraient offrir une amélioration du transfert d'électrons entre les complexes par la canalisation des substrats ou en améliorant la catalyse dans le transfert d'électrons inter-complexes pouvant ainsi permettre une meilleure synthèse d'ATP (Berndtsson et al. 2020). Les supercomplexes seraient donc de bon acteurs dans la CRM, et optimiseraient l'efficacité de celle-ci. En revanche, une diminution de l'efficacité de transfert d'électrons et de la synthèse d'ATP peut être la cause de l'absence de certains complexes de la CRM comme le complexe III, IV ou le cytochrome c qui entraîne un désassemblage des supercomplexes (Acin-Perez and Enriquez 2014) et une augmentation de la production de ROS mitochondriale (Maranzana et al. 2013).

2. La reprogrammation métabolique

Les mitochondries contrôlent un grand nombre de processus cellulaires liés au métabolisme bioénergétique, à l'apoptose, à l'homéostasie redox, à la signalisation calcique et au métabolisme du fer. Leur intégrité est donc fondamentale pour le bon fonctionnement cellulaire. Les principales voies métaboliques mitochondriales sont le cycle de Krebs, la β-FAO, l'ETC et l'OXPHOS par les complexes de la chaine respiratoire. Toutes sont impliquées dans le catabolisme cellulaire et la production énergétique. La grande majorité des carburants métaboliques de l'organisme peut permettre de produire de l'Acétyl-CoA.

En présence d'oxygène, les cellules vont métaboliser le glucose en pyruvate qui va être incorporé dans la mitochondrie puis transformé en Acétyl-CoA par la PDH. L'AcetylCoA est intégré au cycle de Krebs afin de produire du NADH et FADH2, cofacteurs nécessaires au fonctionnement de la CRM. Ces cofacteurs sont des donneurs d'électrons qui vont, à la suite de réactions d'oxydoréduction, générer un gradient de proton de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire permettant le fonctionnement de l'OXPHOS. En absence d'oxygène, les cellules vont convertir le pyruvate en lactate.

Dans le but de maintenir une prolifération cellulaire rapide, les cellules tumorales activent et/ou modifient les différentes voies métaboliques afin d'optimiser le rendement énergétique (Vyas, Zaganjor, and Haigis 2016). Ces modifications sont appelées « reprogrammation énergétique ». Celle-ci a été décrite comme caractéristique essentielle à la tumorigenèse (Hanahan and Weinberg 2011). La tumorigenèse est un processus au cours duquel de nombreuses altérations génétiques interviennent dans la transformation progressive de

cellules normales en cellules cancéreuses. Les cellules tumorales ont la capacité de se préserver des mécanismes conduisant à la mort cellulaire, de métastaser, d'induire l'angiogenèse, d'échapper au système immunitaire. Pour l'acquisition de ces nouvelles propriétés cellulaires, Les cellules cancéreuses vont moduler ou reprogrammer leurs métabolismes énergétiques (cycle de Krebs, β-oxydation des acides gras, ETC et OXPHOS), dans le but d'optimiser leurs rendements énergétiques (Hanahan and Weinberg 2011).

2.1 Effet Warburg

Dans les années 1920, les travaux d'Otto Warburg ont démontré que les cellules cancéreuses possédaient un métabolisme particulier. En effet, il a découvert que les cellules tumorales privilégiées une glycolyse anaérobie indépendamment de la présence d'oxygène, alors que les cellules saines, elles, privilégient la glycolyse aérobie faisant intervenir la respiration mitochondriale. Cette glycolyse anaérobie converties le glucose en lactate, ce dernier sera ensuite sécrété hors de la cellule par les transporteurs de monocarboxylelate (MCT). L'augmentation de lactate dans le milieu péri-tumoral participe à l'acidification extracellulaire. Ce métabolisme particulier est retrouvé dans un grand nombre de cancers et porte le nom d'effet Warburg (*cf* figure 19) (Warburg, Wind, and Negelein 1927; Vander Heiden, Cantley, and Thompson 2009). Cet effet part du principe que la glycolyse est améliorée et la capacité d'OXPHOS est réduite dans diverses cellules cancéreuses.

L'accumulation d'intermédiaires glycolytiques va alimenter les voies de biosynthèse comme la voie des pentoses phosphates qui assure la production de ribose et de NADPH (Li Chen et al. 2019). Après la glycolyse, les cellules cancéreuses utilisent majoritairement la voie des acides gras ou la voie de la glutamine par le cycle de Krebs. En effet la voie des lipides est le système de transduction de signal le plus altérés dans les cellules cancéreuses, en particulier la voie de la phosphoinositide 3 kinase-protéine, kinase B-mammalienne cible de la rapamycine (PI3K), qui sert de lien entre différentes classes de récepteurs et les oncogènes qui affectent la fonction cellulaire. L'activation aberrante de la voie PI3K est souvent associée à une résistance aux thérapies anticancéreuses et à la progression tumorale (He et al. 2021).

Le phénotype proposé par Warburg a été remis en question avec plusieurs études qui ont démontré que la CRM et l'OXPHOS des cellules cancéreuses sont fonctionnelles et que le remodelage métabolique « Warburg » ne résulte pas d'une nécessité induite par l'altération

de la respiration cellulaire. L'utilisation de la glycolyse par les cellules cancéreuses dans le but de produire de l'ATP paraît étonnante car elle est nettement moins efficace en termes de rendement énergétique. En effet, l'OXPHOS génère 36 ATPs par molécule de glucose contre 2 ATPs pour la glycolyse. Il est donc nécessaire de compenser cette différence majeure de rendement énergétique. Les cellules cancéreuses vont, pour cela, augmenter les transporteurs membranaires dont les transporteurs de glucose (dont GLUT1) et surexprimer l'hexokinase-2 (permettant la phosphorylation du glucose en glucose-6-P), ainsi que de la lactate déshydrogénase (LDHA, qui transforme le pyruvate en lactate) afin d'optimiser leur capacité d'absorption du glucose. Il a été rapporté que des taux élevés de GLUT1 était associé à un mauvais pronostic dans divers types de tumeurs telles que les tumeurs du sein (Macheda, Rogers, and Best 2005).

L'effet Warburg s'explique partiellement par le fait qu'il existe une hétérogénéité métabolique au sein des tumeurs induites essentiellement par les variations des taux oxygénations d'une zone tumorale à une autre. Dans ce contexte, certaines cellules développent un phénotype glycolytique tandis que d'autres utilisent principalement OXPHOS (Danhier et al. 2017). En dehors des variations des taux d'oxygénations des tumeurs, l'hétérogénéité cellulaire intra et péri-tumorale va également moduler les orientations métaboliques. Les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral permettent de déplacer les métabolites des cellules stromales vers les cancéreuses afin de maintenir la production d'ATP dans les cellules cancéreuses. Ce modèle est appelé effet « Warburg inverse », qui décrit un modèle à deux compartiments dans lequel les cellules stromales sont contraintes par les cellules cancéreuses à utiliser la voie de « glycolyse aérobie », puis transfèrent les produits de celle-ci aux cellules cancéreuses pour une utilisation pour l'OXPHOS mitochondriale (Esteban-Martínez et al. 2017). Ce modèle de transfert métabolique des cellules stromales et cancéreuses permet aux tumeurs de répondre aux variations de la disponibilité des nutriments afin d'augmenter la prolifération et la migration cellulaire.

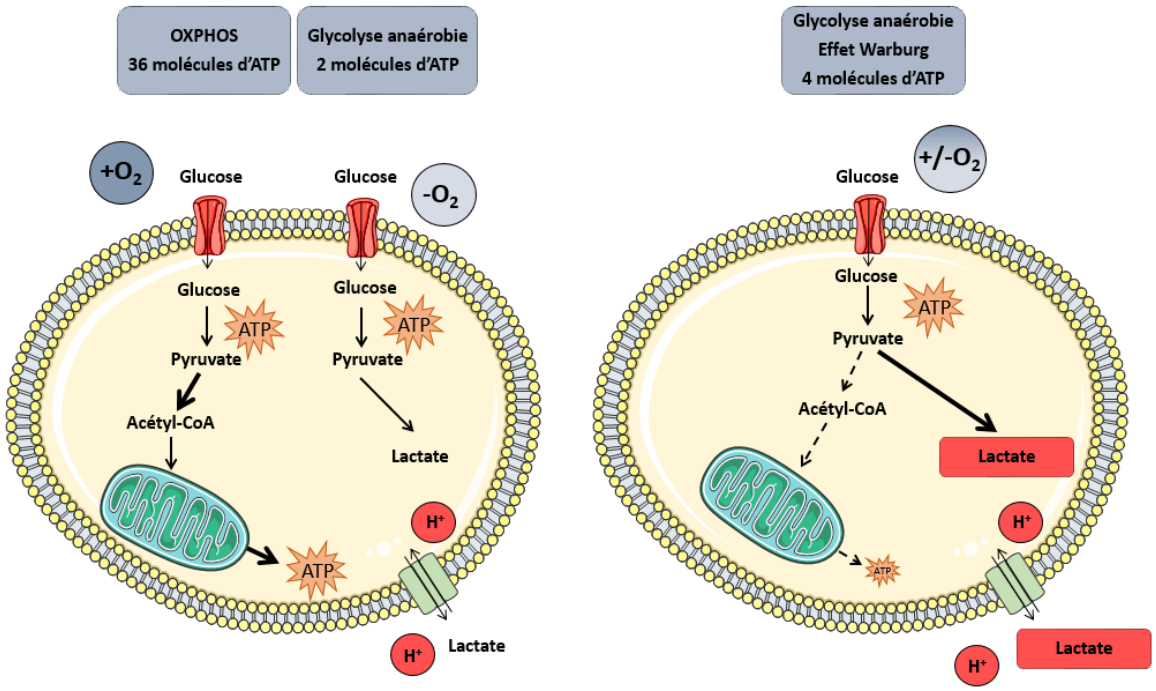


Figure 19 : Modèle du métabolisme de l'effet Warburg (Modifié d'après Unterlass and Curtin 2019)

2.2 La glycolyse

La glycolyse aussi appelée voie d'Embden-Meyerhof, en l'honneur des principaux contributeurs à sa découverte et à sa compréhension (Akram 2013), est l'une des activités métaboliques à l'origine de la production d'ATP, qui est la voie principale des glucides dans la cellule. Cette voie métabolique et source d'énergie ne nécessite pas la présence d'oxygène pour son bon fonctionnement mais peut se produire en sa présence (Chaudhry and Varacallo 2023). Lorsque le glucose entre dans le cytosol, la voie de la glycolyse commence, celle-ci consiste en une série de 10 réactions successives qui convertissent une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate avec production associée de 2ATP et 2NADH + H^+. Le pyruvate est alors transporté à l'intérieur de la mitochondrie où il est ensuite transformé en Acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase, pour être utilisé dans le cycle de Krebs, dans des conditions aérobies. Dans des conditions anaérobies, le pyruvate reste dans le cytoplasme, qui sera converti en lactate par la lactate déshydrogénase (Granchi et al. 2010).

2.2.1 Les étapes enzymatiques de la glycolyse

La glycolyse se décompose en 10 réactions successives (*cf* figure 20). Lorsque le glucose entre dans la cellule via les GLUT dans le cytoplasme, l'enzyme hexokinase phosphoryle le glucose, dans cette réaction un groupe phosphate de l'ATP est transféré au glucose qui produit le glucose 6-phosphate (G6P). L'étape 2, fait intervenir l'enzyme phospho-isomérase, qui isomérise le G6P en son isomère fructose 6-phosphate (F6P). Ensuite une autre molécule d'ATP est utilisée pour transférer un groupe phosphate au F6P pour former du fructose 1,6-biphosphate (FBP) à l'aide de la kinase phosphofructo-kinase. En étape 4 l'enzyme aldolase, divise le fructose 1,6-biphosphate, en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et en glycéraldéhyde 3-phosphate (GAP). L'étape 5 est la conversion du DHAP en GAP grâce à l'enzyme triose-phosphate isomérase, ces isomères peuvent s'inter-convertir. Le GAP est le substrat nécessaire pour l'étape 6 de la glycolyse. Il est déshydrogéné par l'enzyme glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) par le transfert de l'une de ses molécules d'hydrogène (H^+) à l'agent oxydant nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^-) pour former NADH + H^+. La GAPDH remplit également une autre fonction dans cette réaction, puisqu'elle ajoute un phosphate du cytosol au GAP oxydé pour former du 1,3-biphosphoglycérate (BPG). La 7ème étape est le transfert d'un phosphate du BPG à une molécule d'ADP pour former de l'ATP grâce à l'enzyme phosphoglycérokinase. Cette réaction donne deux molécules de 3-phosphoglycérate (3 PGA) et deux molécules d'ATP. L'étape suivante fait intervenir l'enzyme phospho-glycérate mutase qui déplace le phosphate des deux molécules de 3 PGA pour former deux molécules de PGA (2 PGA). Le 2 PGA élimine une molécule d'eau pour former du phosphoénol pyruvate (PEP) grâce à l'enzyme énolase en étape 9. Pour finir la glycolyse, l'enzyme pyruvate kinase transfère un phosphate du PEP à l'ADP pour former deux molécules de pyruvate et deux molécules d'ATP (Chandel 2021).

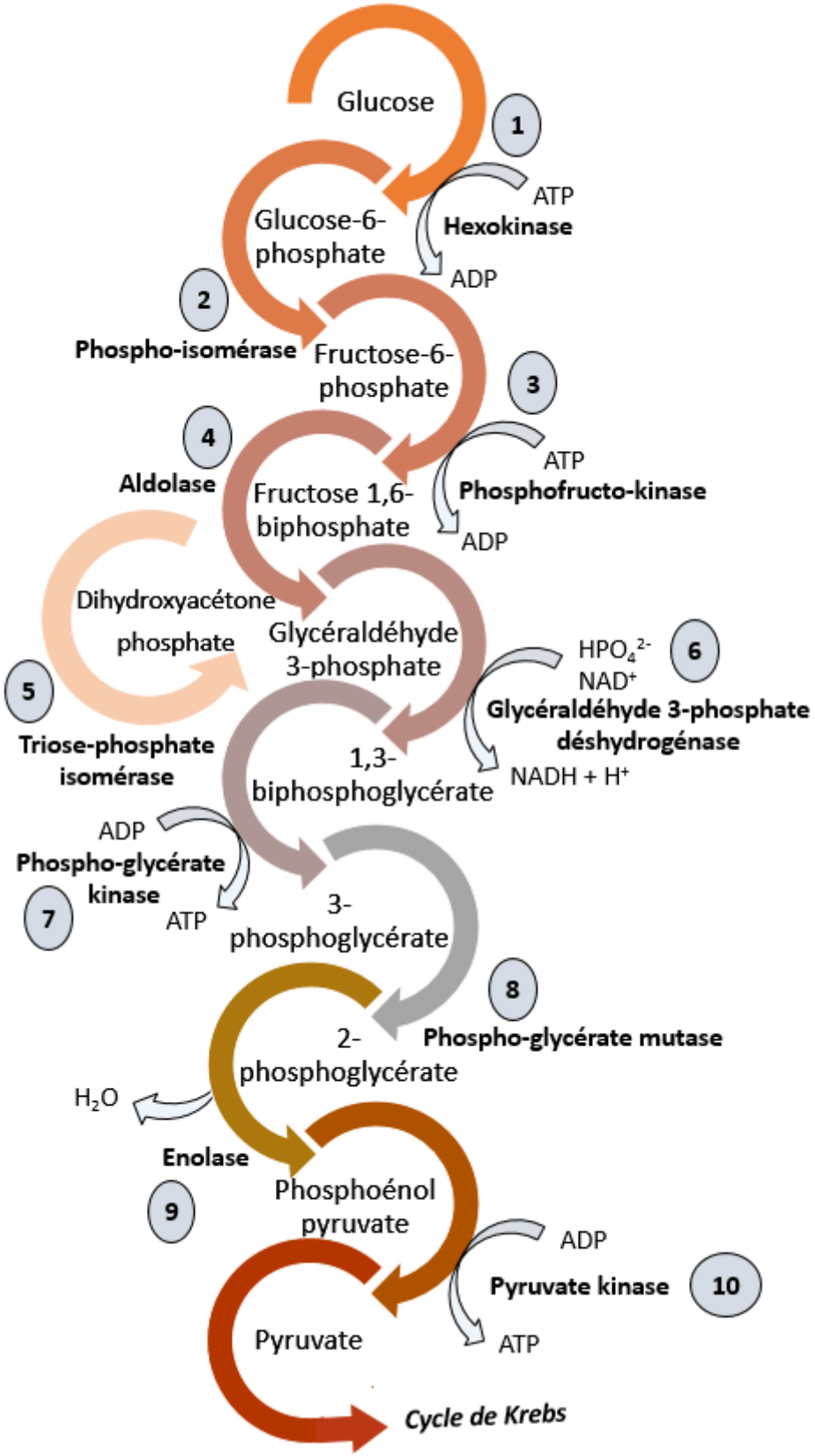


Figure 20 : Les différentes étapes de la glycolyse

2.2.2 La régulation du flux glycolytique

a. Par le glucose

La quantité de glucose disponible régule directement la glycolyse, de deux manières différentes : régulation de la recapture du glucose ou régulation de la dégradation du glycogène. Les GLUT transportent le glucose de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur au moyen d'un mécanisme de diffusion facilité. Il en existe trois sous-classe (classe I, II et III), différenciée par leur nature de transport et leur localisation (Navale and Paranjape 2016). Le glucose peut être stocké par les cellules sous forme de glycogène lorsque les niveaux de glucose sont élevés, à l'inverse, lorsque les niveaux sont faibles, le glycogène est converti en glucose. Deux enzymes sont indispensables pour contrôler la dégradation du glycogène : la glycogène phosphorylase et la glycogène synthase. Les enzymes peuvent être régulées par des boucles de rétroaction de glucose ou de glucose 1-phosphate, ou via une régulation allostérique par des métabolites, ou à partir d'un contrôle de phosphorylation/déphosphorylation (pour revue Lenzen 2014).

b. Par allostérie

Trois sites de régulation de la glycolyse sont disponibles et se situent au niveau des 3 enzymes allostériques catalysant les réactions irréversibles de la glycolyse : la phosphofructokinase 1 (PFK1), l'hexokinase et la pyruvate kinase. La PFK1 est l'élément important pour la régulation de la glycolyse. Elle est inhibée par les fortes concentrations cellulaires de l'ATP (ATP/AMP élevé) qui diminuent l'affinité de l'enzyme pour le fructose 6-phosphate, qui est un effecteur négatif de l'hexokinase. Le citrate formé dans le cycle de Krebs inhibe la PFK1, à l'inverse le fructose 2,6-bisphosphate l'active. La pyruvate kinase, la dernière enzyme allostérique de la glycolyse est inhibée par l'ATP mais activée par le fructose 1,6-bis-phosphate (Xu et al. 2012; Gustavsson et al. 2014).

c. Par l'induction enzymatique

L'autre mécanisme de contrôle des taux glycolytiques est le contrôle transcriptionnel des enzymes glycolytiques. La consommation d'aliments riches en glucides ou l'injection d'insuline augmente la teneur du foie des 3 enzymes allostériques : l'hexokinase, la PFK1 et la pyruvate kinase via leur activation et leur transcription.

2.3 Altérations des voies de signalisation métaboliques

Les adaptations métaboliques présentées précédemment dans les cellules cancéreuses sont souvent liées à des altérations des voies de signalisation métaboliques primaires, telles que la modification du réseau de signalisation de l'AMPK (protéine kinase activée par l'AMP) et du réseau de signalisation de mTOR. L'AMPK est un régulateur de l'énergie cellulaire et de l'homéostasie redox répondant à divers signaux de stress tels que l'hypoxie, le stress oxydatif et la privation de nutriments, pour ensuite stimuler la production des réserves d'ATP. L'activation de l'AMPK dans les cellules cancéreuses permet de s'adapter au stress métabolique, alors que la perte de signalisation de l'AMPK, renforce les effets des surpresseurs de tumeurs tel que p53 (Jones et al. 2005).

La kinase mTOR est un contrôleur central de la croissance cellulaire en réponse aux facteurs de croissance et aux nutriments. L'hyperactivation de mTOR médiée par la perte de fonction de PTEN ou par la sur activation de PI3K et AKT, contribue au développement et à la croissance de cellules cancéreuses (Faivre, Kroemer, and Raymond 2006).

2.4 Activation des oncogènes et reprogrammation métabolique

Les altérations métaboliques observées dans les cellules cancéreuses sont aussi médiées par l'activation d'oncogène tels que Myc, RAS et HIF1α. Myc augmente l'expression de nombreux gènes qui soutiennent la croissance anabolique, y compris les transporteurs et les enzymes impliqués dans la glycolyse, la synthèse des acides gras, la glutaminolyse, le métabolisme de la sérine et le métabolisme mitochondrial (Stine et al. 2015). Des oncogènes comme KRAS, fréquemment mutés dans les cancers du poumon, du côlon et du pancréas, utilisent les fonctions physiologiques des voies PI3K et Myc pour favoriser la tumorigénicité. De plus, Myc induit une reprogrammation métabolique en régulant positivement la PFK dans les cellules CCR (Satoh et al. 2017).

HIF1α est souvent dérégulé dans de nombreuses formes de cancers et laisse présager un mauvais pronostic et une mauvaise réponse au traitement. HIF1α est stabilisé dans des conditions d'hypoxie, cette stabilisation entraîne une activité plus importante de ce facteur de transcription sur les promoteurs des gènes qu'il régule entraine des changements métaboliques, angiogéniques, anti-apoptotique, pro-migratoire favorisant ainsi la survie tumorale et l'apparition de métastases (Luo et al. 2014; Nagaraju et al. 2015). Dans le CCR,

l'expression de HIF1α est également associée à la chimiorésistance par stimulation des processus autophagiques.

2.5 La reprogrammation métabolique du glucose dans le cancer colorectal

La prolifération des cellules tumorales est favorisée par l'absorption élevée de glucose et par la glycolyse aérobie (Wang et al. 2018). Les transporteurs du glucose, les GLUT sont décrits comme dérégulés dans de manière générale dans le CCR ou associées à des sous-types mutationnels. Pour exemple, il a été rapporté que dans le CCR muté KRAS et BRAF, la régulation positive de GLUT1 active les ROS et inactive par la suite la GAPDH, cette dernière servant à la production d'énergie via le glucose en condition physiologique (Yung et al. 2015). L'augmentation de l'expression de GLUT3 favorise la progression du CCR et les métastases (Kuo et al. 2019). De plus, les patients MSI qui présente une mutation BRAF, entraîne une reprogrammation métabolique par la diminution de l'activité de l'OXPHOS et une augmentation de la production l'ATP glycolytique, du lactate et de la quantité de protéine HIF1α.

Aujourd'hui, il est proposé que le produit de la glycolyse qui est le lactate pourrait etre réutilisé pour favoriser la respiration mitochondriale, en effet, il a été démontré que le lactate produit dans le microenvironnement tumoral améliore l'activité de l'OXPHOS dans les cellules du CCR (Liu et al. 2022) et est associé au développement de métastases et à la récidive (Bergers and Fendt 2021).

2.6 La reprogrammation métabolique du cycle de Krebs dans le cancer colorectal

Le cycle de Krebs joue un rôle crucial dans le métabolisme cellulaire et est fréquemment dérégulé dans le CCR (Neitzel et al. 2020). Le pyruvate produit par glycolyse est catalysé en Acétyl-CoA par la PDH puis l'Acétyl-CoA entre dans le cycle de Krebs. La PDH est inhibée lorsqu'elle est phosphorylée par la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1). Ce dernier alors qu'il phosphoryle la PDH régule la glycolyse et le cycle de Krebs pour favoriser le développement tumoral (T. Liu and Yin 2017). L'augmentation d'expression de PDK1 induit un blocage du cycle de Krebs pour faciliter l'effet Warburg dans le CCR (Pate et al. 2014). De plus, l'IDH convertit l'isocitrate en α-KG. Ce dernier est un effecteur de la suppression tumorale médiée par p53, qui peut compenser le déficit en p53 pour arrêter la progression maligne (Morris et al. 2019).

2.7 La reprogrammation métabolique de la glutamine dans le cancer colorectal

Le métabolisme de la glutamine contribue à la croissance des cellules cancéreuses en alimentant la production d'ATP via le cycle de Krebs (Smith et al. 2016; Hao et al. 2016). Les mutations du gène KRAS augmentent la demande en glutamine dans les cellules cancéreuses qui utilisent celle-ci pour accélérer le métabolisme énergétique et maintenir l'homéostasie redox afin de soutenir la prolifération tumorale (Ni et al. 2023).

2.8 La reprogrammation métabolique des lipides dans le cancer colorectal

Le métabolisme des lipides est largement dérégulé pour faciliter le développement des cellules cancéreuses. Ils sont généralement stockés dans des gouttelettes lipidiques et leur accumulation contribue à la fonction pathologique du CCR (Cotte et al. 2018). La lipogenèse est la voie métabolique qui permet de synthétiser des acides gras. L'acide gras synthase est une enzyme responsable de la production de palmitate via l'Acétyl-CoA. L'expression de cette enzyme est augmentée dans les stades avancés du CCR favorisant la formation de métastase, et les propriétés de migration et d'adhésion cellulaire (Zaytseva et al. 2012). Des facteurs de transcription comme PGC1α favorisent la lipogenèse en augmentant la synthèse des acides gras pour favoriser la croissance tumorale (Bhalla et al. 2011). De plus, la β-oxydation des acides gras génère de l'énergie pour favoriser la croissance, la survie et les métastases des cellules du CCR (Wang et al. 2018). La CPT1 transporte les acides gras du cytosol vers les mitochondries afin de réaliser leur oxydation. CPT1A est régulée positivement dans les tumeurs métastatiques avancées du CCR (Wang et al. 2018).

3. La production des espèces réactives de l'oxygène dans le cancer

La mitochondrie est une source non négligeable de production de ROS, en effet environ 1 à 5 % de l'oxygène consommé par la mitochondrie sera transformé en ROS. Les ROS sont des molécules chimiques oxygénées pouvant entrainer l'oxydation d'autres molécules. Parmi les ROS, on retrouve en majorité l'anion superoxyde ($O2^{\cdot -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle ($OH^{\cdot}$) et les radicaux peroxydes ($RCOO^{\cdot}$ et $ROO^{\cdot}$).

A faible concentration, les ROS jouent un rôle dans la régulation de nombreuses activités biologiques en tant que molécule de signalisation impliquées dans divers processus cellulaires, notamment la croissance cellulaire. Une production élevée de ROS peut être toxique pour les

cellules normales. Les ROS peuvent quand même être utilisées par les cellules normales dans le cas des cellules du système immunitaire qui produisent en grandes quantités des ROS contre une bactérie ou un virus pour le détruire. Il est maintenant admis que les ROS sont augmentées dans les cellules cancéreuses, en raison de mutations génétiques, du taux métabolique et de l'hypoxie (pour revue Perillo et al. 2020). Les cellules cancéreuses utilisent ces ROS pour favoriser les mécanismes de prolifération et de migration cellulaires. Cependant il est également proposé que la production de ROS accrue dans les cellules cancéreuses augmente leur sensibilité à la mort cellulaire par les agents thérapeutiques (Nakamura and Takada 2021).

Au sein de la CRM, deux sites de production de ROS ont été mis en évidence : le complexe I et le complexe III (Kussmaul and Hirst 2006). D'autres sources de production de ROS ont été mises en évidence via l'action de diverses enzymes extra-mitochondriales NADPH oxydases, la xanthine oxydase, la monoxyde d'azote synthase non couplée, la myéloperoxydase, le cytochrome P450, la cyclooxygénase et la lipoxygénase (pour revue Sauer, Wartenberg, and Hescheler 2001). Certaines sources de sites de production des ROS citées précédemment peuvent être modulées par le calcium. Il a été démontré que l'accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie favorise la production de ROS mitochondriaux et que le Ca^{2+} active également l'oxyde nitrique synthase, dont le produit, l'oxyde nitrique, inhibe le complexe IV, ce qui augmente la production de ROS mitochondriaux. Des travaux ont montré que le Ca^{2+} induit des ROS via la fixation de celui-ci au niveau des cardiolipines entrainant des modifications des complexes I et II de la CRM (Hwang et al. 2014). Les interactions entre les ROS et la signalisation calcique sont donc considérées comme bidirectionnelles, en effet les ROS peuvent réguler la signalisation calcique des cellules, a contrario la signalisation calcique est essentielle à la production de ROS (*cf* figure 21).

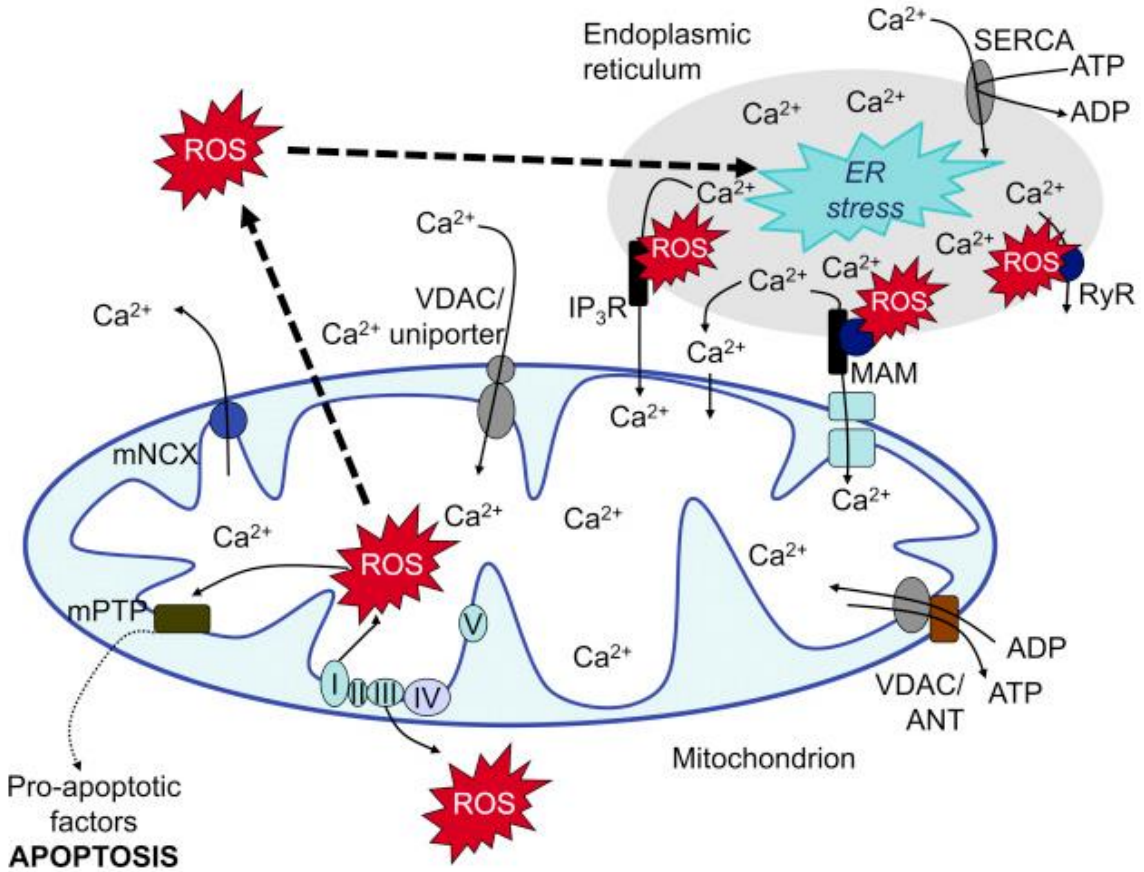


Figure 21 : Liens entre ROS et Ca^{2+} (D'après Görlach et al. 2015)

Des niveaux élevés de Ca^{2+} stimulent l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) conduisant à des quantités élevées de ROS. Les ROS produit par la mitochondrie vont moduler les canaux calciques basés sur le RE, entraînant alors une libération de Ca^{2+} et une augmentation supplémentaire des niveaux de ROS. Une production accrue de ROS et de calcium provoque in fine l'ouverture du PTP mitochondrial, entraînant ainsi la libération de facteurs pro-apoptotiques.

Objectifs de thèse

La signalisation calcique est impliquée dans différents processus tels que la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire. Il est désormais bien établi que la dérégulation de l'homéostasie calcique favorise le développement du cancer. En effet, les canaux et échangeurs calciques permettant l'influx ou l'efflux de Ca^{2+} sont exprimés de façon aberrante dans les cellules tumorales, dans les différents stades du cancer, afin de permettre aux cellules cancéreuses de survivre ou d'évoluer vers des formes métastatiques. De par ses fonctions dans la production d'énergie ou encore dans la régulation de la balance survie / mort cellulaire, la mitochondrie a un rôle déterminant dans le devenir des cellules tumorales en détournant le métabolisme énergétique de la cellule. La reprogrammation métabolique est considérée comme une caractéristique principale de la tumorigenèse, car celle-ci peut réguler des processus importants associés à la prolifération, à la migration et à l'invasion cellulaire. Les variations de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale peuvent affecter les grandes fonctions mitochondriales telles que la régulation de l'OXPHOS et, du cycle de Krebs. L'ensemble de ces modifications pourront être à l'origine d'une dérégulation de la production d'ATP ainsi que des anomalies dans la génération des ROS.

L'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie est médiée par le complexe multimoléculaire MCU, qui a un rôle central dans l'influx de Ca^{2+} mitochondrial (Baughman et al, 2011). Ces dernières années, il a été démontré que l'augmentation d'expression de MCU était de mauvais pronostic chez les patients atteint de CCR (Liu et al, 2020). Le complexe MCU est composé de trois sous-unités protéiques régulatrices de l'absorption du Ca^{2+}, MICU1, MICU2 et MICU3. Cependant, l'étude des protéines régulatrices MICUs dans un contexte cancéreux reste très limitée. Une étude a démontré dans le cadre du cancer de l'ovaire que l'inhibition de MICU1 inhibe la croissance cellulaire, la migration et l'invasion *in vitro*, tandis que son inhibition *in vivo* inhibe la croissance tumorale et augmente l'efficacité du cisplatine et la survie globale (Chakraborty et al. 2017). MICU1 joue également un rôle essentiel dans la régulation des fonctions des enzymes métaboliques dépendantes du Ca^{2+} pouvant être à l'origine d'une reprogrammation métabolique (Chakraborty et al. 2017). Or la fonction de la protéine MICU2 dépend

principalement de la présence et la quantité de MICU1 pour son ancrage au complexe MCU. En effet, la perte d'expression de MICU1 entraîne à la fois une perte de la liaison de MICU2 au complexe MCU mais également une diminution de l'expression de MICU2 (Patron et al. 2014; Kamer and Mootha 2014).
Par ailleurs, une étude récente a proposé une signature de risque basée sur l'expression des transcrits de tous les membres du complexe MCU et les auteurs ont démontré l'importance de l'expression de MCU, MCUb et MICU2 pour le pronostic chez des patients atteints de CCR (Zhu et al. 2023).

Quel que soit le type de cancer, aucune étude n'a entrepris l'étude fonctionnel du rôle de MICU2 dans les processus physiopathologiques menant au développement du cancer.
De par les éléments présentés ci-dessus, nous avons souhaité porter nos investigations sur l'implication des protéines régulatrices de l'uniporteur MCU. Nous proposons dans le cadre de cette thèse un focus particulier sur la protéine MICU2 comme acteur pertinent de la signalisation calcique et du métabolisme tumoral.

Ainsi, l'objectif principal a été de déterminer le rôle des protéines régulatrices MICU2 dans le cancer colorectal et leurs conséquences sur les différentes activités mitochondriales (dans la régulation de la signalisation calcique, le métabolisme, la fonction bioénergétique, la reprogrammation du métabolisme, la dynamique mitochondriale). Mes travaux se basent sur l'analyse de bases de données transcriptomiques (cohortes de patients comprenant des tumeurs primaires et métastatiques) et sur l'utilisation de différentes lignées cellulaires coliques (normales ou cancéreuses).
Nous avons généré des lignées KO invalidées pour MICU2 (KO MICU2 #A et KO MICU2 #B) par la méthode CRISPR/Cas9 afin d'étudier la fonction cellulaire de MICU2. Nous avons également eu recours à des modèles précliniques de xénogreffe pour confirmer nos résultats obtenus *in vitro*.

Faits marquants

Nous avons démontré le rôle de MICU2 sur l'absorption du Ca^{2+} par les mitochondries et sa contribution en tant qu'élément capital dans le maintien du bon fonctionnement mitochondrial. Nous démontrons dans cette thèse l'implication de MICU2 dans la régulation

des processus de fusion-fission, mais aussi dans l'optimisation de l'activité de la CRM à des concentrations Ca^{2+} cytosolique physiologique de 150 nM. La présence de MICU2 est un élément nécessaire à l'utilisation du pyruvate par les mitochondries et le maintien de l'oxydation des acides gras. Dans l'ensemble, nous rapportons pour la première fois que MICU2 serait un gardien de la fonction de la CRM et un élément pivot dans la transition métabolique du cancer d'un métabolisme oxydatif vers la glycolyse soutenant le développement de phénotype tumoraux pro-prolifératifs et pro-migratoires.

Ces données font l'objet d'une révision en vue d'une publication originale en première auteure dans *PLOS Biology*. D'autres travaux sur le sujet n'ont pas été soumis et font l'objet d'une partie « données complémentaires ».

Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique

1. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans des incubateurs sous atmosphère humide, à une température de 37 °C, avec 5 % de dioxyde de carbone (CO_2). La culture des cellules a été réalisée sous hotte à flux laminaire, en conditions stériles afin d'éviter les contaminations bactériennes.

1.1 Cellules colorectales non cancéreuse

Les cellules NCM356 (Incell Corporation, LLC, San Antonio, TX, USA) ont été cultivées dans un milieu à haute teneur en glucose, Dulbecco's Modifed Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) supplémenté avec 10 % de sérum de veaux fœtal (SVF, Eurobio, Les Ulis, France), et 1 % de pénicilline et streptomycine (Eurobio, Les Ulis, France).

1.2 Cellules colorectales cancéreuses

Les cellules HCT116, HT29, DLD1, SW480 et SW620 ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 + GlutaMax (Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France) supplémenté avec 10 % de sérum de SVF (Eurobio, Les Ulis, France) et 1 % d'antibiotiques (Eurobio, Les Ulis, France).

Deux clones knockout MICU2 (KO MICU2), ont été générés à partir de la lignée cellulaire HCT116 (ATCC), en utilisant le système CRISPR/Cas9 (clones commerciaux Ubigène).
Deux séquences ciblant l'exon 2 ont été utilisées pour les KO MICU2 :

- MICU2-gRNA3 : ACACTTAGAGATTAAACGAGG
- MICU2-gRNA6 : GTATTCCAGTACACTTAGGAAGG

Ces deux séquences ont été validées par PCR et imagerie.

2. Test de viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée par la sulforhodamine B (SRB) qui est un test colorimétrique indépendant du métabolisme mitochondrial. Ce test repose sur la capacité de la SRB à lier les composants protéiques cellulaires et à mesurer la biomasse totale. La SRB est un colorant aminoxanthène rose vif qui peut former un complexe électrostatique avec des résidus d'acides aminés basiques de protéines dans des conditions légèrement acides, mais il peut se dissocier dans des conditions basiques. Les cellules ont été ensemencées en plaque 24 puits à une densité de 20 000 cellules / puits dans un volume de milieu de 500 µL. Le milieu de culture contenant les traitements a été retiré des puits et ces derniers ont été lavés deux fois avec du PBS avec Ca^{2+} et magnésium (Mg^{+}) (Lonza). Les cellules ont ensuite été fixées avec 500 µL d'Acide Trichloroacétique à 50 % (TCA, Sigma-Aldrich) puis incubées 1 heure à 4°C. Des lavages ont été réalisés à l'eau distillée avant incubation des cellules avec 200 µL de SRB (Sigma Aldrich) à 0,4 % (dilué avec de l'acide acétique 1 %) pendant 15 minutes à température ambiante sous agitation. L'ensemble des puits a été rincé 3 fois à l'acide acétique à 1 % puis les cellules ont été lysées à l'aide de 1 mL de TrisBase 10 mM (ThermoFisher). Après une incubation de 20 minutes sous agitation à température ambiante, l'absorbance de chaque puits a été lue à 540 nm avec un spectrophotomètre (Epoch, BioTek Instruments, Vermont, USA).

3. Test de prolifération cellulaire

Le test de prolifération cellulaire CyQUANT® (Thermo Fisher Scientific, C35006) est une méthode hautement sensible basée sur la fluorescence pour quantifier les cellules de manière indirecte et évaluer la prolifération cellulaire et la cytotoxicité. Le composant principal du test du CyQUANT® est le CyQUANT® GR, un colorant exclusif qui présente une forte amélioration de la fluorescence lorsqu'il est lié aux acides nucléiques. Ce test CyQuant permet donc de mesurer la teneur en ADN indépendamment de l'activité métabolique. Les cellules sont ensemencées à 5 000 cellules / puits dans une plaque 96 puits. Le colorant, CyQUANT® GR, est dilué dans du tampon HBSS. Pour la lecture, 100µL de ce mélange a été ajouté dans chaque puits. La plaque 96 puits est ensuite incubée à 37 °C avec 5 % de CO_2 pour 30 minutes. L'intensité de fluorescence a été mesurée à une excitation de 480 nm et une émission de 530 nm à l'aide d'un lecteur de plaque multimodal, le spectrofluorimètre Flexstation 3 (Molecular Devices, CA, USA).

4. Cycle cellulaire

Pour déterminer la proportion de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire, le contenu en ADN est mesuré grâce à un agent intercalant fluorescent, l'iodure de propidium (PI). Les cellules ont été récoltées à l'aide de trypsine-acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) 24 heures après le traitement, lavées dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), fixées dans de l'éthanol froid à 70 % et incubées à -20 °C pendant 2 heures. Ensuite, les échantillons ont été remis en suspension dans du PBS avec de la RNase et colorés avec 0,025 mg/mL de PI pendant 30 minutes dans l'obscurité et à température ambiante. La teneur en ADN des cellules colorées a été analysée à l'aide d'un cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pour chaque échantillon, un minimum de 50 000 cellules a été évalué. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Kaluza 1.3 (Beckman Coulter).

5. Migration par recouvrement cellulaire après cicatrice

Ce test de migration est une méthode de détermination de la migration des cellules par une cicatrice à la surface d'une monocouche cellulaire à confluence afin de créer un espace libre et étroit. Pour l'ensemencement, nous avons utilisé des inserts Ibidi à deux puits (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany). La migration des cellules environnantes dans l'espace libre est évaluée jusqu'à ce que l'espace soit rempli sur 24 heures. Les inserts de culture sont posés dans des plaques 24 puits prétraitées avec une matrice de fibronectine (1/300). Les cellules ont été ensemencées à 60 000 cellules / puits dans chaque insert de culture avec 100 µL de milieu de culture (RPMI 1640-GlutaMax supplémenté avec 10 % de SVF et 1 % d'antibiotiques). La plaque 24 puits où se trouvent les inserts de culture est incubée à 37°C et 5% de CO_2 pour 24 heures. Les inserts sont ensuite enlevés pour créer la cicatrice et 500 µL de milieu ont été ajoutés. La plaque est placée dans une chambre thermostatée maintenue à 37 °C et 5 % de CO_2 (Okolab Cage Incubator, Okolab, Pozzuoli, Italie), connectée à une caméra DS Qi2 Cooled et le logiciel Elements effectuant des photographies de la cicatrice à des intervalles réguliers de 15 minutes pendant 24 heures. A la fin de la migration, l'aire de la cicatrice non recouverte est mesurée en utilisant le logiciel T-scratch. Le pourcentage de recouvrement est calculé en utilisant la formule :

$$\% \text{ recouvrement } \% = \frac{\text{AT 0H} - \text{AT 24H}}{\text{AT 0H}}$$

où $A_{T\ 0H}$ est l'aire de la cicatrice non couverte mesurée au début de l'acquisition immédiatement après la création de la cicatrice. $A_{T\ 24H}$ est l'aire de la cicatrice non couverte mesurée après 24 heures après la création de la cicatrice.

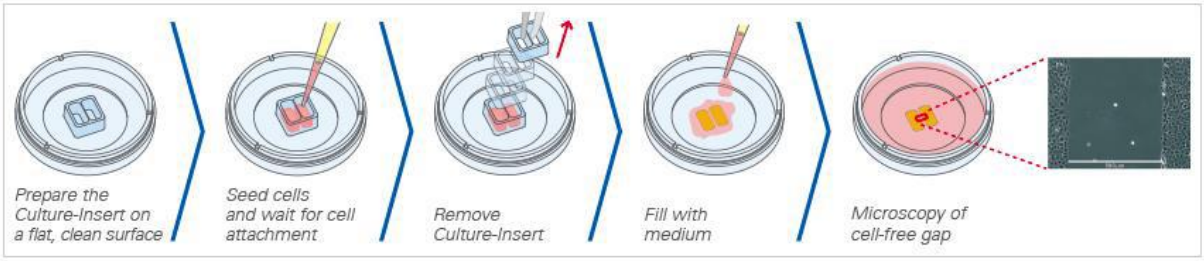


Figure 22 : Représentation de l'expérience de migration (D'après le site du fournisseur Ibidi.com)

6. Migration cellulaire par sphéroïdes

Les sphéroïdes sont des agrégats cellulaires tridimensionnels (3D) permettant de reproduire partiellement l'architecture cellulaire des tumeurs. Les sphéroïdes permettent de suivre le comportement tumoral, car, comme les tumeurs malignes, ils contiennent à la fois des cellules en profondeur et celles dont la surface est exposée, des cellules proliférantes et non proliférantes, ainsi qu'un cœur hypoxique en opposition à une couche externe bien oxygénée. Les sphéroïdes ont été préparés par la méthode dite « drop hanging drop ». Pour cela, les cellules ont été déposés sous forme de gouttes de cellules à hauteur de 3 000 cellules pour une goutte de 30 µL dans le couvercle d'une boîte de Pétri (353003, Falcon), le couvercle a ensuite été retourné et 5 mL de PBS a été ajouté dans la boîte afin de maintenir un taux d'humidité constant. Après 4 jours d'incubation à 37 °C avec 5 % de CO_2, les sphéroïdes sont placés dans une plaque à 96 puits (353077, Falcon) préalablement recouverte d'une matrice de fibronectine diluée au 1/300ème dans du PBS. Les cellules provenant du sphéroïde et ayant migrées autour ont été photographiées à l'aide d'un microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) à 0, 24 et 48 heures. L'aire de la migration autour du sphéroïde a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ/ Fiji (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

7. Immunohistochimie

Pour étudier la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, une immunohistochimie a été réalisée à l'aide d'un anticorps Ki67, qui est une protéine nucléaire exprimée durant les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. L'immunohistochimie a été réalisée à l'aide d'un appareil Discovery Ultra (Roche, Mannheim, Allemagne) et du kit Chromo-Map (référence : 760-159, Roche) sur la plateforme d'imagerie H2P2 de Rennes. L'anticorps primaire (Ki67) a été dilué avec un diluant pour anticorps (référence : 760-108, Roche). Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 60 minutes à 37°C. L'application automatique de l'anticorps secondaire a été faite avec Omni Map anti-Rb HRP (Référence : 760-4311, Roche). La coloration a été visualisée par l'addition automatique du substrat (H_2O_2+DAB) du kit Chromo-Map et de la HRP de l'anticorps secondaire. De plus la contre-coloration a été réalisée avec de l'hématoxyline II (référence : 790-2208, Roche) pendant 4 minutes. Pour finir les lames ont ensuite été déshydratées et montées avec le milieu de montage Pertex (Référence : 00811-EX, Histolab, Askim).

8. Mesure du potentiel de membrane

La mesure du potentiel de membrane a été réalisée à l'aide du TMRE (ab113852), une sonde fluorescente. Les cellules ont été ensemencées dans une plaque à 96 puits à hauteur de 30 000 cellules par puits. Vingt-quatre heures après, le TMRE a été ajouté à une concentration finale de 5 µM. La plaque a ensuite été incubée pendant 45 minutes à 37 °C, puis la mesure du potentiel de membrane a été effectuée avec un lecteur de plaque multimode, la Flexstation-3 (Molecular Devices, CA, USA) à une excitation de 549 nm et une émission de 575 nm.

II. Etude des mesures calciques

1. Mesure du calcium mitochondrial

La mesure du calcium mitochondrial a été réalisée à l'aide d'une sonde mito-SP-linker-GCaMP6m (*cf* figure 23), nommé mt-riG6m d'après Li et al (Jia Li et al. 2020). Les cellules ont été transfectées à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) avec 1,5 µg de pCDNA3.1 mt-riG6m 48 heures avant l'imagerie. 24 heures avant les expériences, les cellules transfectées ont été placées dans un FluoroDish™ (FD35-100) à hauteur de 150 000 cellules. Pendant l'expérience, les cellules transfectées ont été stimulées à la 1ère minute avec 10 µM d'acide

lysophosphatidique (LPA, qui mobilise le Ca^{2+} intracellulaire par activation de la voie SOCE) dans du PBS contenant 2 mM de CaCl2. Les images Time-lapse ont été acquises par microscopie à épifluorescence (Nikon).

2. Mesure des réserves calciques

La déplétion des réserves de Ca^{2+} dans le RE a été quantifiée en transfectant à l'aide d'une sonde for mKate-linker-G-CEPIA1^{er} (*cf* figure 23) nommé miGer (Li et al. 2020) (1,5µg) à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA), 48 heures avant l'imagerie. 24 heures, avant les expériences, les cellules transfectées ont été placées dans un FluoroDish™ (FD35-100) à hauteur de 150 000 cellules. Les cellules transfectées ont été traitées à la 1ère minute au début de l'expérience avec 10 µM de TG (T7458, Life Technologies, Thermo Fisher) dans du PBS avec 0 mM de Ca^{2+}. Les mesures relatives du Ca^{2+} dans le RE ont été enregistrées à l'aide d'un objectif 20×, à l'aide d'images acquises en mode Time-lapse par microscopie à épifluorescence (Nikon).

Les sondes : mt-riG6m et miGer ont été gracieusement partagées par Jia Li et al de l'université de Pékin en Chine (Li et al. 2020)



Figure 23 : Schéma montrant la conception des séquences des sondes calciques fluorescentes ciblant le RE et la mitochondrie.

Les séquences sont composées d'une séquence peptidique ciblant le RE (ER-SP) ou la mitochondrie (mito-SP), d'un linker 1, de protéines fluorescentes insensible au Ca^{2+} (mKate ou RFP) et un indicateur fluorescent avec une forte sensibilité au Ca^{2+} (GCaMP6m pour la sonde mitochondriale) spécifique du Ca^{2+} RE (G-CEPIA1^{er} pour le RE qui est spécifique au Ca^{2+} du RE).

3. Mesure de l'entrée SOCE

Les cellules ont été ensemencées à hauteur de 20 000 cellules par puits dans 200 µL de milieu de culture, dans une plaque de 96 puits noir à fond clair. Après 24 heures, les cellules adhérentes ont été chargées avec la sonde ratiométrique Fura2-AM (Molecular Probes, sonde liant le Ca^{2+} à 37 °C pendant 45 minutes. Le groupement acétoxyméthylester (AM) permet à la sonde de passer la double couche lipidique de la MP, puis est clivé par les estérases cellulaires piégeant ainsi la sonde dans le cytosol. Le milieu est ensuite retiré, et les cellules sont placées dans 100 µL de solution saline physiologique (PSS) (140 nM NaCl, 2 mM MgCl2, 4 mM KCl, 11 mM Glucose, 10 mM HEPES et 1 mM EGTA) exempte de Ca^{2+}. Lors de la lecture, à la $100^{ème}$ secondes, la thapsigargine (TG), un inhibiteur des pompes calciques SERCA, est injectée à une concentration de 2 µM, permettant d'empêcher la recapture du calcium cytosolique par le RE et donc conduire à l'épuisement des réserves calciques du RE. L'entrée de Ca^{2+} a été stimulée par l'injection à la $500^{ème}$ secondes de 2 mM de CaCl2. L'émission de fluorescence a été mesurée à 510 nm à l'aide de la FlexStation-3 (Molecular Devices, CA, USA) avec une excitation à 340 et 380 nm. La fluorescence maximale (pic d'influx de Ca^{2+} [F340/F380]) a été mesurée dans les cellules KO MICU2 et comparée aux cellules contrôles.

III. Mesure de la production des ROS

Un million de cellules ont été colorées pendant 10 minutes à 37 °C avec 5 µM de Dichlorofluorescein Diacetate (DCFDA), qui permet la mesure des ROS cytosoliques. Les cellules ont ensuite été lavées et analysées par cytométrie en flux Gallios (Beckman Coulter, Villepinte, France) (excitation : 492-495 nm, émission : 517-527 nm). Les ROS dérivés des mitochondries ont aussi été détectés dans 1 million de cellules colorées à 37 °C pendant 10 minutes avec 5 µM de MitoSOX (DHE). Après coloration, les cellules ont été lavées et analysées par cytométrie en flux Gallios (excitation : 510 nm, émission : 580 nm).

IV. Etude des différentes voies métaboliques

1. Utilisation de milieux et inhibiteurs spécifiques

Des milieux spécifiques ont été utilisés dans le but de déterminer les préférences métaboliques de nos lignées cellulaires. Les milieux spécifiques sont les suivants :

- RPMI Medium 1640 [-] Glutamine (Référence : 42401018)
- RPMI Medium 1640 [-] Glucose (Référence : 11879020)
- RPMI Medium 1640 [+] 4.5 g/L D-Glucose (Référence : A1049101).

Ces milieux spécifiques proviennent du même fournisseur : Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France.

Des inhibiteurs des différentes voies métaboliques ont également été utilisés (cf tableau V).

Tableau IV : Inhibiteurs des différentes voies métaboliques

Inhibiteurs	Concentrations	Références
2-Deoxy-D-glucose (2-DG)	5 mM	Sigma-Aldrich (D8375)
2NBDG	100 µM	Abcam (ab146200)
UK5099	50 µM	MedChemExpress (HY-15475)
Rotenone	0,5, 1 et 2,5 µM	Tocris (CAS 83-79-4)
Oligomycine	0,5, 1 et 2,5 µM	Abcam (ab141829)
Trimetazidine	10 µM	Sigma-Aldrich (653322)
Etomoxir	10 µM	Sigma-Aldrich (E1905)
Telaglenastat	1 et 5 µM	MedChemExpress (HY-12248)
V-9302	5 et 10 µM	MedChemExpress (HY-112683)
BAPTA	2,5 et 5 µM	Sigma-Aldrich (A1076)
MITOTEMPO	2,5 et 5 µM	Sigma-Aldrich (SML0737)
AMPK inhibitor (Compound C)	5 et 10 µM	Sigma-Aldrich (171260)

2. Dosage du lactate

Le lactate a été dosé à l'aide d'un kit de colorimétrie (Elabscience). En utilisant le NAD^+ comme accepteur d'hydrogène, la lactate déshydrogénase (LDH) catalyse la conversion du lactate en pyruvate et du NAD^+ en NADH. Le 1-méthoxy-5-méthyl sulfate transfère l'hydrogène du NADH au bleu de nitrotetrazolium qui se désoxyde en substrat chromogène violet. Après le mélange des réactifs, les cellules ont été placées dans une plaque 24 puits à hauteur de 100 000 à 1 million de cellules par puits et incubées pendant 24 heures. Par la suite, le surnageant a été récupéré et la concentration en acide lactique a été mesurée par spectrophotomètre à une absorbance de 530 nm (Epoch, BioTek Instruments, Vermont, USA).

3. Dosage de la pyruvate déshydrogénase

L'activité de la pyruvate déshydrogénase (PDH) est déterminée à l'aide d'une réaction enzymatique donnant un produit colorimétrique proportionnel à l'activité enzymatique présente. Une unité de pyruvate déshydrogénase est la quantité d'enzyme que génère 1,0 mmole de NADH par minute à 37 °C.

L'activité de la PDH a été mesurée à l'aide d'un kit colorimétrique (Sigma-Aldrich). Le surnageant des cellules a été dilué 10 fois dans un tampon de dosage et l'absorbance à 450 nm a été mesurée pendant 1 heure à 37 °C après l'ajout du révélateur du substrat PDH. Les mesures ont été effectuées à l'aide de la Flexstation-3 (Molecular Devices, CA, USA) dans des plaques 96 puits noirs à fond clair. Une gamme de NADH est nécessaire. Les valeurs à blanc de l'échantillon (sans substrat PDH) ont été soustraites des lectures de l'échantillon et l'activité PDH (nmole NADH/min) a été normalisée par mg de protéines.

4. Dosage de l'Acétyl-CoA

La teneur en Acétyl-CoA du milieu de culture cellulaire a été évalué à l'aide d'un kit de dosage fluorométrique (PicoProbe AcCoA - ab87546, Abcam). Pour être quantifié, le CoA libre est désactivé, l'Acétyl CoA est converti en CoA. Le CoA produit ensuite du NADH qui interagit avec la sonde pour générer une fluorescence.

Le CoASH Quencher et le Quencher Remover ont été ajoutés aux échantillons pour corriger le bruit de fond généré par la CoASH et le succ-CoA libres. Les échantillons ont ensuite été dilués avec le mélange réactionnel composés du tampon de dosage, des substrats, de l'enzyme de conversion, des enzymes et de la pico-sonde. Une gamme étalon est réalisée à partir d'Acétyl-CoA à 0,02 mM allant 0 à 1 000 pmol/puits. La fluorescence a été mesurée à l'aide de la FlexStation-3 à une excitation de 535 nm et une émission de 587 nm (Molecular Devices, CA, USA).

5. Activité d'oxydation des acides gras

L'activité d'oxydation des acides gras a été évaluée avec une sonde fluorescente FAOBlue (Funakoshi, Japon), qui possède un colorant coumarinique et une chaîne d'acide gras à 9 carbones protégé par un ester acétoxyméthylique. Le FAOBlue rentre dans les cellules par pénétration directe de la membrane cellulaire et son ester acétoxyméthylique est hydrolysé par les estérases intracellulaires. L'acide gras libre du FAOBlue est converti en acyl-CoA et

ensuite incorporé dans la voie d'oxydation des acides gras. L'acyl-CoA du FAOBlue est dégradé par trois cycles de la voie de l'oxydation des acides gras, en coumarine non fluorescente possédant un acide propionique (C3). Après la 4ème dégradation, le colorant coumarinique est libéré de l'acide propionique et diffusé dans les cellules entières.

Les cellules ont été ensemencées dans une plaque 96 puits noirs à fond clair à hauteur de 40 000 cellules par puits. Vingt-quatre heures après, le milieu de culture est retiré et la sonde FAOBlue est ajoutée à une concentration de 20 µM dans un tampon salin physiologique (PSS) avec ou sans prétraitement à l'etomoxir (20 µM pendant 6 heures), un puissant inhibiteur de l'oxydation des acides gras. Après incubation de la sonde FAOBlue, la fluorescence bleue est mesurée à une excitation de 405 nm et une émission de 430-480 nm à l'aide de la FlexStation-3 (Molecular Devices, CA, USA).

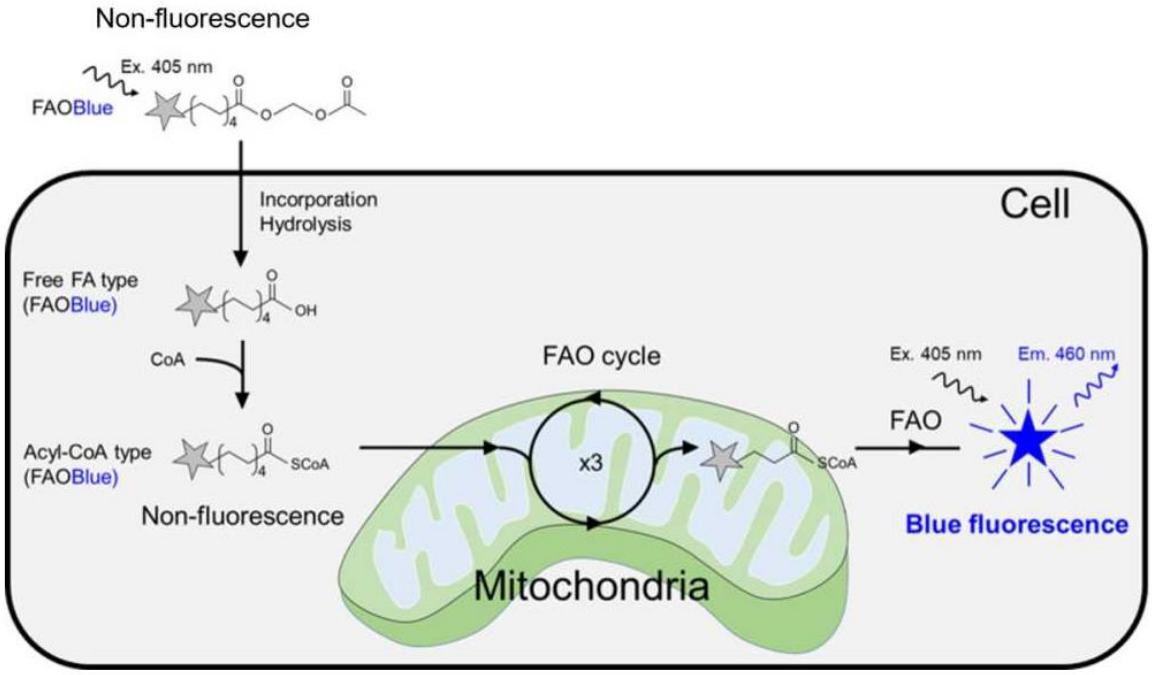


Figure 24 : Principe de la sonde fluorescente FAOBlue (Funakoshi.co)

6. Caractérisation des lipides

La chromatographie en phase gazeuse (GC) a été utilisée pour identifier et quantifier la teneur en acide gras des lipides des cellules. Des culots cellulaires de 40 millions de cellules ont été préparés pour évaluer la teneur d'acides gras dans les cellules.

La GC a été réalisée, après extraction des lipides totaux par la méthode Blight et Dyer (Bligh and Dyer 1959). Les lipides totaux ont été séparés à l'aide de plaques de chromatographie en couche mince sur gel de silice préparatif (TLC unidimensionnelle) (LK5, 20 × 20 cm, Merck Millipore, France), le solvant étant l'hexane, l'éther diéthylique et l'acide acétique (70/30/1, v/v). Les taches de triglycérides ont été grattées et recueillies dans des tubes en verre à bouchon vissé. Les acides gras des triglycérides ont été préparés sous forme d'esters méthyliques d'acides gras (Morrison and Smith 1964) avant d'être analysés par chromatographie en phase gazeuse (GC-2010 plus, Shimadzu Scientific instruments, Noisiel, France) à l'aide d'une colonne capillaire BPX70 (0,25 µm, 60 m x 0,25 mm ID (SAS, Courtaboeuf, France). L'hydrogène a été utilisé comme gaz vecteur à une pression constante (220 kPa). Après une injection de l'échantillon dans la colonne à 60 °C, la température du four est passée de 60 °C à 220 °C. Les esters d'acides gras ont été détectés par un détecteur à ionisation de flamme à 225 °C et identifiés par comparaison de leurs temps de rétention avec des étalons commerciaux (Supelco 37 Fatty Acid Methyl Ester mix, Sigma-Aldrich, France). Les niveaux d'esters d'acides gras ont été exprimés en pourcentage de la surface totale des pics intégrés à l'aide du logiciel GC solutions (Shimadzu, Noisiel, France).

V. Etude du métabolisme mitochondrial

1. Mesure de la consommation d’oxygène

Les mesures de la consommation d’oxygène mitochondrial ont été réalisées par la technique d’oxygraphie qui permet de mesurer la quantité d’oxygène consommée par la mitochondrie en présence de divers substrats et inhibiteurs de la CRM. Les appareils utilisés sont un oxygraphe haute résolution Oroboros Oxygraph-2k (Oroboros Instrument) et un analyseur Seahorse™ XF96 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Les résultats ont été analysés à l’aide du logiciel DatLab 5 (Oroboros Instrument) ou du logiciel Seahorse Wave Desktop. Les courbes obtenues représentent la diminution de la concentration d’oxygène dans la cuve réactionnelle au cours du temps.

Deux conditions expérimentales de mesure ont été utilisées : en cellules entières ou sur cellules perméabilisées.

1.1 Sur cellules entières

1.1.1 Principe

La mesure en cellules entières est réalisée avec du milieu de culture, sans ajout de substrat pour que les mitochondries utilisent les substrats cellulaires endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour pouvoir respirer.

La consommation d'oxygène peut être déterminée pour différents états respiratoires :

- L'état de routine ou état basal : consommation d'oxygène basal des cellules avec les substrats présents dans le milieu de culture nécessaire à la synthèse d'ATP mitochondriale
- L'état non phosphorylant : consommation d'oxygène après ajout de l'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase) en condition non-phosphorylante. Cette consommation d'oxygène correspond à la quantité d'oxygène consommée par la mitochondrie mais non utilisée pour la synthèse d'ATP.
- L'état FCCP : consommation d'oxygène après ajout du FCCP, qui permet de dissiper le gradient de protons. La consommation d'oxygène reflète la capacité maximale de fonctionnement de la CRM.
- L'état résiduel : consommation d'oxygène obtenue après ajout d'antimycine A (inhibiteur du complexe III de la CRM). Cette consommation d'oxygène représente la part d'oxygène non utilisée par la mitochondrie qui est soustraite aux autres consommations d'oxygène obtenues précédemment.

1.1.2 Protocole d'oxygraphie

Les mesures ont été réalisées à 37 °C sous agitation magnétique en plaçant 2 millions de cellules dans un volume final de 2 mL de milieu de culture (RPMI, RPMI sans glucose, RPMI avec concentration de glucose élevée ou RPMI sans glucose supplémenté en acide oléique (120 µM)) avec 10 % de SVF dans un oxygraphe (OROBOROS oxygraph-2k). Les cellules de chaque lignée ont été traitées avec leur milieu respectif 48 heures avant l'expérience. Elles ont ensuite été récoltées, comptées et centrifugées à 700 g pendant 3 minutes. Le culot cellulaire a été suspendu dans 5 mL de milieu sélectionné avec du SVF et centrifugé à 800 g pendant 2 minutes. Le culot résiduel résultant a ensuite été remis en suspension dans 500 µL de milieu sélectionné avec SVF (solution cellulaire utilisée pour la mesure de l'oxygénation).

Les cellules remises en suspension ont été ajoutées au 1,5 mL de milieu frais avec SVF déjà présent dans la cuve de mesure. Dès qu'une pente régulière est obtenue, la consommation d'oxygène est mesurée. L'OXPHOS a ensuite été inhibée par l'ajout d'oligomycine (un inhibiteur de l'ATP synthase ; 5,25 µg/mL) ; le taux de respiration obtenu correspond à l'état de déperdition d'énergie. Des ajouts successifs de FCCP (un découpleur protonophore ; 0,8 µM) ont ensuite été effectués jusqu'à ce que le taux de respiration maximal soit atteint. Enfin, 2 µM d'antimycine A ont été ajoutés pour déterminer la consommation d'oxygène non-mitochondriale.

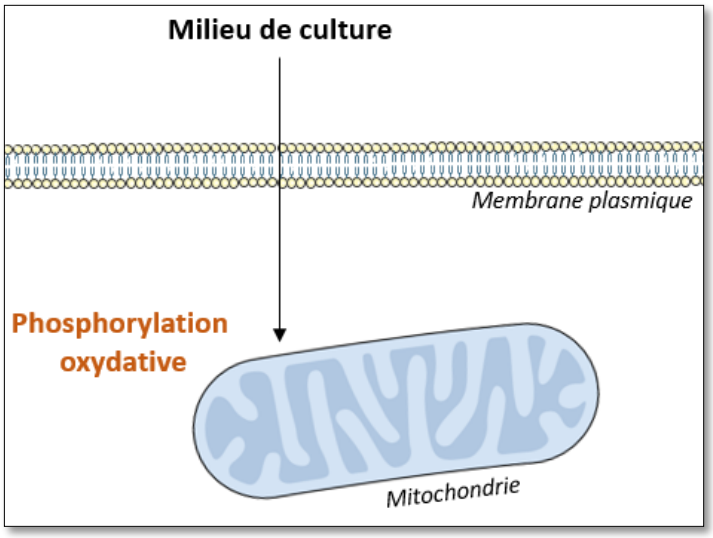


Figure 25 : Schéma représentatif du mécanisme de « cellules entières »

1.2 Sur cellules perméabilisées

1.2.1 Principe

La mesure sur cellules perméabilisées est réalisée dans un tampon de respiration avec de l'albumine sérum bovin (BSA) ne contenant pas d'acides gras. Elle est effectuée après avoir perméabilisée la membrane plasmique avec de la digitonine, qui est un détergent. Des substrats respiratoires sont ajoutés pour contrôler l'apport des substrats à la mitochondrie et mesurer le fonctionnement intrinsèque de la CRM.

La consommation d'oxygène peut être déterminée pour différents états respiratoires :

- Consommation d'oxygène proportionnelle au gaspillage énergétique (fuite de protons) sans inhibition de la synthèse d'ATP ou d'ADP. Celui-ci est mesuré après ajout de succinate (Etat II).
- Consommation d'oxygène proportionnelle à la respiration phosphorylante (Etat III). Cette mesure est effectuée après ajout d'ADP (1,5 mM) associée à un ou plusieurs substrats des différents complexes de la CRM (succinate pour notre étude).
- Consommation d'oxygène proportionnelle au gaspillage énergétique (fuite de protons) avec inhibition de la synthèse d'ATP. Celui-ci est mesuré après ajout de l'oligomycine (Etat IV).

1.2.2 Protocole d'oxygraphie

Les cellules ont été détachées à l'aide de trypsine, comptées puis centrifugées à 700 x g pendant 3 minutes. Le culot de 3 millions de cellules a été mis en suspension dans 1 mL de tampon de respiration sans BSA (10 mM KH2PO4, 300 mM mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl2, et 1 mM EGTA, pH 7,4 à 37 °C) puis la membrane plasmique a été perméabilisée par un ajout de digitonine (1 mg/mL préalablement chauffée à 95°C pendant 2,5 minutes) (6 µL pour 1 million de cellules HCT116). L'ensemble a été agité doucement pendant 2 minutes. Ensuite, 4 mL de tampon de respiration (10 mM KH2PO4, 300 mM mannitol, 10 mM KCl, 5 mM MgCl2, et 1 mM EGTA, pH 7,4 à 37 °C) avec BSA sans acide gras ont été ajoutés pour stopper l'action de la digitonine. Le mélange a été centrifugé à 800 g pendant 2 minutes. Le culot obtenu a ensuite été remis en suspension dans 500 µL de tampon de respiration avec BSA (solution pour la mesure de l'oxygène). Les cellules remises en suspension dans le tampon de respiration avec BSA ont été ajoutées à la cuve de mesure contenant 1,5 mL de tampon de respiration avec BSA.

Les doses de digitonine ont été préalablement déterminées, en mesurant la consommation d'oxygène sur cellules entières par ajout de doses croissantes de digitonine (1 mg/mL) afin d'obtenir la consommation d'oxygène maximale.

Dès qu'une pente régulière est obtenue, 10 µM de succinate (le succinate va être oxydé en fumarate au niveau du complexe II et ainsi permettre le transfert des électrons à travers la CRM) et 1,5 mM d'ADP sont ajoutés et la consommation d'oxygène liée à la synthèse d'ATP est déterminée. L'OXPHOS a ensuite été inhibée par l'ajout d'oligomycine (5,25 µg/mL). Une fois la consommation d'oxygène stabilisée, du FCCP (0,8 µM) a été ajouté jusqu'à ce que la

respiration maximale soit atteinte. Du cytochrome c a été ajouté, pour contrôler l'intégrité de la membrane mitochondriale externe, puis 2 µM d'antimycine A ont été ajoutés pour inhiber le complexe III.

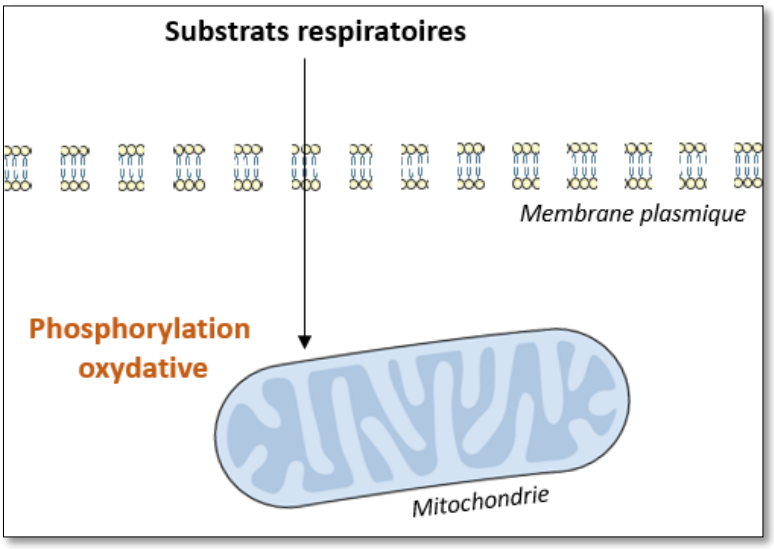


Figure 26: Schéma représentatif du mécanisme de « cellules perméabilisées »

1.3 Analyse par Seahorse

Les données relatives au taux de consommation d'oxygène cellulaire (OCR) ont été obtenues à l'aide d'un analyseur de flux Seahorse™ XF96 de Seahorse Bioscience (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Brièvement, les cellules ont été ensemencées dans des plaques de culture cellulaire XF96 à raison de 20 000 cellules par puits. Le jour de l'analyse, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM XF (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) supplémenté avec 2 mM de glutamine et sans bicarbonate (pH 7,4). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C dans un incubateur sans CO_2 pendant 1 heure. Les mesures ont été effectuées comme décrit dans les légendes des figures correspondantes. L'injection séquentielle de 10 mM de glucose, 1 µM d'oligomycine, 100 µM de dinitrophénol (DNP) et 0,5 µM de roténone/antimycine A permet de déterminer les principaux paramètres respiratoires (*cf* figure 27). Les données ont été normalisées en fonction de la quantité d'ADN présente dans les cellules et analysées à l'aide du kit Cyquant® Cell Proliferation Assay

(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). Les données ont été acquises avec le contrôleur Seahorse Wave et analysées avec le logiciel Seahorse Wave Desktop.

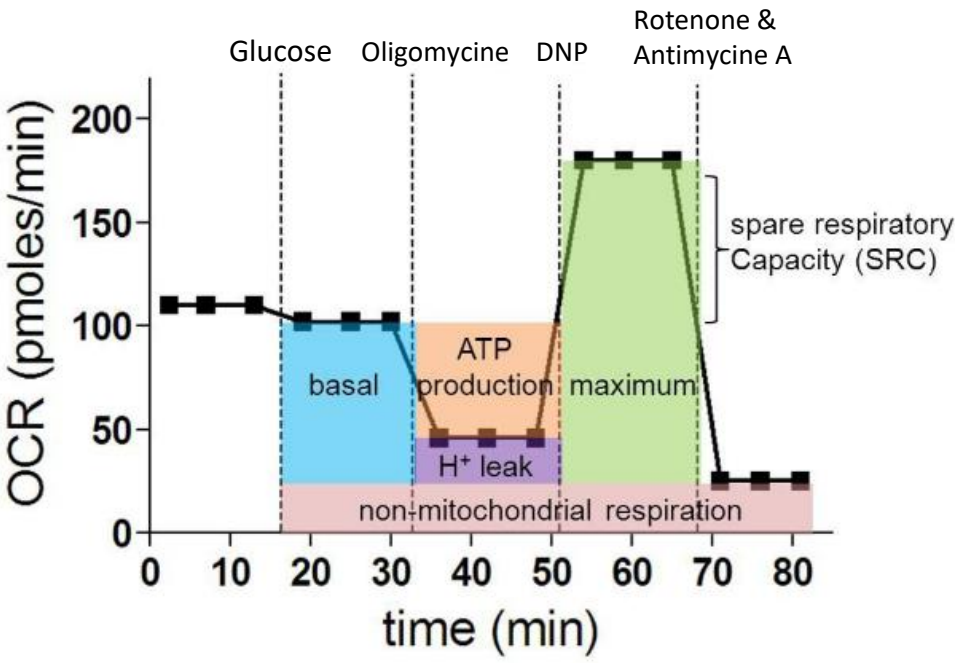


Figure 27 : Paramètres respiratoires issus d'une mesure d'OCR (D'après Van Den Bossche, Baardman, and De Winther 2015)

2. Mesure de l'expression des supercomplexes

Les analyses d'assemblage des supercomplexes ont été effectuées à l'institut de biologie en santé au CHU d'Angers. Les mitochondries ont été enrichies par centrifugation différentielle, selon une version légèrement modifiée de la méthode décrite par Bonnet et al (Bonnet et al. 2008). En bref, les culots cellulaires ont été incubés pendant 10 minutes sur la glace avec de la digitonine froide (4 mg/mL dans du PBS [v/v] ou 0,2% w/v) pour dissoudre les membranes cellulaires. Ensuite, la digitonine a été diluée en ajoutant du PBS froid (5% v/v). Les cellules ont été centrifugées à 10 000 g pendant 10 minutes à 4 °C pour récupérer la fraction enrichie en mitochondries. Le culot a été lavé une fois de plus dans 1 mL de PBS froid, centrifugé (10 000 g à 4 °C), remis en suspension à 10 mg/mL dans le tampon AC/BT (acide aminocaproïque 1,5 M et Bis-Tris/HCl 75 mM, pH 7,0, complété par le mini inhibiteur de

Protéase Complet [Roche Diagnostics, Stockholm, Suède]), et conservé congelé à -80 °C jusqu'à l'analyse. Pour les analyses par électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif bleu (BN-PAGE), 50 µg de chaque échantillon ont été dilués à 2 mg/mL dans le tampon AC/BT et les protéines de la membrane mitochondriale ont été solubilisées par incubation avec 6 g/g de protéines de digitonine (1,2 % w/v) pendant 10 minutes à 4°C. Après centrifugation à 20 000 g pendant 20 minutes à 4 °C, le surnageant a été recueilli et 5 % de colorant Serva Blue G (Bio-Rad) dans 1 M d'acide aminocaproïque/50mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0 ont été ajoutés (1/20 v/v) avant le chargement. Les complexes et supercomplexes de la CRM ont été séparés sur des gels Native PAGE Novex 3 %-12 % Bis-Tris (Invitrogen) pendant environ 3 heures et transférés sur des membranes en fluorure de polyvinylidène (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) dans un tampon de blotting froid (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, et 20 % de méthanol). Les membranes ont été hybridées à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques (NDUFS2 monoclonal de lapin, SDHA monoclonal de lapin, UQCRC2 monoclonal de souris, MT-CO1 (COX1) monoclonal de souris, Abcam, Pays-Bas). Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du système d'imagerie Odyssey FC et analysées à l'aide d'Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences).

3. Activités enzymatiques mitochondriales

Les activités du complexe I (NADH ubiquinone réductase) et de la citrate synthase (CS) ont été mesurées à 37 °C avec un spectrophotomètre UVmc2 (SAFAS, Monaco) dans une fraction enrichie en mitochondries. Les cellules ont été remises en suspension dans un tampon cellulaire (250 mM saccharose, 20 mM tris [hydroxyméthyl] aminométhane, 2 mM EGTA, 1 mg/mL BSA, pH 7.2 ; 1 million de cellules pour 50 µL), désagrégées par deux cycles de congélation-décongélation, lavées et centrifugées à 16000g pendant 1min afin d'éliminer la fraction cytosolique. Pour les analyses des complexes I et V, les cellules ont été remises en suspension dans le tampon cellulaire (1 million de cellules pour 250 µL) et soniquées (6 × 5 secondes) sur la glace. Les activités des complexes de la CRM ont été mesurées conformément aux protocoles de routine standard pour le complexe I (NADH:ubiquinone réductase, NUR) (Desquiret-Dumas et al. 2019), le complexe II (succinate:ubiquinone réductase, SUR), le complexe III (ubiquinol:cytochrome c réductase, UCCR), le complexe IV (cytochrome c oxydase, COX) (Medja et al. 2009), le complexe V (F1-ATPase) et le CS65. La teneur en

protéines a été déterminée à l'aide du kit de dosage bicinchoninique (Uptima, Interchim, Montluçon, France) en utilisant la BSA comme étalon.

4. Coloration des gouttelettes lipidiques

Quarante-huit heures avant la fixation, 100 000 cellules par puits ont été placées dans une chambre de culture cellulaire Labtek à 8 puits (154534, Labtek, Brendale, QLD). Les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% à température ambiante pendant 15 minutes. Les chambres de culture cellulaire ont été rincées deux fois avec du PBS froid, perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,5 % pendant 5 minutes à température ambiante, rincées trois fois avec du PBS, puis incubées avec une solution de blocage (PBS contenant 0,2 % de BSA, 0,02 % d'azide de sodium, 0,05 % de Triton X-100 et 10 % de SVF) pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été colorées avec 0,3 % de Red Oil (dilué dans 60 % d'isopropanol) pendant 2 minutes à température ambiante. Les chambres de culture cellulaire ont ensuite été lavées deux fois dans du PBS et les noyaux ont été colorés avec du DAPI (1/5000ème) pendant 5 minutes. Les chambres de culture cellulaire ont ensuite été lavées une nouvelle fois et montées sur des lamelles couvre-objet à l'aide du milieu de montage SlowFade Gold (référence : P36961, Molecular Probes, Oregon, USA).

Le Red Oil a été utilisé pour quantifier le nombre de gouttelettes lipidiques. Les images ont été acquises avec un microscope Leica SP8 (plateforme Ibisa de microscopie de l'Université de Tours). Le traitement et l'analyse des images ont été réalisés à l'aide du logiciel ImageJ/Fiji (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Après l'application d'un seuillage identique pour toutes les images, la fonction d'analyse des particules a été utilisée pour mesurer le nombre de gouttelettes lipidiques par cellule.

5. Microscopie à fluorescence 3D

La caractérisation du réseau mitochondrial a été réalisée dans le laboratoire MitoLab.

Les cellules ont été transfectées avec une protéine fluorescente ciblant les mitochondries (PDH_GFP) ou incubées pendant 15 minutes avec 100 nM de Mitotracker green (Molecular Probes) pour colorer le réseau mitochondrial. Pour l'imagerie de fluorescence, les lamelles ont été montées dans un boîtier et placées sur la platine d'un microscope inversé ECLIPSE Ti-E à grand champ (Nikon, Tokyo, Japon) équipé d'un objectif à immersion d'huile 100× (Nikon Plan Apo100x, N.A. 1.45) et d'une caméra Andor NEO sCOMS contrôlée par le logiciel Metamorph®

7.7 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Un pilote piézoélectrique de précision monté sous la lentille de l'objectif a permis des mouvements en Z plus rapides, en maintenant l'échantillon immobile tout en déplaçant la lentille de l'objectif. Cinquante-cinq plans d'image ont été acquis le long de l'axe Z à des incréments de 0,1 µm. Pour la caractérisation du réseau mitochondrial, les images acquises ont été déconvoluées par itération à l'aide du logiciel Huygens Essential® (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Pays-Bas), avec un score d'itération maximal de 50 et un seuil de qualité de 0,01. Le logiciel Imaris 8.0® (Bitplane, Zurich, Suisse) a été utilisé pour le traitement 3D et l'analyse morphométrique. Le réseau mitochondrial a été modélisé en 3D et des seuils ont été définis pour classer les mitochondries en fonction de leur volume (Imaris Isosurface Tools).

VI. Etude de l'expression génique par RT-qPCR

L'expression des gènes codant pour nos cibles d'intérêt a été étudiée par la méthode de qPCR (réaction de polymérysation en chaîne quantitative) qui permet l'amplification et la quantification d'une séquence d'ADN complémentaire (ADNc) cible en temps réel. Pour obtenir les brins d'ADNc, il est nécessaire d'extraire les ARN totaux et de réaliser une réaction de transcription inverse (RT).

1. Extraction et dosage des ARN totaux

Les cellules ont été récupérées en culot sec et stockées à -20°C. Pour extraire les ARN totaux le kit « Nucleospin RNA Kit » (Macherey Nagel) a été utilisé. Les cellules ont été lysées puis filtrées à l'aide d'une colonne de silice par centrifugation à 11 000 g pendant 1 minute. Par la suite, une endonucléase a été utilisée pour éliminer toute trace d'ADN de l'échantillon. Les ARN totaux alors obtenus et élués dans l'eau « RNAse free » ont été dosés à l'aide du spectrophotomètre Epoch (BioTek Instruments, Vermont, USA) et du logiciel Gen5 pour vérifier que les échantillons ne soient pas contaminés (A260 nm/A280 nm < 1,8 = contamination protéique et A260 nm/A230 nm < 2 = contamination solvants)

2. Transcription inverse

La transcription inverse consiste à passer de l'ARN en ADNc par l'action d'une ADN polymérase ARN dépendante : la transcriptase inverse.

Le kit utilisé pour la RT est le kit PrimeScript RT Reagent (RR037A, Takara, Kusatsu, Japan) et le thermocycleur Labcycler (SensoQuest). La réaction a été réalisée avec un mélange d'H_2O « RNase free » avec 500 ng d'ARN et les réactifs du kit RT, pour un volume final de 10 µL.
Les réactifs du kit sont les suivants :

- Buffer : 2 µL
- OligodT : 0,5 µL
- Rd primers : 0,5 µL
- Enzymes (à mettre en dernier) : 0,5 µL

3,5 µL du mix est ajouté à l'ARN pour pouvoir effectuer la transcription inverse.
Lorsque les dilutions sont prêtes, celle-ci sont mises dans le thermocycleur qui va effectuer des variations de températures (15 minutes à 37°C, 5 secondes à 85°C et 4°C pour refroidir les échantillons).

3. Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de qPCR a été réalisée grâce à l'action d'une ADN polymérase (Taq polymérase), elle a été suivie en temps réel grâce à la fluorescence émise par le SybGreen (TB Green Premix Ex Taq, Takara, Kusatsu, Japan), un intercalant du double brin d'ADN contenant la Taq polymérase, les nucléotides et le Mg^{2+}.
Un mix a été utilisé pour réaliser la qPCR avec un volume de :

- SybGreen : 5 µL
- Amorce forward : 0,5 µL
- Amorce reverse : 0,5 µL
- H_2O : 3 µL

Les amorces utilisées sont dans le tableau 3.
Le mix est ensuite directement injecté dans la plaque de qPCR à 96 puits : 9 µL de mix et 1 µL d'ADNc.
La quantification des gènes se base sur le nombre de cycles nécessaire pour franchir le niveau de bruit de fond et démarrer la phase exponentielle, pour définir le seuil Ct. Pour chaque gène étudié la valeur Ct est normalisée par rapport à un gène de ménage utilisé selon la formule : ΔCt = Ct (gène cible) – Ct (gène de ménage). Le gène de ménage utilisé est HPRT1 (Hypoxanthin-guanine phosphoribosyltransfèrase 1). Les conditions étudiées sont ensuite

comparées entre elles selon la formule suivante : ΔΔCt = ΔCt (Contrôle) – ΔCt (condition). La variation finale de la quantité de transcrits du gène cible entre le contrôle et la condition étudiée est définie selon la formule suivante : $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Un thermocycleur permettant la détection PCR en temps réel (CFX Connect, Bio Rad) a été utilisé pour réaliser la qPCR selon le protocole suivant : Activation enzymatique à 95°C pendant 30 secondes, 40 cycles d'amplification (dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, Appariement/Elongation/Acquisition à 60°C pendant 10 secondes) et un cycle de refroidissement pour finir.

Tableau V : Amorces utilisées pour quantifier les transcrits des gènes cibles

Primers	Forward	Reverse
HPRT1	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTCAGTCCT
MCU	CGCCAGGAATATGTTTATCCA	CTTGTAATGGGTCTCTCAGTCTGTT
MICU1	GAGGCAGCTCAAGAAGCACT	CAAACACCACATCACACACG
MICU1 Variant	CAATATATAATAAAACGCTTTGATGGAAAGA	GCGAATGATGCTCTGAACCT
MICU2	GGCAGTTTTACAGTCTCCGC	AAGAGGAAGTCTCGTGGTGTC
MCT1	GTGACCATTGTGGAATGCTG	CATGTCATTGAGCCGACCTA
MCT2	GTTGACAGCGAGGCGAAT	CTTGTTTCAGGTTTCACAGGAA
MCT4 Var1,2&5	GGGAAGGTCCAACCTTACACT	CCATCACAAACACATTCACCA
MCT4 Var3,6	GGGAAGGTCCAACCTTACACT	AATAGCAACCAGGGGACCA
SLC2A1	GGTTGTGCCATACTCATGACC	CAGATAGGACATCCAGGGTAGC
SLC2A3	GCCCTGAAAGTCCCAGATTT	TTCATCTCCTGGATGTCTTGG
SLC2A4	CTGTGCCACCTGATGACTG	CGTAGCTCATGGCTGGAACT

HK1	CACCTGTGAGGTTGGACTCA	CCACCATCTCCACGTTCTTC
HK2	TCCCCTGCCACCAGACTA	TGGACTTGAATCCCTTGGTC
GPI	CCCTATGACCAGTACCTGCAC	TTCCCATTGGACTCCATGTC
PFKM	GCCATCAGCCTTTGACAGA	CTCCAAAAGTGCCATCACTG
PFKL	GCTTCGACACCCGTGTAACT	ATGCCCATCTTGCTGCTC
ALDOA	TGCCAGTATGTGACCGAGAA	GCCTTCCAGGTAGATGTGGT
ALDOC	GAACCCGAGCTGTGCTTG	GTACGAGTGAGGCATGGTGA
TPI1	GTTGGGGAAACTGGAAGAT	TAGGGGGAGCACAAACCAC
PGK1	CAGCTGCTGGGTCTGTCAT	GCTGGCTCGGCTTTAACC
PGK2	CCAGCTCCTGGTTCAGTCA	TCCCTTCTTCCTCCACATGA
PGAM1	GGAGGGGAAACGTGTACTGAT	AGCTCCATGATAGCCTCTTCA
ENO1	TCCCAACATCCTGGAGAATAA	ATGCCGATGACCACCTTATC
PKM1	CAGCCAAAGGGGACTATCCT	CCTCAGCCTCACGAGCTATC
PKM2	CAGCCAAAGGGGACTATCCT	CAAATAATTGCAAGTGGTAGATGG
LDHA	GTCCTTGGGGAACATGGAG	TTCAGAGAGACACCAGCAACA
LDHB	GATGGATTTTGGGGGAACAT	AACACCTGCCACATTCACAC
LDHC	GCTCTGAAGACTCTGGACCCTA	TCAGCTTGATAATTTCATAGGCACT
CPT1	CCTCCGTAGCTGACTCGGTA	GGAGTGACCGTGAACTGAAAG
CPT2	TGACCAAAGAAGCAGCAATG	GAGCTCAGGCAAGATGATCC
MFN2	TGAGAGGCATCAGTGAGGTG	GCAGAACTTTGTCCCAGAGC
OPA1	AATCGGACCCAAGAACAGTG	ACTCCTCGGGATTCAAGGTT

FIS1	GGAGGACCTGCTGAAGTTTG	ACGATGCCTTTACGGATGTC
DRP1	GGAACAGCGAGATTGTGAGG	CCTTTGGCACACTGTCTTGA
PFKFB1	ACATGGAAGCCCTGCAAAT	GGCTGAGATAGTTGTGAACATCC
PFKFB2	ATCTCTCGGGGTGCCCTAT	TGCATAGGTCATCTCTTCACACA
PFKFB3	CAACAGCTTTGAGGAGCATGT	GGGAGCCTTTCATGTTTTGT
PFKFB4	CCAGATGAAGAGGACAATCCA	TCCTCGTAGGTCATTTCCTCA
PDK1	CACCAAGACCTCGTGTTGAG	ACGTGATATGGGCAATCCAT
PDK2	CTGGCCAACATCATGAAAGA	CCAGGAGGCTCTGGACATAC
PDK3	TGTGTGAACAGTATTACCTGGTAGC	GTTTGTCTGGCGCTTTGG
PDK4	CAGTGCAATTGGTTAAAAGCTG	GGTCATCTGGGCTTTTCTCA
PDP1 var 1	ATGTTGTCGGCTCCGTGT	TGGAACTTCTGACTGGGATTC
PDP1 var 5	TCGGGAAGAATCGTTTGGT	AAAAACAGTTGAGTTGGTGCTG
PDP2	CTGAGCCTGAGGTCACATACC	AGGCCAGCACAAGGAACTTA
PDPR	GTGGCCTATCACCTCTCCAA	GCCAGCACAGAACCTGGTAG
GCKR	AGATGATATTCGGGCTGCTC	GGCGATGGGTATCACCTGT
DLAT	GGGTGAGAAGCTAAGTGAAGGA	CAGGGACCAGGATTTTTGC
DLD	CCCAGAGGTAGAATTCCAGTCA	GAGCCAGCATTGGACCAG
PDHA1	GTCCGAGAGGCAACAAGGT	AAGTCTGCAGCTCCATCAGG
PDHB	CGGATAGAGGACACGACCA	GTCCAGTGAAAGCGCCTCT
DERA	CTGCGGGCCATTAGAGATT	AGAGAGCCAAGCAAGGGAAT
G6PD	GCAAACAGAGTGAGCCCTTC	GGCCAGCCACATAGGAGTT

H6PD	GGGTGGAGATCATCATGAAAG	GCGAATGACACCGTACTCCT
PGD	ATTGCTGCAAAAGTGGGAAC	GTTGTGCACCATCTTCACGA
PGLS	GCTGAGGACTACGCCAAGAA	AGGATCAGCAGGTCGAAAAC
PGM1	GATGGACGCGAGCAAACT	GACAGCCCACAGTCCATCTT
PRPS1	GCATTGCTCCAAAATACAGGT	AAGGGACATGGCTGAATAGG
PRPS2	ACACTTGCGGCACCATCT	TCCCATGGGTAAGGATAGCA
RBKS	CTACAGGAACTGCTTCTATAATTGTCA	TCAGATCCTCCGTATTCAAAAGT
RPE	CGATGGTGGAGTAGGTCCTG	AGCACTGCCAGACACAATCA
RPIA	TCATCGTGATCGCTGATTTC	GATGACCTCGATGGGGATT
TALDO1	CAGATGCCCGCTTACCAG	TTTAATCTGGTCCTCTTGTGACC
TKT	GGATGACCAGGTGACCGTTA	CGCGGATGTTGATCTTTTCT
UCP2 Blast 1	AAGGGGATCGGGCCATGATA	GAGCTGGGTTGCAGGATGTT
UCP2 Blast 2	CAAAGCCGGCTGGGTCTTAT	ACTGAGAAGGCTCAGGCAAA
UCP3 long	AGCCCCCTCGACTGTATGAT	ACTTTCATCAGGGCCCGTTT
UCP3 Short	AGCCCCCTCGACTGTATGAT	AGGAGGCTCACCCCTTGTAG
PRMT1 Cell	CCAGTGGAGAAGGTGGACAT	GTCATTCCGCTTCACTTGCA
PRMT1 Blast	CGCGAACTGCATCATGGAGAA	CTGGCCACAGGACACTTCTT
PLIN 2	CCTCCTGTCCAACATCCAAG	GCATTGCGGAACACTGAGTA
PLIN 3	CCACCAATGTGAAGGACCA	GAAGGAGTGGATGCTGGAAA
PLIN 4	AATGAGCAACTTCGGAGCAC	CACCGTGTGACTTTGGACAG
PLIN 5	CCACAAGCTGGGTTCTTCAC	TGATCCACCTGCCTCAGACT

HIF1α	TCACCACAGGACAGTACAGGATGC	CCAGCAAAGTTAAAGCATCAGGTTC
MTFA	TTCCGAGTGGTTGGGACTAC	CCTGGGCAACATAGCAAGAT
PGC1α	CCTGTGGATGAAGACGGATT	CAGGCATGGAGGAAGGACTA
MIRO 1	GGGAGGAACCTCTTCTGGA	ATGAAGAAAGACGTGCGGAT
MIRO 2	TGGAGCTGACTGCGGACTAT	TCTGACCAAACTGGTAGCCAA

VII. Etude de l'expression protéique par Western Blot

L'étude de l'expression des protéines a été réalisée par la technique de Western Blot, qui permet la détection et la quantification des protéines.

1. Préparation du lysat cellulaire

Les cellules ont été ensemencées sur une plaque 6 puits, à une densité de 200 000 cellules / puits, après 48 heures les cellules ont été rincées puis décollées mécaniquement et lysées à l'aide d'un tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases. Le lysat cellulaire a ensuite été dosé à l'aide d'un kit BCA protein (Reference: 23227, Thermo Fisher Scientific, France) afin d'utiliser 50 ng de protéines pour chaque échantillon. Avant la séparation sur gel de polyacrylamide, les échantillons ont été dilués avec du tampon de lyse et tampon de charge (Invitrogen, 4X, LDS (4X) NuPAGE). L'échantillon est ensuite chauffé à 75°C pendant 10 minutes afin de dénaturer les interactions protéiques.

2. Séparation du lysat protéique sur gel de polyacrylamide

Le lysat protéique a été séparé sur un gel préfabriqué (4 %–15 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, Bio-Rad, California, USA). Les gels Stain Free permettent une détection rapide des protéines sans témoins de charge. Le gel de séparation utilisé est composé d'un gradient 4 % à 15 % de polyacrylamide. 20 µL de chaque échantillon et 6 µl de marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards : 1610373, Bio Rad) ont été déposés dans les puits. La migration a été réalisée à 150 volts pendant 45

minutes après ajout du tampon de migration (10x premixed eletrophoresis buffer : 1610771EDU, Bio Rad, rajouter 0,1 % de SDS pour 10X de solution).

3. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Après la migration des protéines sur le gel de polyacrylamide, une image du gel est réalisée à l'aide de l'imageur (Bio-Rad) en UV pendant 45 secondes pour activer la membrane. Ensuite les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (Trans-blot Turbo Mini 0,2 µm Nitrocellulose Transfer Packs : 1704158, Bio-Rad). Le transfert est réalisé avec un Trans-Blot Transfer System pendant 7 minutes à 1,3 A constant. Après le transfert des protéines, une autre image est prise, pour s'assurer de la présence des protéines et servira également à normaliser les résultats.

4. Marquage et révélation des protéines

La membrane a été incubée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation dans une solution de TBST (*cf* tableau VII) contenant 5 % de lait demi-écrémé en poudre, permettant une saturation de la membrane pour éviter une fixation non spécifique des anticorps. Ensuite, la membrane a été incubée la nuit à 4°C, sous agitation avec l'anticorps primaire (*cf* tableau VIII). Ces anticorps sont dilués avec une solution de TBST avec 5% de lait demi-écrémé en poudre. Le lendemain, après rinçages, la membrane est incubée 1 heure avec l'anticorps secondaire à température ambiante, sous agitation.

La membrane a ensuite été lavée avec du TBST pour éliminer toutes traces d'anticorps non fixés puis incubée quelques secondes, à l'obscurité, dans les réactifs du kit de chimioluminescence (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad) et détectée à l'aide de l'imageur Bio Rad. L'expression des protéines d'intérêt a été quantifiée avec le logiciel Image-Lab (Bio Rad) et normalisé par rapport à la membrane Stain Free réalisée après le transfert.

Tableau VI : Composition du TBST (10X)

Réactifs utilisés	Concentration
NaCl	150 mM
Tris HCl	20 mM
Tween 20	0,1 %
pH : 7,4	

Tableau VII : Anticorps utilisés

Anticorps primaire	Référence	Fournisseur	Poids moléculaire	Dilution
DRP1	5391	Cell Signaling	78-82 kDa	1/1000
MCU	HPA016480	Sigma-Aldrich	30 kDa	1/1000
MFN2	11925	Cell Signaling	80 kDa	1/1000
MICU1	HPA037479	Sigma-Aldrich		1/1000
MICU2	Ab101465	Abcam		1/1000
OPA1	612607	BD Biosciences	80-100 kDa	1/1000
PDRP1	3455	Cell Signaling	78-82 kDa	1/1000

Anticorps secondaire	Référence	Fournisseur	Dilution
m-IgG Fc BP-HRP	Sc-525409		1/5000
Ms x Rb Light Chain specific HRP	MAB201P		1/2000

VIII. Modèle de xénogreffe de tumeur CRC sous-cutanée

Les xénogreffes de CCR ont été établies en injectant 5 millions de cellules par souris Swiss nude (n=10 par lignée cellulaire). Toutes les souris ont été évaluées chaque semaine en utilisant l'imagerie par bioluminescence du corps entier et l'imagerie photoacoustique. L'autorisation, Apafis 19933, a été donnée par le comité régional d'éthique CEEA - 003 (Campus CNRS, Orléans) et le ministère français de l'Enseignement supérieur, de la Recherche

et de l'Innovation (MESRI). Ce protocole a été réalisé par nos collaborateurs du Phenomin-TAAM CNRS UPS44 selon leurs protocoles validés (raes et al, 2020).

IX. Etudes bio-informatiques

1. Analyse transcriptomique

Les analyses transcriptomiques et les cartes thermiques ont été générées à l'aide du logiciel R. Les données RNA-Seq du cancer du côlon et du côlon normal ont été générées par le réseau de recherche « The Cancer Genome Atlas » (http://cancergenome.nih.gov/). Les nombres de lectures et les annotations cliniques ont été téléchargés à partir du GDC à l'aide du logiciel *tcgaworkflow*. Les nombres de lectures ont ensuite été filtrés, normalisés, traités et transformés logarithmiquement à l'aide du logiciel *edgeR*. Des heatmap ont été générées à l'aide du logiciel *ComplexHeatmap*. L'analyse de l'expression différentielle a été effectuée sur les comptes de lecture à l'aide du logiciel *edgeR*. L'analyse de l'expression différentielle a été obtenue en comparant des groupes définis en fonction de l'expression de MICU2, MICU1 ou du rapport MICU2/MICU1. L'analyse de l'enrichissement des ensembles de gènes a été réalisée sur les listes de gènes classées selon le log2 (Fold Change) obtenues par DEA à l'aide du logiciel *fgsea* et des collections d'ensembles de gènes de la MSigDB (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb-c5.go.bp.v7.5.1.symbols.gmt).

Les données transcriptomiques publiées sur le cancer colorectal normal, primaire et métastatique ont été générées par des puces à ADN (GSE41258). Les données brutes ont été téléchargées et prétraitées par RMA à l'aide du logiciel *affy*.

X. Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ou à l'aide du logiciel R. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± erreur standard de la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des tests de Mann-Whitney par paires, de Kruskal-Wallis ou à l'aide d'analyse de la variance (ANOVA) suivie des tests de comparaisons multiples de Dunnett, Dunn ou Sidak. Les tests exacts sont indiqués dans les légendes des figures. Une valeur $p<0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats

I. Article : Encodage du programme métabolique dans le cancer colorectal par MICU2

1. Introduction

Les mitochondries jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en régulant la concentration intracellulaire de Ca^{2+}. Le Ca^{2+} pénètre dans la matrice mitochondriale à travers l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCU), un canal Ca^{2+} hautement sélectif. L'uniporteur MCU forme un grand complexe multimoléculaire composé de différentes protéines : MICU1, MICU2, MICU3, EMRE et d'autres protéines. La contribution dans la cancérogenèse des protéines régulant l'absorption de Ca^{2+} par les mitochondries, telles que les MICUs est encore très mal comprise.

Le rôle de MICU2 dans la régulation de l'activité de MCU dépend de sa liaison au Ca^{2+} qui est médié par sa liaison à MICU1 par son homologie en partageant 42% d'identité d'acide aminé. En conséquence, l'expression de MICU2 dépend principalement de MICU1, mais la réciprocité n'a pas été prouvée. Jusqu'à aujourd'hui, la contribution de MICU2 à la régulation de la signalisation du Ca^{2+} mitochondrial, à la bioénergétique, à la reprogrammation métabolique, à la dynamique mitochondriale et au développement du cancer colorectal n'a pas été étudiée.

Dans ces travaux nous nous sommes intéressés au rôle principal de la protéine régulatrice d'absorption du Ca^{2+} MICU2 dans la prolifération et la migration des cellules cancéreuses colorectales, dans le réseau mitochondrial ainsi que dans le métabolisme mitochondrial.

2. Conclusion

MICU2 régule significativement la prolifération et la migration du CCR *in vitro* et *in vivo*. Il augmente la quantité de Ca^{2+} mitochondrial. En outre, il permet le bon fonctionnement de la chaine respiratoire en favorisant la phosphorylation oxydative au détriment de la glycolyse. MICU2 favorise l'utilisation du pyruvate mitochondrial et de la β-Oxydation des acides gras dans le processus de prolifération cellulaire.

Nous montrons pour la première fois le rôle de la protéine régulatrice MICU2 dans le cancer, et plus précisément dans le CCR. A plus long terme, les avancées des connaissances sur la signalisation calcique mitochondriale dans le CCR pourraient permettre d'offrir de nouvelles perspectives aux patients en termes de biomarqueurs ou de nouveaux choix thérapeutiques

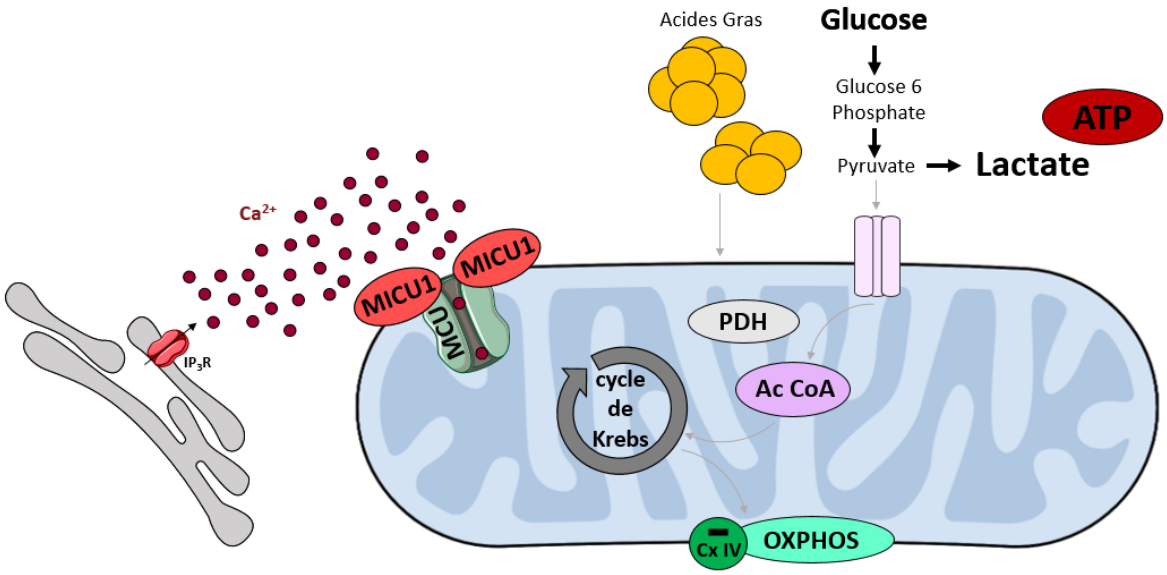


Figure 28 : Schéma de conclusion du rôle du modèle KO pour MICU2

3. Article

Encoding of the colorectal cancer metabolic program through MICU2

Alison Robert[1,*], David Crottès[1,*], Jérôme Bourgeais[2], Naig Gueguen[3], Arnaud Chevrollier[3], Jean-François Dumas[1], Stéphane Servais[1], Isabelle Domingo[1], Stéphanie Chadet[1], Julien Sobilo[4], Olivier Hérault[2], Thierry Lecomte[1], Christophe Vandier[1], William Raoul[1,#], Maxime Guéguinou[1,#,$]

1. Inserm U1069 N2C Nutrition, Croissance et Cancer ; 2. CNRS EMR7001 LNOx ; 3. MitoLab, CNRS UMR 6015, Inserm U1083 MITOVASC ; 4. PHENOMIN-TAAM-CNRS UPS44

* These authors equally contributed, # These authors jointly supervised this work, $ Corresponding Author

Summary

The mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) plays crucial role in intramitochondrial Ca^{2+} uptake, allowing Ca^{2+}-dependent activation of oxidative metabolism. In recent decades, the role of MCU pore-forming proteins has been highlighted in cancer. However, the contribution of MCU-associated regulatory proteins mitochondrial calcium uptake 1 and 2 (MICU1 and MICU2) to pathophysiological conditions has been poorly investigated. Here, we describe the role of MICU2 in cell proliferation and migration using *in vitro* and *in vivo* models of colorectal cancer (CRC). Transcriptomic analysis demonstrated an increase in MICU2 expression and the MICU2/MICU1 ratio in advanced CRC and CRC-derived metastases. We report that expression of MICU2 is necessary for mitochondrial Ca^{2+} uptake and quality of the mitochondrial network. Our data reveal the interplay between MICU2 and MICU1 in the metabolic flexibility between anaerobic glycolysis and OXPHOS. Overall, our study sheds light on the potential role of the MICUs in diseases associated with metabolic reprogramming.

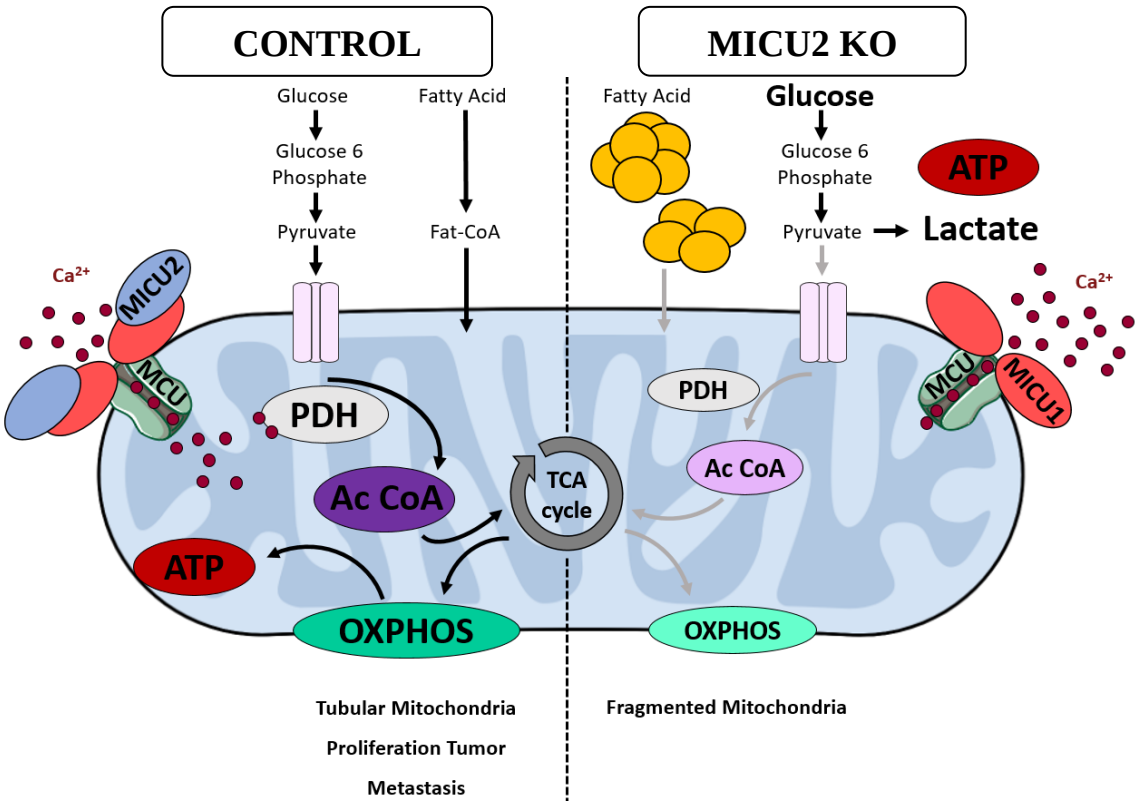
Keywords

mitochondria, calcium signaling, mitochondrial calcium uniporter, MICU, metabolic reprogramming, oxidative phosphorylation (OXPHOS), cancer

Highlights

- MICU2 plays a pivotal role in the balance between anaerobic glycolysis and oxidative phosphorylation
- MICU2 stabilizes the mitochondrial network and endoplasmic reticulum–mitochondrial calcium flux
- MICU2 expression and the MICU2/MICU1 ratio control proliferation and metastasis formation in colorectal cancer

Graphical Abstract



Introduction

Intracellular calcium (Ca^{2+}), which is a ubiquitous second messenger, regulates a multitude and various cellular processes. Deregulation of Ca^{2+} homeostasis and Ca^{2+} dependent signaling pathways have been described to be associated with each of the "cancer hallmarks"[1,2]. Mitochondria are a central player in maintaining cellular Ca^{2+} homeostasis by uptaking Ca^{2+} from cytoplasm.

Fine regulation of Ca^{2+} fluxes in mitochondria is required to support functions linked to metabolism (ATP production), redox homeostasis and proliferation/apoptosis balance. Mounting evidence indicates that metabolic transformation of tumor cell is the main limitation of cancer treatment, which is highly related to the resistance to therapeutic drugs[3]. Due to its role in energetic metabolism by activating pyruvate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, and α-ketoglutarate dehydrogenase, or respiratory complex activity, mitochondrial Ca^{2+} (mitoCa^{2+}) plays a pivotal role in cancer progression[4–7].

To enter in the mitochondrial matrix, Ca^{2+} first passes through the outer membrane of the mitochondrion via the voltage-dependent anion-selective channel (VDAC), then through the inner mitochondrial membrane (IMM) via the mitochondrial calcium uniporter (MCU), a highly selective Ca^{2+} channel. MCU forms a large multi-molecular complex composed of different proteins. This channel, alongside the MCU regulator EMRE, are located in the IMM. Proteins regulating mitoCa^{2+} uptake such as mitochondrial calcium uptake 1 (MICU1), MICU2, and MICU3 reside in the intermembrane space.[8,9] The regulation of MCU activity by MICU1 and MICU2 involves a gating mechanism. MCU gating and the role of MICU subunits in potentiation are dependent on the Ca^{2+} content and the MCU current. Recently, Garg et al.[10] demonstrated that elevation of cytosolic [Ca^{2+}] increases Ca^{2+} binding to the EF hands of MICU subunits. MICUs thereby increase the open probability of MCU, enhancing its activity. However, the contribution of each of these proteins in carcinogenesis is still poorly understood.

Colorectal cancer (CRC) is the third most common malignancy worldwide and one of the deadliest cancers. CRC involves a multi-step process that includes three distinct phases: initiation, progression, and metastasis. Researchers recently showed that MCU expression is increased and associated with poor prognosis in patients with CRC.[11] Upregulation of MCU increases mitoCa^{2+} uptake to promote mitochondrial biogenesis and to facilitate CRC cell growth *in vitro* and *in vivo*.[11]

The role of MICU2 in the regulation of MCU activity depends on its binding to Ca^{2+} and is mediated by its binding to MICU1.[12] MICU2 is a paralog of MICU1—it shares 42% amino acid identity with MICU1—and contains an amino-terminal mitochondrial targeting sequence and a cytosolic C terminus with two EF hands.[13] Interestingly, the expression of MICU2 chiefly depends on MICU1, but the reciprocity has not been proved.[14,15] So far, the contribution of MICU2 to the regulation of mitoCa^{2+} signaling, bioenergetics, metabolic reprogramming, mitochondrial dynamics, and CRC development have not been addressed.

Here, we observed that MICU2 expression and the MICU2/MICU1 ratio in patients with CRC are tightly correlated to CRC aggressiveness and stage. For the first time, we demonstrated that MICU2 regulates proliferation and migration of CRC cells *in vitro* and *in vivo*. We demonstrated the role of MICU2 on mitoCa^{2+} uptake and its contribution as a crucial element of mitochondrial function, regulating fusion-fission processes, ensuring the proper use of pyruvate by mitochondria and oxidation of fatty acid, and allowing the proper functioning of respiratory chain complexes. Overall, we report for the first time that MICU2 is a guardian of mitochondrial respiratory chain function and a pivotal element during the cancer metabolic switch from oxidative metabolism (oxidative phosphorylation [OXPHOS]) to glycolysis. Moreover, our data suggest that the fine regulation of the MICU1–MICU1 and MICU2–MICU1 dimers in association with MCU may shape the major metabolic transformations in cancer.

Results

MICU2 expression is higher in stage IV CRC and metastases

A recent investigation demonstrated that the MCU complex can be linked to overall aggressiveness of CRC.[16] In particular, using The Cancer Genome Atlas Colon Adenocarcinoma (TCGA-COAD) dataset, the authors observed that the expression of MICU1 and MICU2 are respectively down- and upregulated with stages. The stoichiometry of regulatory units of MCU complex, MICU1 and MICU2, have been shown to modulate the uniporter-mediated Ca^{2+} influx.[17]

Here, we focused on investigating the expression of MICU1, MICU2, and the MICU2/MICU1 ratio in colon tumors using the cohort published by TCGA. As described previously, we found that MICU2 expression is significantly upregulated in colon tumors of patients with stage IV CRC. MICU3 is not expressed in the CRC. Interestingly, the MICU2/MICU1 ratio is significantly upregulated in colon tumors of stage IV compared with tumors belonging to less aggressive stages (Figure S1A). In another cohort (GSE41252) encompassing primary tumors but also liver and lung metastatic CRC samples, we observed that the expression of MICU1 is downregulated while both MICU2 expression and the MICU2/MICU1 ratio are significantly upregulated in liver metastasis of CRC (Figure 1B and S1B). In addition, the expression of MCU complex players according to CRC stages was verified on TCGA data. Significantly, MCU, MICU1 and MCUb were negatively expressed while MICU2 was positively expressed (Figure 1B). Thus, the MICU2/MICU1 ratio is positively correlated to the aggressiveness of a CRC tumor, suggesting that the stoichiometry of the regulatory units of MCU complex may be critical for the tumor development.

Using western blotting, we compared the protein expression of MCU, MICU1, and MICU2 in a non-tumor colorectal epithelial cell line, NCM356, and in five CRC cell lines (HT29, DLD1, SW480, HCT116, and SW620) with different mutation and aggressiveness profiles. The tumor cell lines showed significantly higher expression of MCU and MICU1 than the non-tumor cell line. Interestingly, MICU2 expression was significantly higher in the more aggressive tumor cell lines (SW480, HCT116, and SW620) compared with the less aggressive cell lines (HT29 and DLD1) and the non-tumor cell line (NCM356) (Figure 1C). As MICU2 cannot bind to the MCU complex without MICU1, we modified the HCT116 cell line with CRISPR-Cas9 technology to generate two MICU2 knockout (KO) clones (Figures 1D and S1C) to modulate the MICU2/MICU1 ratio. Deletion of MICU2 did not alter the protein expression of MCU and MICU1 (Figure 1D), but MICU1 messenger RNA (mRNA) expression was significantly reduced by 25% in one of the MICU2 KO clones (Figure S1C).

Figure 1. Expression of MICU2 in stage IV CRC and in metastases from patients with CRC

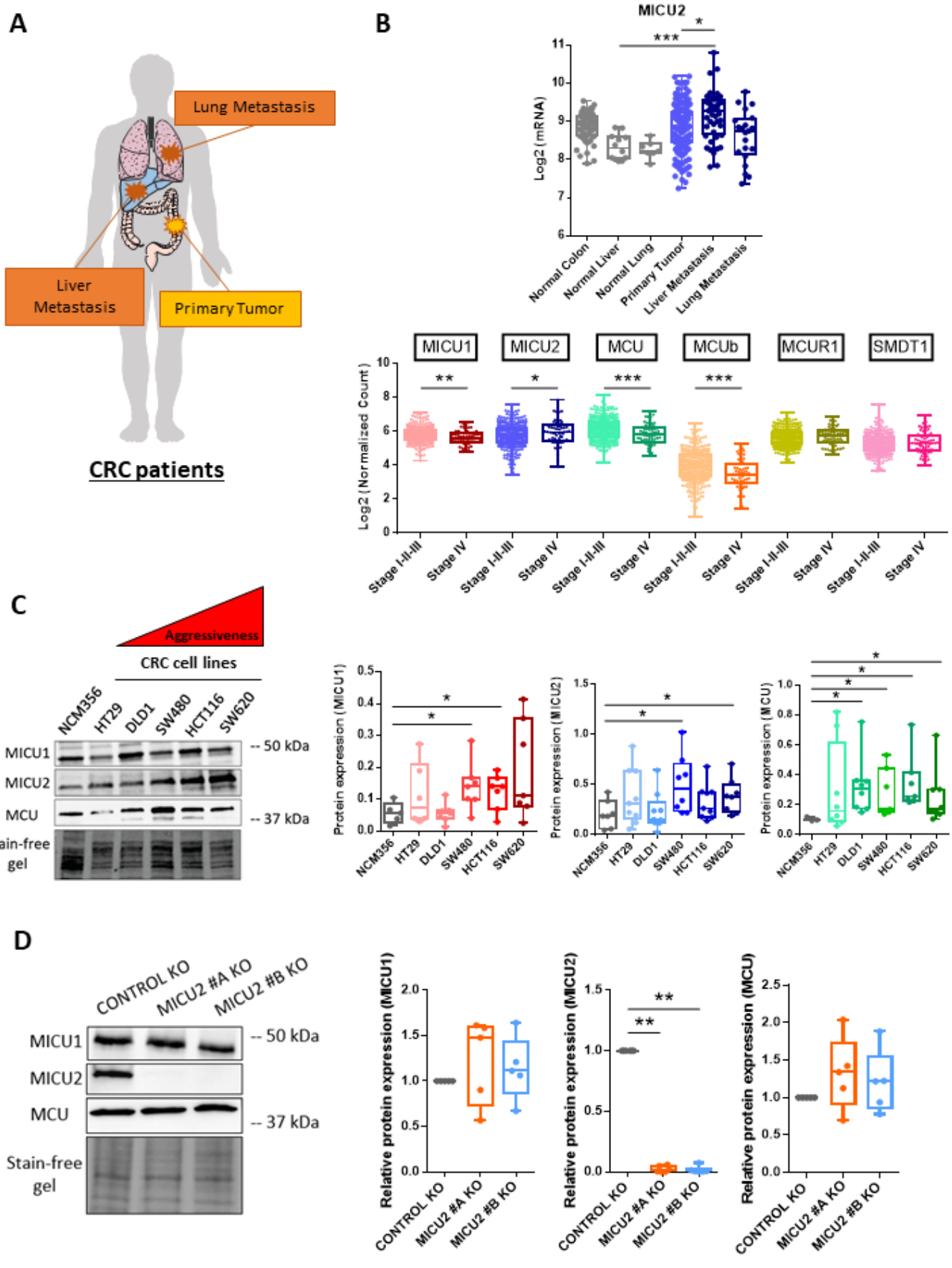


Figure 1. Expression of MICU2 in stage IV CRC and in metastases from patients with CRC
(A) Representative scheme of organs used for the bioinformatics analysis of normal, primary tumor, and metastatic samples. (B) Transcriptomic analysis of MICU2 in the GSE41258 (top panel) datasets and of the expression of the players in the MCU complex in the TCGA (bottom panel). Each data point represents an individual sample (ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (C) Left panel: representative western blot of MCU, MICU1, and MICU2 in a panel of CRC cell lines with variable aggressiveness. Right panel: quantification of the protein expression of MCU, MICU1, MICU2 western blot (n=5–9, Mann–Whitney test). (D) Representative western blot of MCU, MICU1, and MICU2 expression in the HCT116 Control and MICU2 KO cell lines obtained by CRISPER-Cas9 methodology. Quantification of the protein expression of MICU1, MICU2, and MCU in the HCT116 Control KO, MICU2 #A KO, and MICU2 #B KO cell lines (n=6, Kruskal–Wallis test). On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

MICU2 controls CRC cell proliferation *in vitro* and CRC tumor growth *in vivo*

Primary tumors of TCGA-COAD were classified as “High” or “Low” for MICU1, MICU2 and the ratio of MICU2/MICU1 if the value of their expression/ratio are respectively superior to the 95th percentile or inferior to the 5th percentile of the expression/ratio in normal samples (Figure S1D). Using this classification of tumors samples, we then performed a differential expression analysis (DEA) followed by a gene set enrichment analysis (GSEA) to identify genes and pathways that are differentially modulated based on the status of MICU2 or the MICU2/MICU1 ratio (Figure 2A and S2A). Interestingly, we observed that cell cycle–related gene sets are frequently enriched in tumor samples with high MICU2 expression and tend to be less represented in tumor samples with a low MICU2 expression (Figures 2B and S2B).

Cell cycle analysis by flow cytometry demonstrated an increase in the percentage of cells in the G1 phase associated with a decrease in proliferation of the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (Figures 2C and 2D). The HCT116 control and MICU2 KO cell lines were engineered to endogenously express luciferase and injected subcutaneously into NOD-SCID mice. There was a significant reduction in total bioluminescence in mice injected with HCT116 MICU2 KO cells compared with mice injected with the control HCT116 cells (Figure 2E). To confirm the role of MICU2 in CRC tumor growth, we performed Ki67 staining on tumor sections. We noted a significant reduction in cell proliferation for MICU2 #A KO tumors but not for MICU2 #B KO tumors (Figure 2F). This outcome could be potentially explained by the delay we observed for the tumor engraftment of MICU2 #B KO cells. Hence, at the end of our experiment, these tumors were still in the exponential growth phase.

To further investigate the role of MICU2 in cancer, we investigated its role in the response to CRC chemotherapy treatment. We evaluated the dose-response of oxaliplatin and 5-fluorouracil (5FU) in the Control and MICU2 KO cell lines. Both cell lines showed a concentration-dependent reduction in cell viability, but without a significant difference in the sensitivity to these chemotherapeutic agents (Figure S2C). Based on the effect of MCU that has been described in cancer cells, we evaluated the role of MICU2 in cell motility (wound healing and spheroid migration assays). We noted decreased cell migration in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (Figures S2D and S2E).

Taken together, these results demonstrate that MICU2 expression is associated with several cancer cell properties. In particular, MICU2 is critical for cancer cell proliferation and the cell cycle. MICU2 KO can also reduce the migration of CRC cells.

Figure 2. Involvement of MICU2 in the CRC tumor phenotype

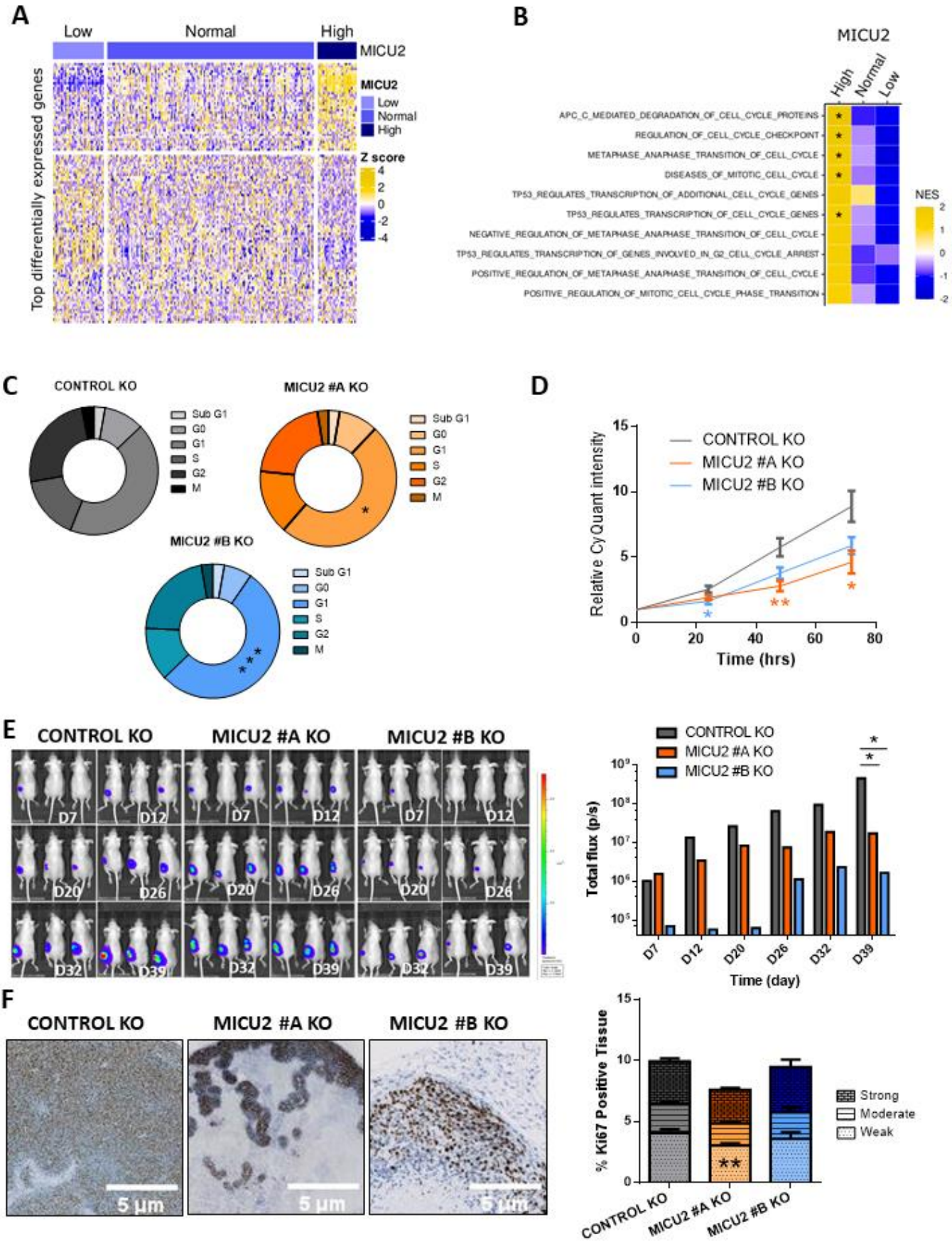


Figure 2. Involvement of MICU2 in the CRC tumor phenotype

(A) Heatmap of the most differentially expressed genes between colon tumor samples in the TCGA-COAD dataset with low, normal, or high expression of MICU2. B) Heatmap of normalized enrichment scores of the top 10 cell cycle–associated gene signatures obtained by GSEA for primary colon tumor samples with low, normal, or high expression of MICU2. (C) Graphical representation of the cell cycle in the Control and MICU2 KO cells lines (n=6, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). (D) CyQuant proliferation analysis of the Control and MICU2 KO cells lines (n=11, Kruskal–Wallis test). (E) Representative bioluminescence images of cancer progression and metastasis in mice injected with the luciferase-expressing Control or MICU2 KO cells lines and quantification of whole-body bioluminescence (n=10, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). (F) Representative images of tumoral tissue sections stained for Ki67 from xenografted Control and MICU2 KO cells lines and quantification of the percentage of tissue positive for Ki67. The intensity of positivity was scored as weak, moderate, or strong. The scale bar is 5µm (n=6, ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test). On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

MICU2 protects CRC cells against fragmentation and controls mitoCa^{2+} uptake

Mitochondria share different contact sites with the endoplasmic reticulum (ER) and the plasma membrane.[18,19] During the movement of Ca^{2+} from the extracellular or intracellular compartments, the mitoCa^{2+} uptake machinery shapes the cellular response. The mutual interplay between Ca^{2+} homeostasis and mitochondrial morphology appears to be an essential element in mitochondrial dynamics and Ca^{2+} signalling.[20]

To understand the impact of MICU2 KO on the mitochondrial morphology and network, we first evaluated the number of mitochondria and the amount of mitochondrial DNA in the Control and MICU2 KO cell lines. There were no differences in these two parameters between the cell lines (Figure 3A and 3B). We then assessed the network and size of the mitochondria using confocal imaging. Interestingly, MICU2 KO cell lines have a significant reduced number of mitochondria with an area >20 µM3 compared to the Control KO cell line. This suggest that there is a decrease in the mitochondrial connection network and therefore greater fragmentation (Figure 3C). To confirm this hypothesis we analysed proteins linked to mitochondrial dynamics, namely the expression of OPA1 and MFN2, which are involved in fusion, and the expression of DRP1 and its active phosphorylated form (P-DRP1 Ser616), which is involved in fission.21 -There was no difference in the expression of OPA1 or MFN2, but the P-DRP1/DRP ratio was increased in MICU2 KO cell lines, indicating increased mitochondrial fission, consistent with fragmentation of the mitochondrial network (Figure 3D). The mRNA expression of fission (DRP1 and FIS1) and fusion (OPA1 and MFN2) genes was not significantly altered in MICU2 KO cell lines compared to the Control KO cell line (Figure S3A).

MICU2 modulates mitoCa^{2+} uptake. Thus, we examined the consequences of the genetic deletion of MICU2 on mitochondrial, cytosolic, and ER Ca^{2+} signaling. Stimulation of a G protein–coupled receptor (GPCR) such as the lysophosphatidic acid (LPA) receptor by LPA induces inositol trisphosphate (IP_3) production. IP_3 then activate IP_3 receptors leading to a Ca^{2+} release from ER and induce mitochondria Ca^{2+} influx through the uniporter MCU (Figure 3E).

We assessed mitoCa^{2+} homeostasis by using a genetically encoded Ca^{2+} indicator targeting the mitochondrial compartment (mt-riG6m). Stimulation of cells with LPA induced a transient increase in mitoCa^{2+} that was significantly reduced in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (Figure 3F). We then wondered whether this reduction in mitoCa^{2+} influx might affect cytosolic Ca^{2+} homeostasis. Stimulation of transitory ER Ca^{2+} release by LPA activates store-operated calcium entry (SOCE).[21] MICU2 KO had no effect on SOCE induced by LPA (Figure S3B). Interestingly, thapsigargin (TG)-mediated release of ER Ca^{2+} stores were increased in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line without modifying SOCE (Figures 3G and S3C). We then assessed whether this change is due to higher Ca^{2+} content in ER stores. Using the genetically encoded Ca^{2+} indicator targeting ER (miGer), we observed a small but significant increase in the speed of the TG-induced ER Ca^{2+} release in the MICU2 KO #B cell line (Figure 3H). Using an intracellular Ca^{2+} chelator (BAPTA-AM), we

assessed the viability of the Control KO and MICU2 KO cell lines. Treatment of the cells with BAPTA-AM resulted in a significant decrease in the viability of the Control KO and MICU2 KO cell lines (Figure S3D). Altogether, these results suggest that genetic deletion of MICU2 impairs mitoCa^{2+} homeostasis and the ability of mitochondria to buffer variations in cytosolic [Ca^{2+}].

Crosstalk between Ca^{2+} and reactive oxygen species (ROS) is found in many pathologies including cancers.[22] Hence, we measured ROS production in HCT116 Control and MICU2 KO clones. We analyzed the levels of total superoxide ions (DHE) and mitochondrial superoxide (MitoSox) and the amount of hydrogen peroxide (DCFDA). We observed no difference between the Control and MICU2 KO cell lines (Figure S3E). In addition, there was no difference in the viability of the Control and MICU2 KO cell lines treated with a mitochondria-targeted antioxidant (MITOTEMPO) (Figure S3F). This outcome confirms that genetic deletion of MICU2 does not affect ROS production.

Taken together, these results reveal that MICU2 is necessary for the stability and the quality of mitochondrial network while allowing the proper management of ER-mitochondria Ca^{2+} flux.

Figure 3. The role of MICU2 in the mitochondrial network and Ca^{2+} signaling

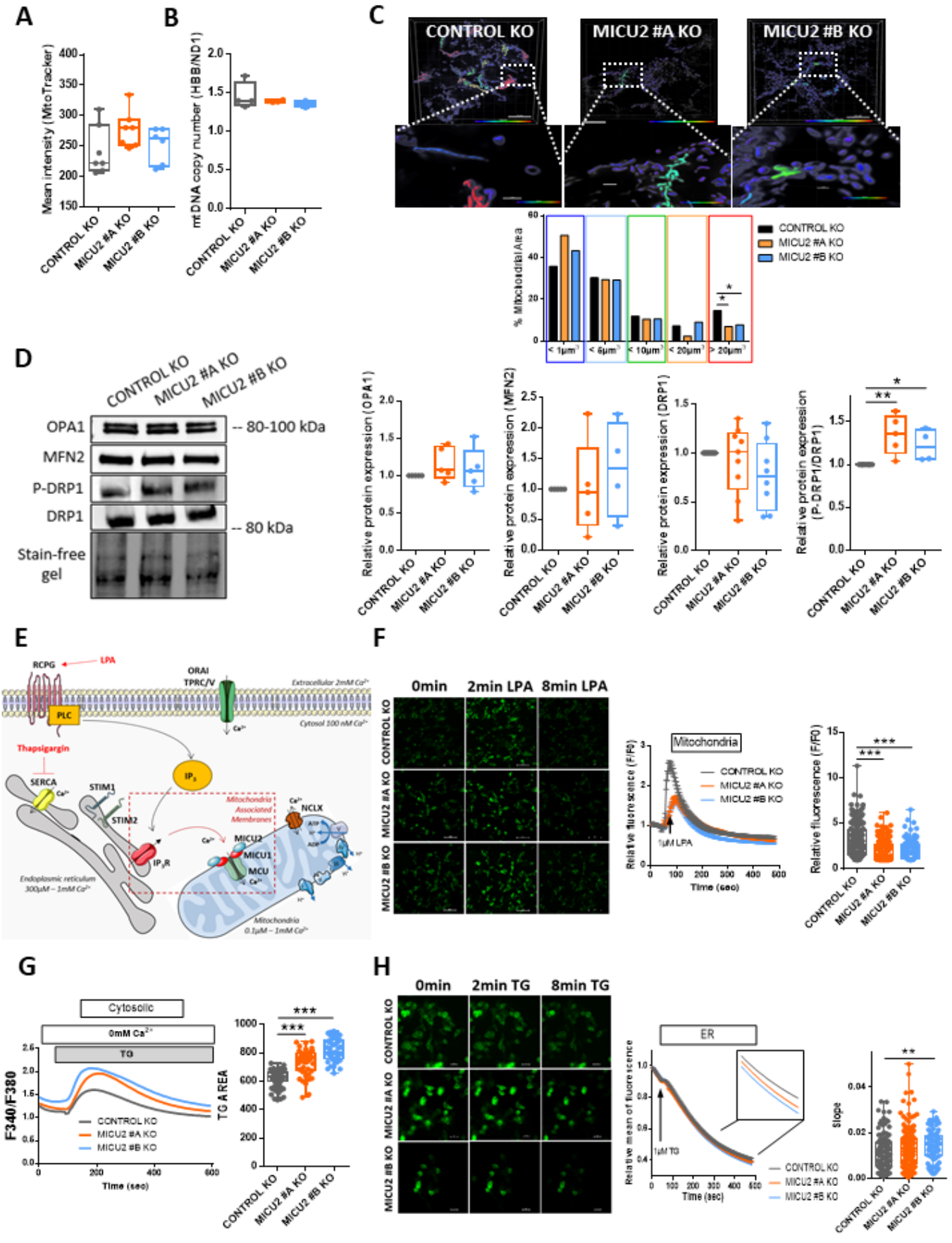


Figure 3. The role of MICU2 in the mitochondrial network and Ca^{2+} signaling

(A) Quantification of the number of mitochondria in the Control and MICU2 KO cell lines with Mitotracker green. (B) Quantification of mitochondrial DNA copy number by RT-qPCR using primers HBB and ND1. (C) Top panel: representative 3D images of the mitochondrial network of the HCT116 Control and MICU2 KO cell lines colored based on the mitochondrial volume. The enlargement shows an example of mitochondria with different shapes. The scale bar is 10 µm. Bottom panel: bar graphs representing the distribution of the mitochondrial population based on the mitochondrial volume. Anova followed by Dunnett's multiple comparisons test. (D) Left panel: representative western blot of mitochondrial fusion (OPA1 and MFN2) and fission (DRP1 and P-DRP1) proteins in the Control and MICU2 KO cell lines. Right panel: relative protein expression of mitochondrial fusion and fission proteins (n=4–5, ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (E) Schematic illustration of LPA-induced or TG-induced cytosolic Ca^{2+} and mitoCa^{2+} signaling in non-excitable cells. (F) Left panel: representative images of the Control and MICU2 KO cell lines transfected with the genetically encoded mitoCa^{2+} indicator mt-riG6m and stimulated with LPA. The scale bar is 100 µm. Right panel: relative Ca^{2+} responses induced by LPA in Control and MICU2 KO cell lines expressing the mitoCa^{2+} probe mt-riG6m (the data are presented as the mean ± SEM of 8 independent experiments regrouping 354–594 cells, Kruskal–Wallis test). (G) Left panel: representative SOCE traces in the Control and MICU2 KO cell lines. Right panel: boxplot representing the ER-Ca^{2+} store depletion by TG in the absence of extracellular Ca^{2+} (n=6, N=42–95, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). (H) Left panel: representative images of the Control and MICU2 KO cell lines transfected with the genetically encoded ER Ca^{2+} indicator miGer and stimulated with TG. The scale bar is 20 µm. Right panel: relative ER Ca^{2+} content. The boxplot represents the slope of TG-induced ER Ca^{2+} release (n=6–8, N=88–156, Mann–Whitney test). On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Deletion of MICU2 reduces respiratory complex expression and activity associated with loss of respiratory chain sensitivity to Ca^{2+}

MitoCa^{2+} plays critical signaling roles in regulating ATP production linked to oxygen consumption by mitochondria. We hypothesized that the deletion of MICU2 alters the functioning of the respiratory chain.

First, we tested this hypothesis by analyzing in TCGA-COAD dataset based on the expression of MICU1, MICU2, and the MICU2/MICU1 ratio. The mRNA expression of genes belonging to the mitochondrial respiratory chain complexes are not modified by the expression of MICU1, MICU2, or the MICU2/MICU1 ratio (Figure S4A). However, we observed that TCGA-COAD tumor samples with a "high" MICU1 status show higher expression of genes associated with the assembly of complexes I and IV of the mitochondrial respiratory chain compared with tumor samples with a "low" MICU1 status (Figure 4B and S4B). In contrast, we observed that TCGA-COAD tumor samples with a "high" status of MICU2 and the MICU2/MICU1 ratio present higher expression of genes associated with the assembly of complexes of the mitochondrial respiratory chain compared with tumor samples with a "low" status for MICU2 and the MICU2/MICU1 ratio (Figure 4B and S4B), suggesting that the expression of MICU2 may contribute to the assembly complexes or supercomplexes. To validate this finding, we analyzed their expression and assembly into supercomplexes by Blue-Native PAGE. We observed a reduction in assembly of the I_1III_2IV supercomplex related to a significant reduction in the quantity of complex IV (Figure 4C). Consistently, the maximal activity of complex IV (cytochrome *c* oxidase) in the MICU2 KO cell lines was decreased compared with the Control KO cell line (Figure 4D). Mitochondria is the main organelle supporting energy supply of cells.[23] The reduced expression of the terminal enzyme of the respiratory chain, complex IV, in MICU2 KO cells could limit the mitochondrial oxidative capacity. Inhibition of complex I and ATP synthase with rotenone and oligomycin, respectively, had a more pronounced effect on the viability of the Control KO cell line than the MICU2 KO cell lines (Figure 4E), suggesting that the MICU2 KO cell line is less dependent on oxidative phosphorylation (OXPHOS). In parallel, we verified that oligomycin and rotenone treatment did not significantly modify the mRNA expression of MICU1, MICU2, or MCU (Figure S4C).

Variation in the mitoCa^{2+} concentration can have a dual role on OXPHOS activity. First, it can directly modify the activity of respiratory complexes. Second, Ca^{2+} can activate the tricarboxylic acid (TCA) cycle by affecting isocitrate dehydrogenase and α-ketoglutarate dehydrogenase, thus increasing OXPHOS. Using permeabilized cells, we evaluated the consequences of different cytosolic [Ca^{2+}]—0, 150nM, 1µM, and 8.4µM—on OXPHOS stimulated by succinate, to avoid the consequence of Ca^{2+} variation on the activity of TCA cycle and focus only on the role of Ca^{2+} on the respiratory chain.[24] We were particularly interested in state III of mitochondrial respiration stimulated by adenosine diphosphate (ADP) and state IV which is the inhibition of ATP synthase mainly controlled by proton leakage in the presence of substrate, so we defined the respiratory chain ratio (RCR) as an indicator of proper functioning of the respiratory chain.[25]

Globally, no significant effect of either the variation of the cytosolic [Ca^{2+}] or the deletion of MICU2 is observed on both state III or state IV. However, the optimal function of the respiratory control ratio (RCR) is observed at physiological cytosolic [Ca^{2+}] (150nM). At this concentration, the deletion of MICU2 significantly impairs the RCR. In absence of cytosolic [Ca^{2+}] or at supra-physiological cytosolic [Ca^{2+}], we observe a reduced RCR and no significant effect of the deletion of MICU2 on the RCR. MICU2 optimises mitochondrial respiration under physiological [Ca^{2+}].

Overall, we demonstrated that MICU2, unlike MICU1, controls the complex biogenesis and activity of the respiratory chain and its presence optimizes oxygen consumption linked to mitochondrial ATP production in an environment with a physiological cytosolic [Ca^{2+}]. We therefore took a closer look at metabolic rewiring and the substrate supply pathways regulated by calcium.

Figure 4. Contribution of MICU2 to respiratory chain complexes

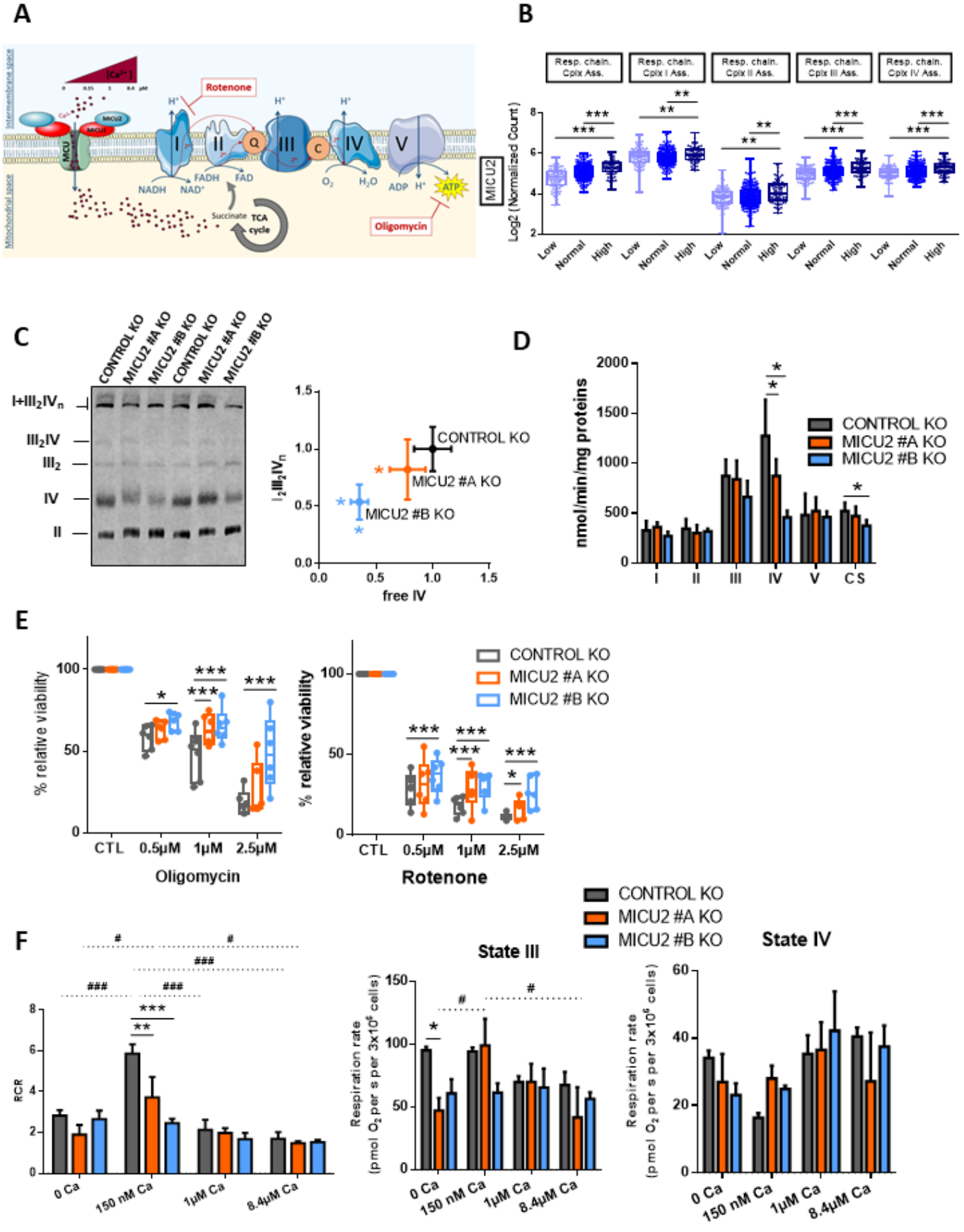


Figure 4. Contribution of MICU2 to respiratory chain complexes

(A) Simplified diagram of the respiratory chain and ATP synthesis in the mitochondria by OXPHOS. The production of ATP is possible due to the formation of a proton gradient around the membrane generated by the energy of the electrons supplied by NADH and $FADH_2$ to this chain. These electrons are transported via different complexes: I, II, III, and IV. This diagram also illustrates the analysis of mitochondrial cellular respiration of different [Ca^{2+}] (0, 150nM, 1µM, and 8.4µM). Ca^{2+} can regulate succinate, which in turn regulates complex II. (B) Boxplot representing the average expression of genes associated with the assembly of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III, and IV based on the status MICU2 in primary colon tumor samples from the TCGA-COAD dataset. (C) Analysis of supercomplex and complex assembly through BN-PAGE followed by western blotting. Left panel: representative blot hybridized with anti-NDUFS2 (complex I), UQCRC2 (complex III), SDHA (complex II), and MT-CO1 (complex IV). The position of the different free complexes or supercomplexes are indicated. Right panel: the supercomplex I1III2IVn quantity normalized to the CII quantity (y-axis) according to the free CIV quantity, normalized to the CII quantity (x-axis). The data are presented as the mean ± standard deviation (n=6, Mann–Whitney test). (D) Maximal activities of the respiratory chain complexes I (NADH ubiquinone reductase), II (succinate ubiquinone reductase), III (ubiquinol cytochrome *c* reductase), and complex IV (cytochrome oxidase), and activity of complex V (F1-ATPase) and the TCA enzyme CS. The data are presented as the mean ± standard deviation (n=5, Mann–Whitney test). (E) Boxplots representing the viability of the Control and MICU2 KO cell lines cultured in the presence of oligomycin (complex V inhibitor) (left panel) or rotenone (complex I inhibitor) (right panel) at increasing doses (0.5, 1, and 2.5µM) for 48 h (n=6, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). (F) Barplots representing respiratory states III, IV and RCR defined by the difference in oxygen consumption between succinate and substrate-free respiration (state II), phosphorylating respiration measured after injection of ADP and succinate (state III), and oxygen consumption after injection of oligomycin (state IV). The RCR is the respiratory control ratio calculated by the ratio between state III and IV. Respiratory rates are plotted against different [Ca2+] levels (0, 150nM, 1µM, and 8.4µM) (n=6-9, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). On all graphs, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

MICU2 controls proliferation of CRC cells by promoting fatty acid oxidation and mitochondrial pyruvate utilization

Therefore, we studied the cellular respiration of intact Control and MICU2 KO cells, in standard RPMI medium with the presence of glucose (2g/L) and glutamine (0.4g/L). We observed a significant reduction in the basal respiration rate (oxidative metabolism), the respiration dedicated to ATP production–linked oxygen consumption, and the maximal respiration (maximal oxidative capacity) in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (Figure 5A), which could be linked to complex IV deficiency. However, mitoCa^{2+} allows adjusting ATP production–linked oxygen consumption to the cellular energy demand by directly or indirectly regulating PDH, isocitrate dehydrogenase, and α-ketoglutarate dehydrogenase activities. Thus, the decreased oxidative metabolism and mitochondrial ATP synthesis could also be due to limited substrate supply. We addressed the contribution of MICU2 to the preferred pathways and substrates (glucose, glutamine, and fatty acids) used for energy production by the mitochondria. Then we evaluated the importance of the three metabolic pathways separately.

Fatty acids are transported into the cytosol and mitochondria by CD36 and carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)/CPT2, respectively. Once inside the mitochondria, fatty acids are degraded by beta-oxidation to produce, among other things, acetyl-CoA that fuels the TCA cycle and energy production (Figure 5B). Here, using Oil Red O staining, we observed an increase in lipid droplets in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line, suggesting either greater fatty acid storage or reduced beta-oxidation (Figure 5C). There was no difference between the Control and MICU2 KO cell lines in the mRNA expression of perilipins (PLIN), proteins that assemble on the surface of lipid droplets, or of CPT1 and CPT2 (Figures 5D and 5E). Compared with the Control KO cell line, the viability of the MICU2 KO cell lines was not reduced as much by the inhibitors of fatty acid CoA transporters CPT1 and CPT2 (etomoxir) or beta-oxidation (trimetazidine). There was no significant difference in the mRNA expression of MCU, MICU1, and MICU2 after etomoxir or trimetazidine treatment (Figures 5F and S5A). This suggests that in the absence of MICU2, the HCT116 cell line tends to be less dependent of fatty acid metabolism.

We then wondered whether the mitochondrial energy production mediated by fatty acid utilization depends on MICU2 expression. Hence, we used a fluorescent indicator of fatty acid oxidation (FAOBlue), which indicated that the MICU2 KO #B cell line had reduced fatty acid oxidation compared with the Control and MICU2 KO #A cell lines (Figure 5G).

Taken together, these results suggest that fatty acid beta-oxidation is not the preferred energy pathway used by MICU2 KO cells and that the deletion of MICU2 could alter the quantity of lipid droplets and beta-oxidation.

Glutamine is transformed into glutamate to fuel the TCA cycle. Glutaminolysis is widely used in HCT116 cells to sustain TCA cycle anaplerosis.[26] To determine whether MICU2 expression regulate the oxidative metabolism sustain through glutamine oxidation, we first analyzed respiration rates on intact cells in the only presence of glutamine (Figure 5H). With glutamine as substrate, basal respiration rate, respiration-linked to ATP synthesis and maximal oxidative capacity were all significantly reduced in MICU2 KO cells. However, we did not note significant difference in the decrease of the viability of Control and MICU2 KO cells induced by inhibitors of the amino acid transporter (V-9302) and glutaminase (telaglenastat) (Figure S5B). Glutamine has a versatile role in cell metabolism, not only participating in TCA cycle anaplerosis but also the biosynthesis of nucleotides, glutathione (GSH), and other nonessential amino acids. Thus, this suggests that MICU2 KO cells still displayed dependency on glutamine metabolism for their survival, despite a reduced mitochondrial oxidative metabolism support by glutamine.
High glucose concentration (4.5g/l) is known to force cellular metabolism towards “anaerobic” glycolysis. Indeed, the addition of high glucose decreases oxidative metabolism (basal respiration, ~80nmolO2/sec/million cells in glutamine versus ~55nmolO2/sec/million cells in glutamine and high glucose condition, Figures 5H and 5I) in control cells but has no effect on MICU2 KO cells, suggesting that these cells already have high reliance on glycolytic metabolism.
We thus measured PDH activity (known to be regulated by Ca^{2+}) and acetyl-CoA production and observed a significant reduction in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (Figures 5J and 5K). We observed a significant increase in PDP1 and PDHA1 mRNA expression in the MICU2 KO cell lines (Figures S5C and S5D), suggesting an increase in the expression of pyruvate regulator alongside a decrease in global PDH activity. To take our analysis a step further, we used mRNA expression to study the pentose phosphate pathway. PRPS1 and PRPS2 were increased in MICU2 KO cell lines (Figure S5E). Jing et al.[27] showed that PRPS1 upregulation is more important in promoting tumorigenesis and is a promising diagnostic indicator of CRC.

Overall, our results indicate that the MICU2 KO cell lines have lower OXPHOS associated with a reduction in PDH activity and acetyl-CoA production. Interestingly, the balance between glucose, beta-oxidation and glutaminolysis is modified in MICU2 KO cells.

Figure 5. MICU2 modulates substrate selection for the TCA cycle

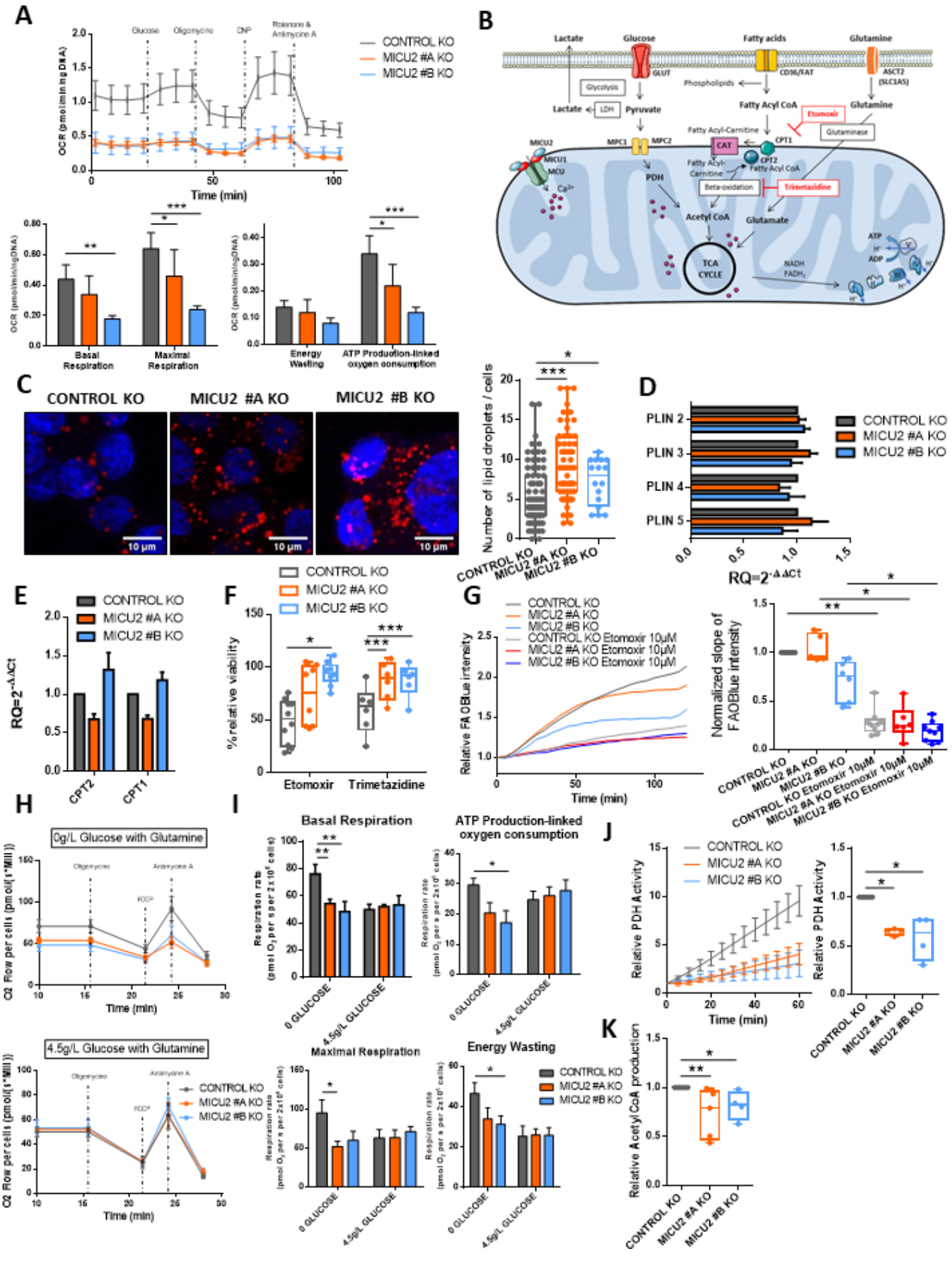


Figure 5. MICU2 modulates substrate selection for the TCA cycle

(A) Top panel: graph representing the OCR as a function of time in the Control and MICU2 KO cell lines and with sequential addition of glucose, oligomycin, DNP (protonophore), antimycin A (complex III inhibitor), and rotenone. Bottom panel: bar plots representing the basal respiration, maximal respiration, proton leak, and ATP production in Control and MICU2 KO cell lines (n=5, ANOVA followed Sidak's multiple comparisons test). (B) Illustration of the different metabolic pathways essential for proper functioning of the mitochondria through the TCA cycle. (C) Left panel: representative images of lipid droplets (red) and nuclei (blue) in the Control and MICU2 KO cell lines. The scale bar is 10 µm. Right panel: boxplot representing the number of lipid droplets per cell (n=17–80 cells, Mann–Whitney test). (D) qRT-PCR data showing fold changes in mRNA levels of fatty acid degradation proteins in the Control and MICU2 KO cell lines (n=8). (E) qRT-PCR data showing fold changes in mRNA levels of carnitine palmitoyltransferase 1 and 2 (CPT1 and CPT2) proteins in the Control and MICU2 KO cell lines. The results are expressed as the mean ± SEM of four and five independent experiments. (F) Boxplot representing the viability of the Control and MICU2 KO cell lines cultured for 48 h in the presence of 10 µM etomoxir (CPT1a inhibitor) or 10 µM trimetazidine (beta-oxidation inhibitor) (n=6–9, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). (G) Left panel: representative curve of FAOBlue fluorescence relative intensity in the Control and MICU2 KO cell lines with or without 10µM etomoxir. Right panel: boxplot-representing slope of FAOBlue fluorescence relative intensity with or without etomoxir (10µM). The data are presented as the mean ± standard error (n=5-9, Kruskal-Wallis test). (H) Graph representing the oxygen consumption rates of the Control and MICU2 KO cell lines in the absence with glutamine (top panel) or in the presence of high glucose (4.5g/L) and glutamine (bottom panel) in basal conditions and with sequential addition of oligomycin, FCCP (uncoupler) and antimycin A (complex III inhibitor). (I) Bar plots representing the basal respiration and ATP production–linked oxygen consumption (top panel) with maximal respiration and energy wasting (bottom panel) in the Control and MICU2 KO cell lines in presence of glutamine with or without high glucose (4.5g/L). The data are presented as the mean ± standard error of the mean (n=6, ANOVA followed Dunnett's multiple comparisons test). (J) Left panel: PDH activity at 60min in the Control and MICU2 KO cell lines. Right panel: boxplot representing the PDH in the Control and MICU2 KO cell lines (n=4, ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (K) Boxplot representing the production of acetyl-CoA in RPMI culture medium in the Control and MICU2 KO cell lines (n=4–5, Kruskal–Wallis test followed by Dunn's multiple comparisons test). On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

MICU2 knockout cells exhibit increased glycolytic flux *in vitro* and *in vivo*

Cellular ATP production is dependent of the TCA cycle and glycolysis, both of which are associated with glucose uptake by GLUT transporters. In the cytosol, glycolysis transforms glucose into pyruvate while producing ATP. Then, pyruvate is degraded into lactate by lactate dehydrogenase (LDH) and excreted from the cell by lactate transporters (MCT). Pyruvate can be transported into mitochondria through MPC proteins. PDH produces acetyl-CoA that serves as substrate for TCA cycle and mitochondrial ATP production (Figure 6A).

Here, we observed significantly increased mRNA expression of LDH and lactate transporters (MCT2 and MCT4) in the MICU2 KO cell lines compared with the Control cell line (Figure 6B), suggesting a more pronounced dependence on anaerobic glycolysis in these cell lines. Consistently, the MICU2 KO cell lines showed reduced viability when cultured in presence of a non-metabolizable glucose analog (2-deoxy-D-glucose [2DG]) compared with only a modest effect for the Control KO cell line (Figure 6C). Incorporation of fluorescent glucose (2-NBDG) and the production of lactic acid were also higher in the MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (Figure 6D and 6E).

To determine the preference of MICU2 KO cells for a glycolytic phenotype, we treated them with UK5099 (MPC1/MPC2 pyruvate transporter inhibitor). In these conditions, pyruvate cannot be used to sustain oxidative metabolism but is mainly converted to lactate. The Control KO cell line was more sensitive to UK5099 than the MICU2 KO cell lines (Figure 6F). In parallel, we found that UK5099 treatment did not significantly modify the mRNA expression of MICU1, MICU2, or MCU (Figure S6A). This finding suggests that the MICU2 KO cell lines are less dependent on energy generated from pyruvate by mitochondria.

Cancer cells growing in a hypoxic environment tend to be more dependent on anaerobic glycolysis for energy production.[28] As the MICU2 KO cell lines develop a preference for glycolysis, we measured the oxygenation of subcutaneous transplanted MICU2 KO tumors using photoacoustic imaging. We observed a significant reduction in the oxygenation of MICU2 KO #A tumors compared with Control KO tumors, suggesting a more hypoxic environment in those tumors (Figure 6G). This was confirmed by the staining of tumor sections with pimonidazole, a hypoxia indicator (Figure 6H). Interestingly, we found a positive correlation between the proliferative index (Ki67) and the pimonidazole only for MICU2 KO #A tumors, suggesting that the growth of MICU2 KO tumors is dependent on hypoxia (Figure 6I).

From the TCGA-COAD dataset, we defined three gene sets with genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, or the TCA cycle (Figures 6J and S6B). Interestingly, the expression of MICU1 is positively correlated with the average expression of genes associated with glycolysis (Figures S6C). By contrast, MICU2 expression and the MICU2/MICU1 ratio are negatively correlated with gene sets associated with glycolysis and

hypoxia and positively correlated with gene sets associated with mitochondrial respiration and the TCA cycle (Figures 6K). Using the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) dataset, we also defined the expression of MICU1, MICU2, and the MICU2/MICU1 ratio in 57 colorectal cancer cell lines using the four gene sets. We observed a tendency for a positive correlation between the expression of MICU1 and the average expression of genes associated with glycolysis. By contrast, we noted a tendency for a positive correlation between the expression of MICU2 and the mean expression of genes associated with the TCA cycle. We found that the MICU2/MICU1 ratio tends to be negatively correlated with the mean expression of genes associated with glycolysis (Figures S6D and S6E). Thus, MICU2 expression seems to promote the expression of genes associated with mitochondrial energy production. Our results suggest that CRC cells with low MICU2 expression develop a preference for glycolysis to support cancer cell proliferation in a hypoxic environment.

Figure 6. MICU2 expression correlates negatively with glycolysis and hypoxia and is associated with OXPHOS and the TCA cycle

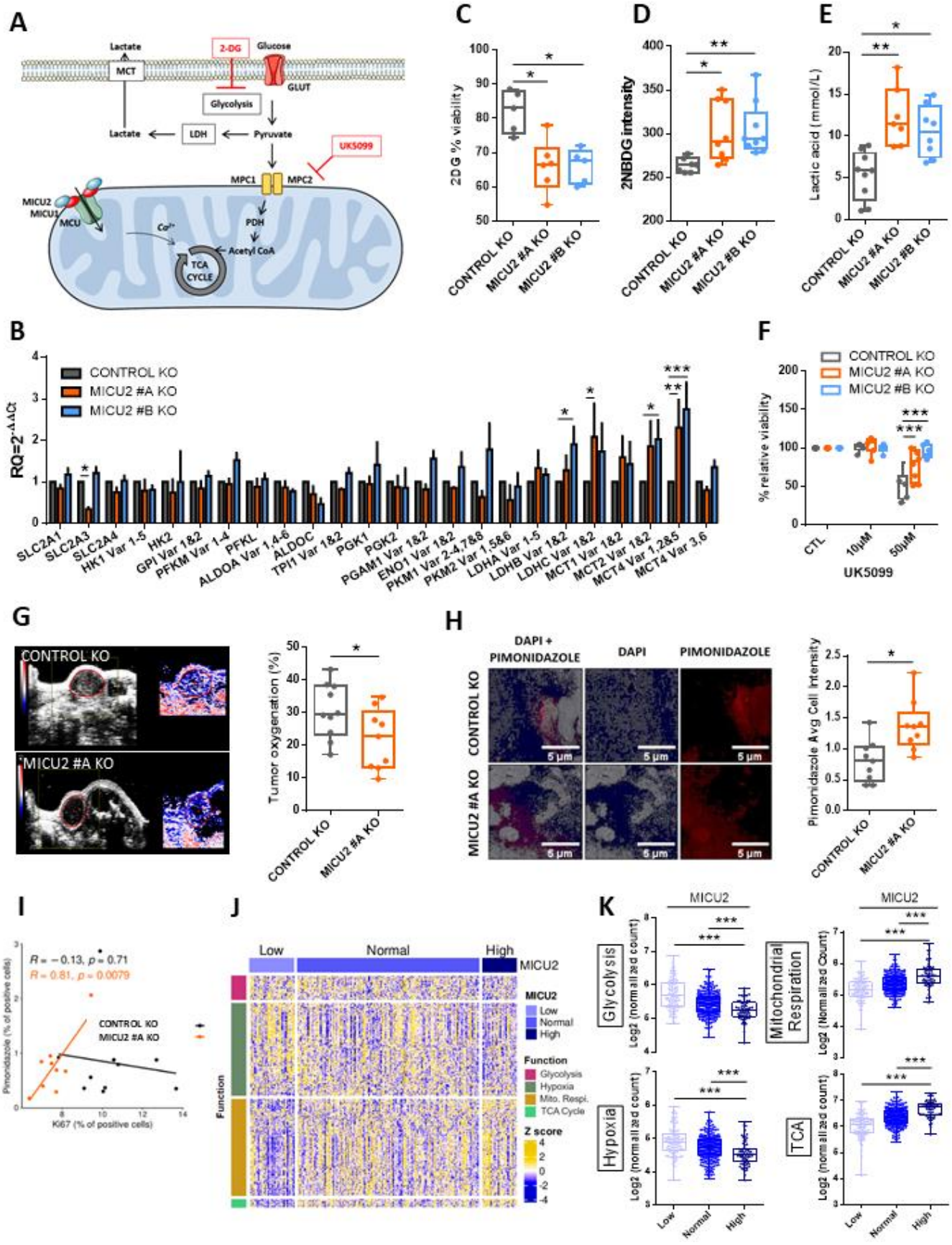


Figure 6. MICU2 expression correlates negatively with glycolysis and hypoxia and is associated with OXPHOS and the TCA cycle

(A) Diagram showing the glycolytic pathway. Glucose crosses the plasma membrane via GLUT; pyruvate is then reduced to lactate or can also pass the mitochondrial membrane to produce acetyl-CoA via PDH. Inhibitors of glycolysis such as 2DG (a non-metabolizable glucose analog) and UK5099 are present at their target. (B) Bar plots representing the level of expression of glycolysis-related genes in the Control and MICU2 KO cell lines (n=3–13, ANOVA followed Dunnett's multiple comparisons test). The data are presented as the mean ± SEM. (C) Boxplot representing viability of the Control and MICU2 KO cell lines after culturing for 48h with 2DG (n=5–6, ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (D) Boxplot representing the fluorescence intensity of the Control and MICU2 KO cell lines incubated for 30 min with the fluorescent glucose analog 2NBDG (n=7–9, ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (E) Boxplot representing lactic acid production in the Control and MICU2 KO cell lines (n=7–9, ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (F) Boxplot representing viability of the Control and MICU2 KO cell lines cultured in the presence of UK5099 (MPC inhibitor) (n=6–9, Anova followed by Dunnett's multiple comparisons test). (G) Left panel: representative images of photoacoustic imaging in the Control and MICU2 KO cell lines illustrating the oxygen levels in tumors at day 32. Right panel: boxplot representing tumor oxygenation of the Control and MICU2 KO cell lines (n=9–10, Mann–Whitney test). (H) Left panel: representative images of hypoxic areas in tumors detected by pimonidazole (red) and DAPI (blue) staining. The scale bar is 5µm. Right panel: boxplot representing the quantification of pimonidazole-positive areas on whole tumor sections (n=9, Mann–Whitney test). (I) Scatter plot representing the correlation of the Ki67 labeling index versus the pimonidazole score in the Control and MICU2 KO cell lines (R is the Pearson correlation coefficient). (J) Heatmap representing the expression of genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycle as a function of the MICU2 status of primary tumor samples from the TCGA-COAD dataset. (K) Boxplot representing the mean expression of genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycle according to the MICU2 status of primary tumor samples of the TCGA-COAD dataset. On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Discussion

In this study, we demonstrated that MICU2 is a guardian of mitochondrial OXPHOS and a pivotal element during the cancer metabolic switch from oxidative metabolism to glycolysis. The MCU complex mediates mitoCa^{2+}. Within this complex a scaffold (protein) EMRE and mtCa^{2+} proteins (MICU1, MICU2, and MICU3) interact with MCU, a pore-forming unit able to modulate mitoCa^{2+} absorption. Deregulation of mitoCa^{2+} homeostasis has been described in several cancers. Consistently, MCU expression is elevated in various types of cancer, including breast cancer, hepatocellular carcinoma, melanoma and CRC.[16]
The Ca^{2+}-dependent activation of MCU is conferred by MICUs, a set of EF hand–containing regulatory proteins. In all tissues this process is mediated by MICU1 and MICU2: MICU1 is responsible for keeping MCU in a closed state[29] and MICU2 allows Ca^{2+}-dependent MCU opening.[15] In brain and muscle, MICU3 replaces MICU2 for this task.[30] Several studies have endeavored to decipher molecular mechanism by which MICU1–MICU2 and MICU1–MICU3 heterodimers or MICU1–MICU1 homodimers regulate MCU channeling. However, the study of MICU proteins in a cancerous context remains very limited. In ovarian cancer, MICU1 silencing inhibits clonal growth, migration, and invasion *in vitro,* whereas its silencing *in vivo* inhibits tumor growth and increases cisplatin efficacy and overall survival.[31] Interestingly, inhibition of MICU1 results in the concomitant disappearance of MICU2 protein expression, indicating that MICU2 requires MICU1 for its stability, but not vice versa.[15] Thus, we investigated the stoichiometry of MICU2/MICU1 and the molecular function of MICU2 in cancer cells by knocking down the MICU2 gene in CRC cells. Bioinformatics analysis of publicly available CRC datasets revealed that transcriptomic expression of MICU2 or the MICU2/MICU1 ratio is correlated with the aggressiveness of CRC, with the highest expression measured in stage IV tumors and in metastases of CRC. These findings confirmed a previous report from Zhu et al.,[32] who described poorer overall survival in patients with CRC and higher MICU2 expression. The authors proposed that expression of the different members of MCU complex could be associated with a risk signature that predicts the prognosis and responses to immunotherapy in patients with CRC.

We have provided the first (to the best of our knowledge) experimental evidence that MICU2-mediated mitoCa^{2+} uptake is crucial for CRC cell growth by stabilizing mitochondrial network (fusion/fission balance), respiratory chain complexes, OXPHOS and regulating main substrate supply pathways in CRC cells. These mechanistic data validate the bioinformatics analysis, which shows that the stoichiometry of the MICU2/MICU1 ratio and in particular the expression of MICU2 are correlated with the expression of genes related to mitochondrial respiration and the TCA cycle and inversely correlated with the expression of genes related to glycolysis in tumor samples.

MitoCa^{2+} and mitochondria dynamics

We demonstrated that a loss of MICU2 decreases mitoCa^{2+} influx in CRC cells. Recently, Vishnu et al.[33] described an equivalent role of MICU2 in mitoCa^{2+} uptake in β cells. The absence of MICU2 has been associated with reduced mitoCa^{2+} uptake, but it also leads to a decrease in the quantity of MCU.[13]

In CRC, mitoCa^{2+} uptake promotes TFAM dephosphorylation to enhance mitochondrial biogenesis.[34] Changes in mitochondrial size and shape have been implicated in the regulation of mtCa^{2+} uptake. Using MNF2 KO or a DRP1 dominant negative mutation, Kowaltowski et al.[35] described significant effects of these proteins: They are partially responsible for the effect of mitochondrial morphology on mitoCa^{2+} uptake but do not affect MCU expression. MFN2 KO decreases both mitoCa^{2+} uptake and Ca^{2+} retention capacity in mitochondria. DRP1 dominant negative mutation enhances both mitoCa^{2+} uptake capacity and rates. In mice, constitutive DRP1 ablation reduces muscle growth.[36] In the present study, MICU2 KO did not affect the number of mitochondria, but the phospho-DRP1/DRP1 ratio was strongly increased and associated with a higher fragmentation level of mitochondria and reduced mitoCa^{2+} uptake. We demonstrated that MICU2 is an important actor for the regulation of mitoCa^{2+} uptake and mitochondrial morphology by altering phospho-DRP1/DRP1 activity.

MICU2 promotes the functioning of the respiratory chain

MICU1 and MICU2 KO cells exhibit altered [Ca^{2+}] threshold for mitoCa^{2+} uptake.[37] MICU2 acts as the genuine gatekeeper of MCU at low cytosolic [Ca^{2+}],[15] despite the huge driving force for matrix cation entry, thus preventing mitoCa^{2+} accumulation and Ca^{2+} overload.[38] MitoCa^{2+} acts as a key regulator of oxidative metabolism in mammalian cells.[39] In cancer cell lines, constitutive Ca^{2+} flow from ER to mitochondria regulates OXPHOS activity.[40] In permeabilized cells, we mimicked cytosolic [Ca^{2+}] ranging from 0 nM to 8.4 µM. Interestingly, MICU2 was involved in the proper functioning of the respiratory chain and the production of ATP in the absence of cytosolic Ca^{2+} or at a physiological concentration of 150 nM. Surprisingly, we demonstrated that loss of MICU2 expression results in a specific defect in the activity and expression of complex IV (cytochrome *c* oxidase), limiting supercomplex assembly and finally maximal OXPHOS capacity, as determined on permeabilized cells, even in absence of cytosolic Ca^{2+}. Paupe et al.[41] also reported the link between mitoCa^{2+} uptake and defective complex IV assembly. The suppression of CCDC90A, also named MCUR1, in human fibroblasts produces a specific cytochrome *c* oxidase assembly defect, resulting in decreased mitoCa^{2+} uptake capacity. The consequences of MICU2 KO on ATP production in Ca^{2+}-free conditions, and its effect on complex IV activity, may also point to a role for MICU2 in the respiratory chain, independent of Ca^{2+} and possibly independent of MCU. Additional experiments are required to determine this possible role.

The pivotal role of MICU2 in the metabolic orientation

Mitochondria are the main mediators for the change in metabolic activity of cancer cells.[42] This metabolic reprogramming is implicated in cancer progression and therapy resistance.[43]

CRC mostly arises from progressive *accumulation* of somatic *mutations* within cells. APC, KRAS, p53, and MYC have been reported to participate in genetically global metabolic reprogramming.[44] Pyruvate, produce through glycolysis, glutamine, and fatty acid metabolism form the substrates of the TCA cycle. All these pathways are altered in CRC.[45] Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells.[46] Oncogenic KRAS decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth.[47,48] p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase.[49] MitoCa^{2+} uptake is essential to activate Ca^{2+}-dependent dehydrogenases of the TCA cycle and to increase OXPHOS. In CRC cells, MCU expression promotes cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by upregulating mitoCa^{2+} uptake and energy metabolism.[50] .Using pharmacological blockers of the glutamine pathway or cell culture media devoid of glutamine, we observed that this substrate is essential for the viability of CRC cells. Furthermore, the oxidative metabolism and mitochondrial ATP production sustain through glutaminolysis is reduced by the down-expression of MICU2.

Here, we also described increased lipid accumulation in MICU2 KO cells and a reduction in the use of beta-oxidation related to proliferation mechanisms. Wang et al.[51] showed that CPT1A-mediated activation of fatty acid oxidation increases the metastatic capacity. We also reported that blocking CPT1 and beta-oxidation with etomoxir and trimetazidine reduced the viability of Control KO cells but did not affect the viability of MICU2 KO cells. Recently, Tomar et al.[52] demonstrated that MCU and mitoCa^{2+} shape bioenergetics and lipid homeostasis in hepatic cells.

Glucose is the primary source of energy of the cells and it supports important metabolic intermediates, and this contribution is thought to exert great effects on tumor cell metabolism. A decrease in mitochondrial ATP production implies an increase in energy synthesis by glycolysis. Because of their very different efficiencies, this means an increase in glucose consumption. In this study, we showed an increase in glucose uptake in MICU2 KO CRC cells. Furthermore, 2DG treatment led to a greater reduction in the viability of MICU2 KO cells than Control KO cells. These results corroborate the increase in lactate production in MICU2 KO cells, suggesting more glycolytic metabolism in MICU2 KO cells. Interestingly, inhibition of MPC with UK5099 did not affect the viability of MICU2 KO cells. Thus, in the absence of MICU2, cells develop a preference for glycolysis as the main energy supply. MitoCa^{2+} uptake is essential to activate Ca^{2+}-dependent dehydrogenases of the TCA cycle and to increase OXPHOS. We demonstrated that MICU2 KO decreased mitoCa^{2+} influx in CRC cells; this modification inhibited the phosphorylation of PDH and the amount of acetyl-CoA.

The role of different MICU isoforms on bioenergetic preference is not very clear. Chakraborty et al.[31] recently demonstrated that MICU1 overexpression in ovarian cancer cells induces both glycolysis and chemoresistance and that MICU1 overexpression in patients with ovarian cancer correlates with poor overall survival. In addition, MICU1 negatively regulates

OXPHOS function. In the vast majority of cases, cancer cells undergo metabolic reprogramming and preferentially use glucose via aerobic glycolysis.[53] In contrast, we have defined a role of MICU2 in maintaining an OXPHOS phenotype and the respiratory complex assembly in CRC cells at an advanced stage. Taken together, we propose that association between MICU1/MICU1, MICU2/MICU1, and MICU3/MICU1 implicated in MCU regulation shape the metabolic orientation of cancer cells. Thus, high MICU1 expression is associated with a glycolytic phenotype, while high expression of MICU2 favors respiration and mitochondrial metabolism. However, an MCU-independent contribution of MICU2 cannot be ruled out. Indeed, a recent report described MICU1 as an intermembrane space Ca^{2+} sensor that modulates mitochondrial membrane dynamics independently of matrix Ca^{2+} uptake.[54] Therefore, it is possible that MICU exerts a similar role in specific circumstances.

In summary, we have demonstrated a specific role for the MICU2 in the regulation of mitoCa^{2+} uptake in CRC. We have also defined a crucial role for MICU2 in maintaining the integrity of the mitochondrial network and in the proper assembly and functioning of the respiratory chain. For the first time, we have demonstrated the central role of MICU2 in the balance between glycolysis and OXPHOS during cancer progression, and more specifically in CRC. This work provides a promising perspective to better understand and target metabolic diseases including cancers. The MICU2/MICU1 ratio could represent a singular predictive marker of the metabolic preferences and pave the way for the development of personalized metabolic therapies.

Figure S1. MICU2 KO and expression of MCU, MICU1 and MICU2/MICU1 ratio in CRC cells

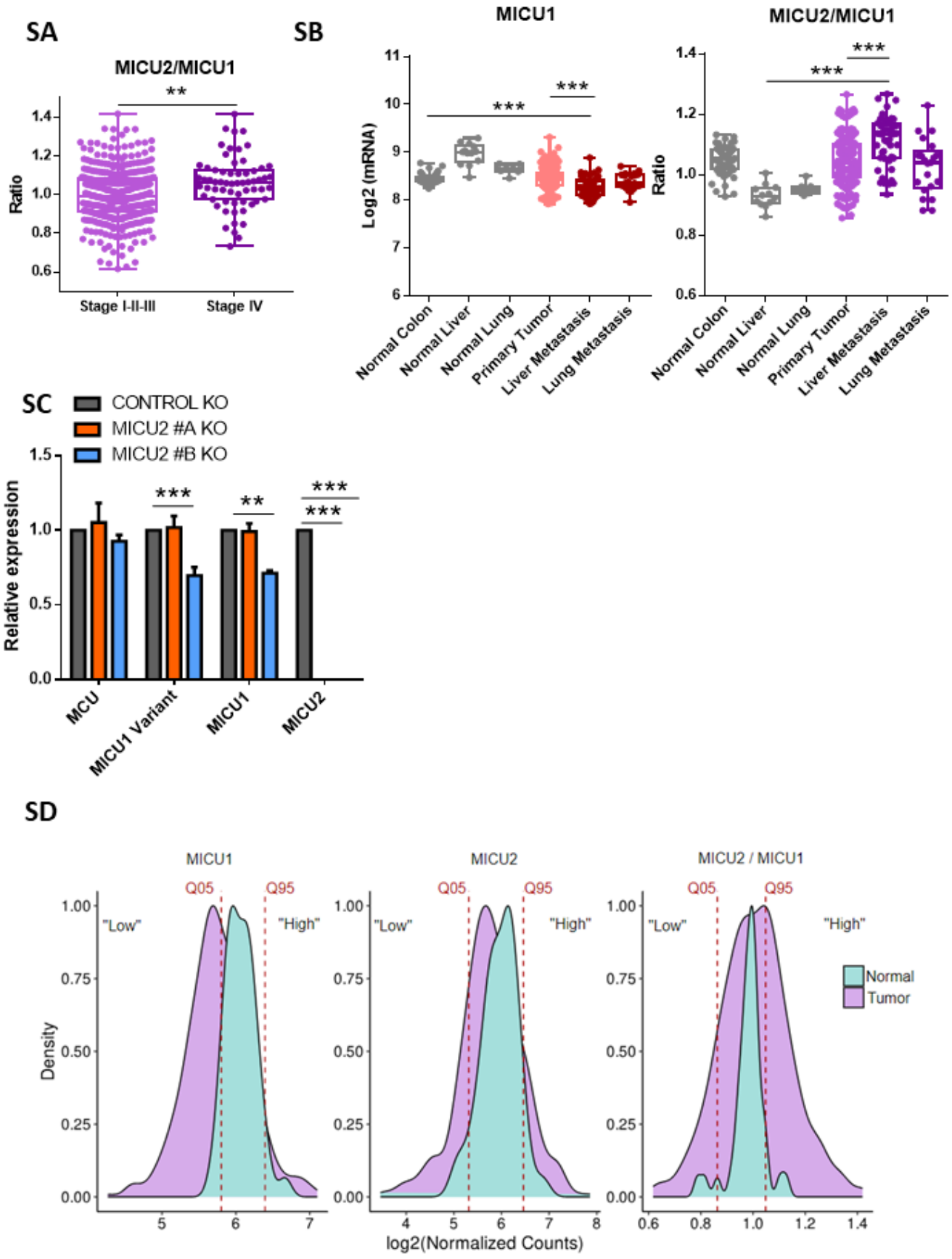


Figure S2. The role of MICU2 and MICU2/MICU1 ratio in cell proliferation, migration, and sensitivity to chemotherapy

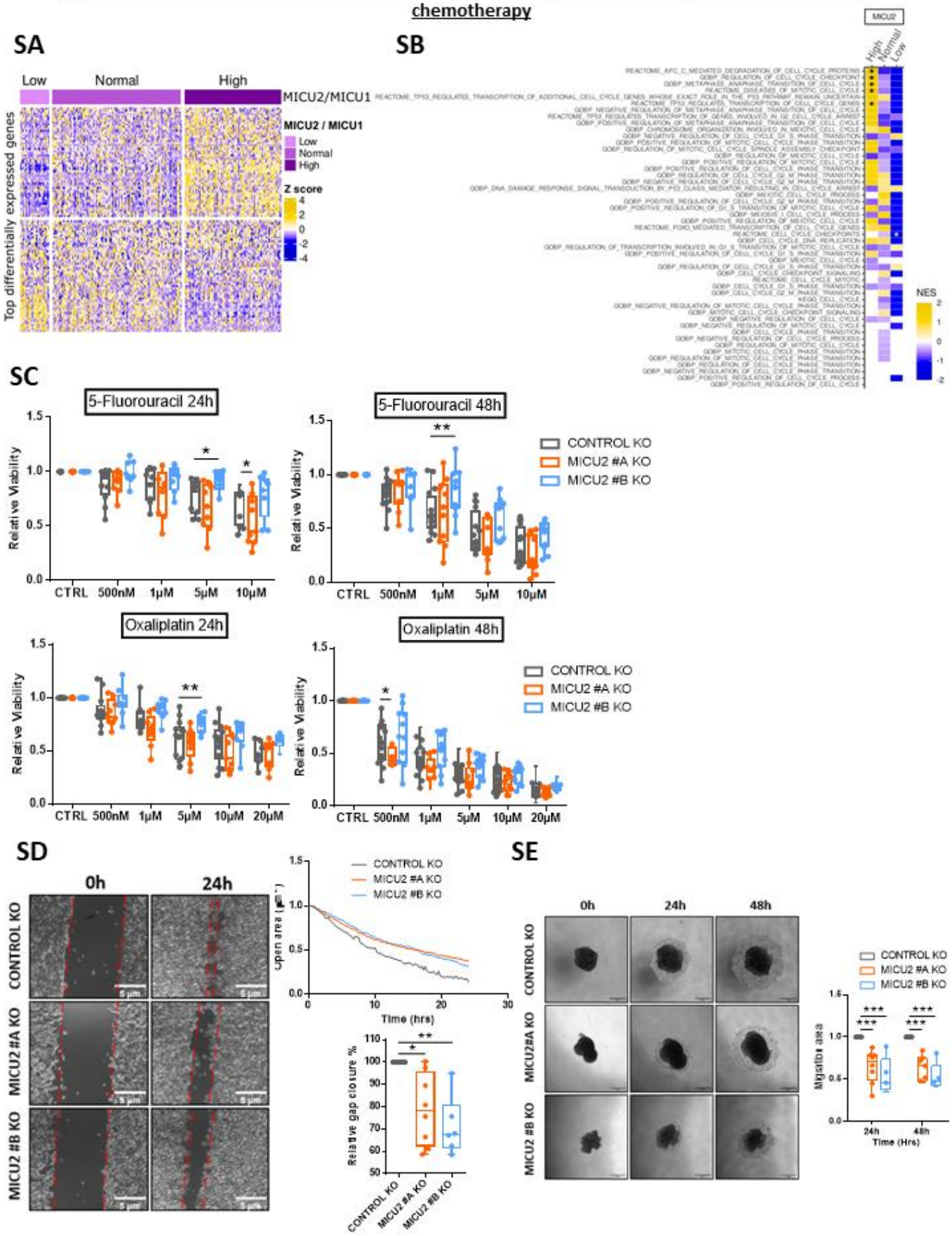


Figure S3. The effect of MICU2 knockout on mitochondrial dynamics and ROS/Ca^{2+} signaling

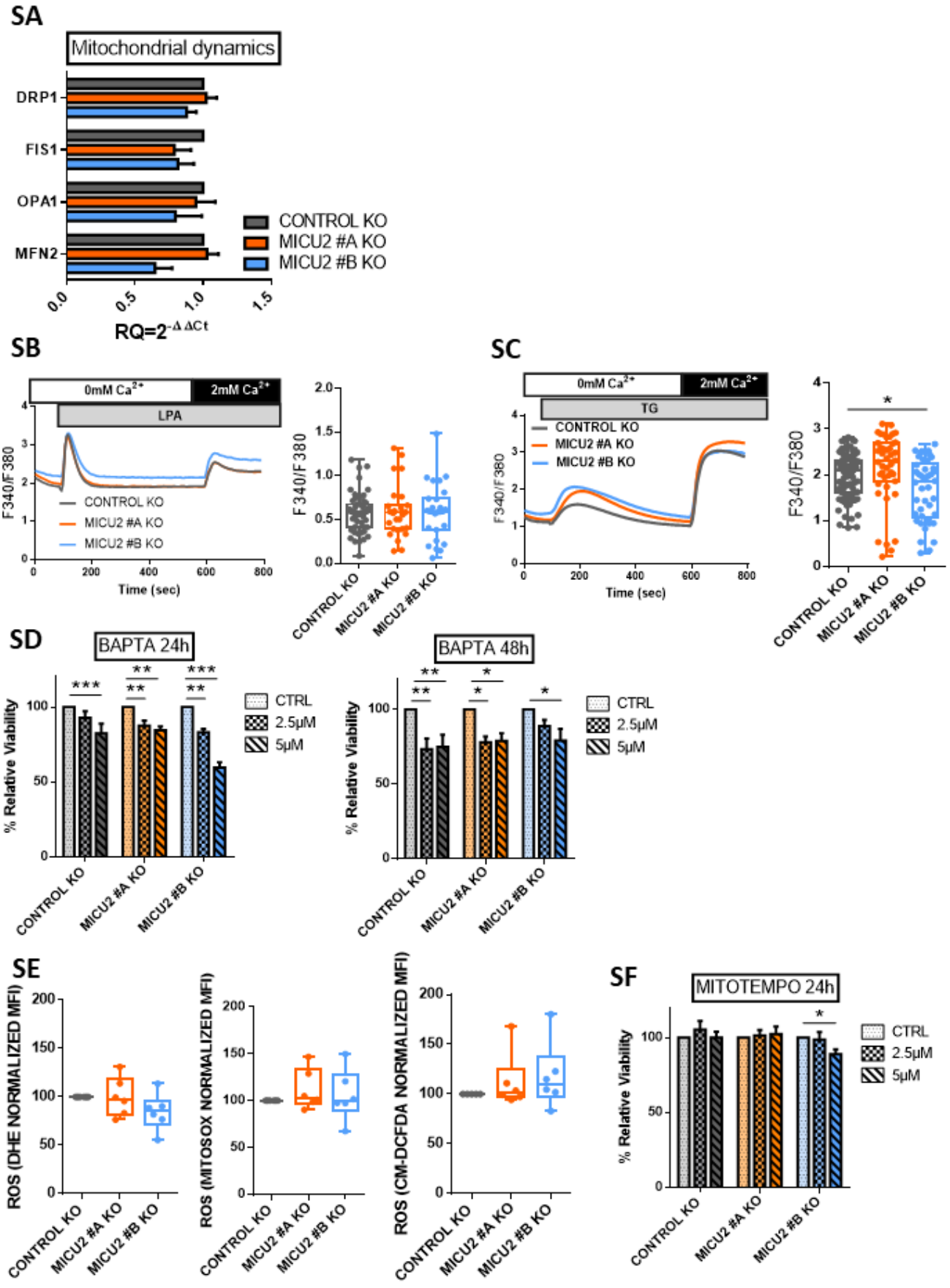
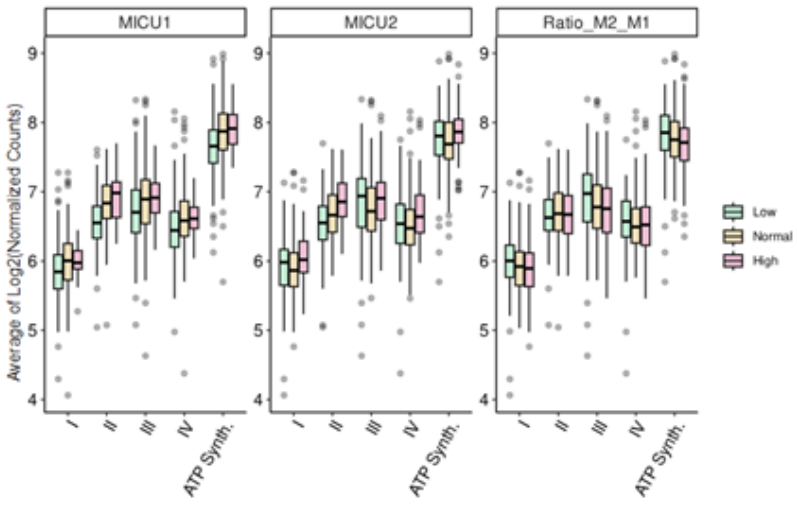
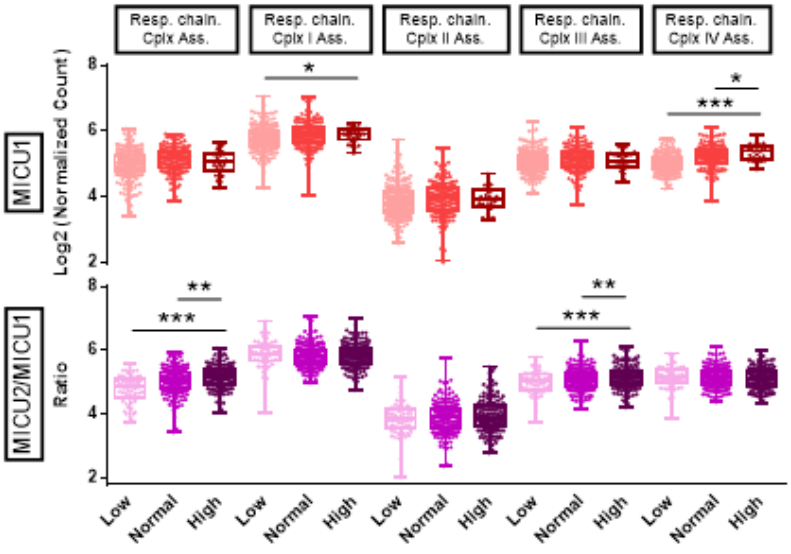


Figure S4. Molecular and functional analysis of the mitochondrial respiratory chain

SA



SB



SC

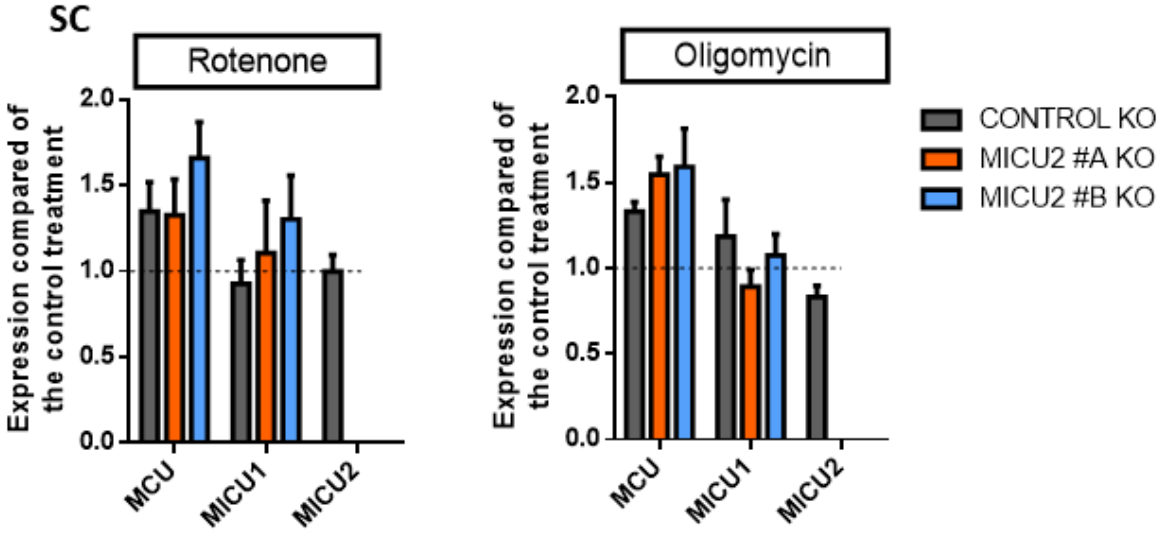


Figure S5. The impact of MICU2 deletion on fatty acid metabolism and beta-oxidation activities

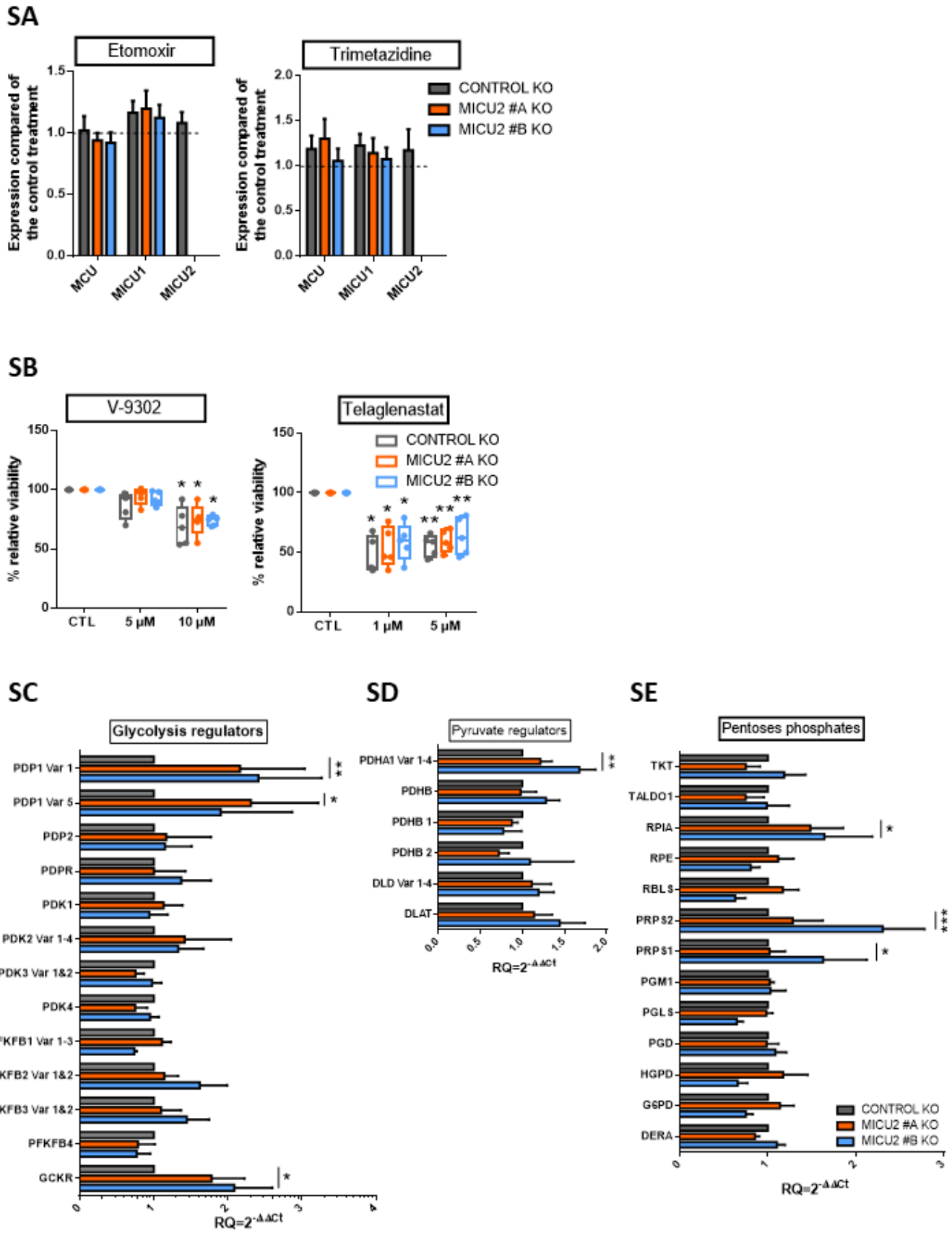


Figure S6. Expression of MICU2 and MICU2/MICU1 ratio related to genes involved in glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycle

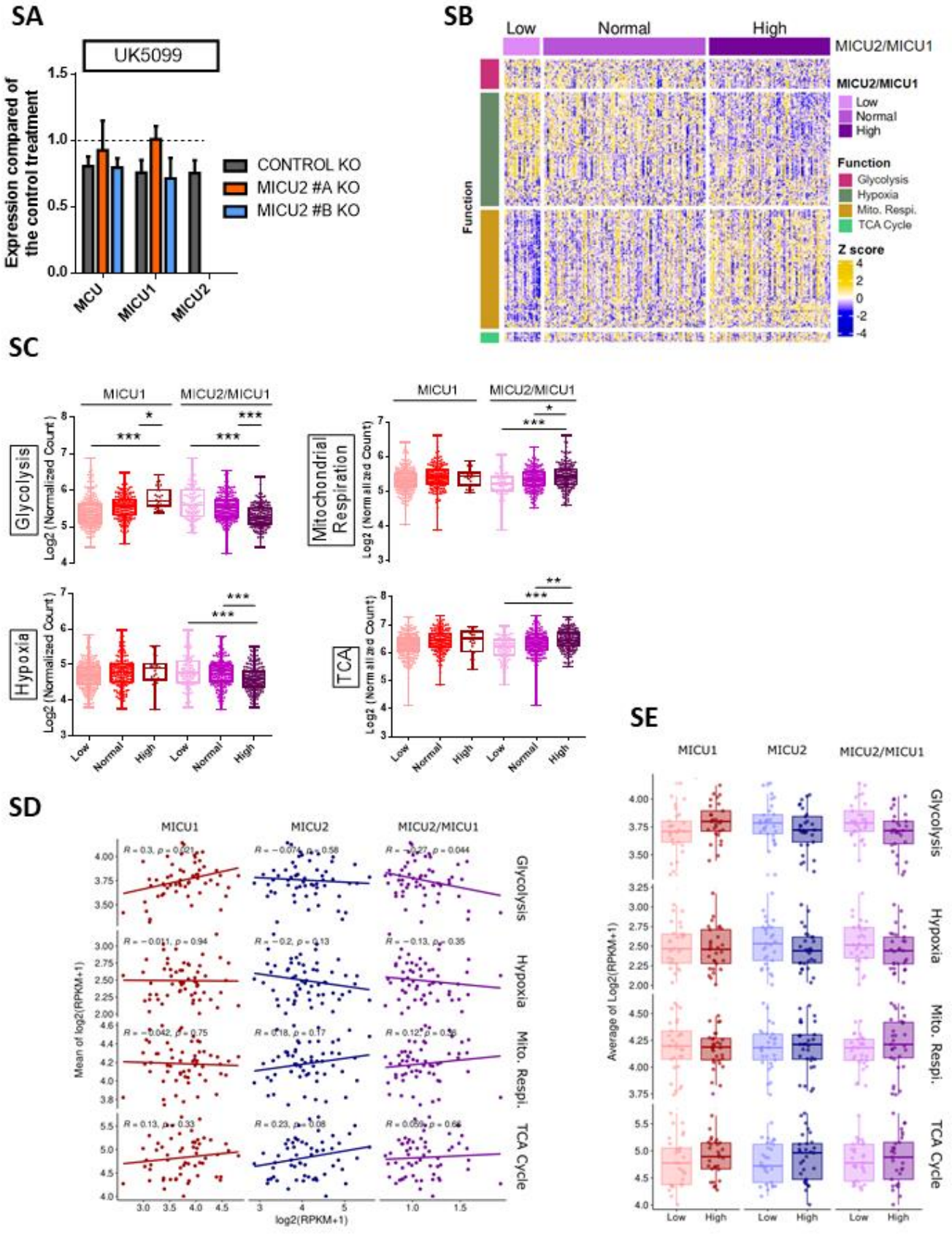


Figure S1. MICU2 KO and expression of MCU, MICU1 and MICU2/MICU1 ratio in CRC cells
(A) Transcriptomic analysis of the MICU2/MICU1 ratio according to CRC stages in the TCGA-COAD (B) Transcriptomic analysis of the MICU1 and MICU2/MICU1 ratio in the GSE41258 datasets. Each data point represents an individual sample (ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test). (C) Bar plot representing the expression of MCU, MICU1, MICU1 variant, and MICU2 mRNAs measured by RT-qPCR in the HCT116 Control and MICU2 KO cell lines (n=3, ANOVA followed Dunnett's multiple comparisons test, **p<0.01 and ***p<0.001). (D) Density plots representing the definition of the status of MICU1, MICU2, and the MICU2/MICU1 ratio of primary colon tumor samples of the TCGA-COAD dataset.

Figure S2. The role of MICU2 in cell proliferation, migration, and sensitivity to chemotherapy
(A) Heatmap of the most differentially expressed genes between colon tumor samples in the TCGA-COAD dataset with low, normal, or high expression of MICU2/MICU1 ratio. (B) Heatmap of normalized enrichment scores of all cell cycle–associated genes obtained by GSEA for primary colon tumor samples with low, normal, or high expression of MICU2. A star indicates an adjusted p-value <0.05. (C) Boxplots representing the viability of the Control and MICU2 KO cell lines cultured in the absence of presence in 5FU (500nM, 1µM, 5µM, and 10µM) (top panel) and oxaliplatin (500nM, 1µM, 5µM, 10µM, and 20µM) (bottom panel) for 24 and 48h (n=9–11). (D) Left panel: representative images of the wound healing assay. Right panel: curve and boxplots representing the percentage of gap closure as a function of time and after 24h in the Control and MICU2 KO cell lines. The scale bar is 5µm (n=6-8, Kruskal–Wallis test). (E) Left panel: representative images of 3D spheroids of the Control and MICU2 KO cell lines plated on top of a fibronectin layer after 0, 24, and 48h. Right panel: boxplot representing the migration area at 24 and 48h. The scale bar is 20µM (n=5-8, Kruskal–Wallis test). On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Figure S3. The effect of MICU2 knockout on mitochondrial dynamics and ROS/Ca^{2+} signaling
(A) Bar plots representing the fold change of the expression of genes associated with mitochondrial dynamics in the Control and MICU2 KO cell lines compared with the Control KO cell line (n=3–5). (SB) Left panel: representative measurements of cytosolic [Ca^{2+}] in the Control and MICU2 KO cell lines measured with Fura-2 AM in response to 1µM of LPA applied in the absence of extracellular Ca^{2+} and in the presence of 2 mM of extracellular Ca^{2+}. Right panel: boxplot representing the cytosolic Fura-2AM 340/380 ratio measured in the presence of extracellular Ca^{2+} in the Control and MICU2 KO cell lines (n=4, N=27–55). (C) Left panel: representative measurements of cytosolic [Ca^{2+}] in the Control and MICU2 KO cell lines measured with Fura-2AM in response to 2µM TG applied in the absence of extracellular Ca^{2+} and in the presence of 2mM of extracellular Ca^{2+}. Right panel: boxplot representing the basal Fura-2AM 340/380 ratio measured in the presence of extracellular Ca^{2+} in the Control and MICU2 KO cell lines (n=6, N=42–95, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). (D) Bar plots representing the viability of the Control and MICU2 KO cell lines cultured 24 or 48 h in presence or absence of BAPTA-AM (a Ca^{2+} chelator) (n=3–5, ANOVA followed by

Dunnett's multiple comparisons test). (E) Boxplots representing ROS production in the Control and MICU2 KO cell lines. Total ROS, mitochondrial ROS, and hydrogen peroxide were measured using DHE, MitoSox, and DCFDA, respectively. (F) Bar plots representing the viability of the Control and MICU2 KO cell lines incubated for 24h with MITOTEMPO (a mitochondrial ROS chelator) (n=5–7, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test). On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Figure S4. Molecular and functional analysis of the mitochondrial respiratory chain

(A) TCGA analysis showing expression values of respiratory chain complexes as a function of low, normal, and high expression of MICU1, MICU2, and the MICU2/MICU1 ratio. (B) Boxplot representing the average expression of genes associated with the assembly of mitochondrial respiratory chain complexes I, II, III, and IV based on the status MICU1 and MICU2/MICU1 ratio in primary colon tumor samples from the TCGA-COAD dataset. (C) The expression levels of MCU, MICU1, and MICU2 were determined in the Control KO and MICU2 KO cells treated with the inhibitors rotenone and oligomycin using RT-qPCR. The data are presented as the mean ± standard error of the mean of four independent experiments. On all plots, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

Figure S5. The impact of MICU2 deletion on fatty acid metabolism and beta-oxidation activities

(A) The expression of MCU, MICU1, and MICU2 were determined in the Control and MICU2 KO cell lines treated with the inhibitors etomoxir (left panel) and trimetazidine (right panel) using RT-qPCR. The data are presented as the mean ± standard error of the mean of three or four independent experiments. (B) Efficacy of V-9302 (ASCT2 inhibitor) (left panel) and telaglenastat (glutaminase inhibitor) (right panel) treatments (1–10µM) after 48h on the Control and MICU2 KO cell lines (n=5, ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test, *p<0.05. (C) qRT-PCR data showing fold changes in mRNA levels of glycolysis regulator proteins in the Control and MICU2 KO cell lines (n=4–7, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, *p<0.05 and **p<0.01). (D) RT-qPCR data showing fold changes in mRNA levels of pyruvate regulator proteins in the Control and MICU2 KO cell lines (n=3–5, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, **p<0.01). (E) RT-qPCR data showing fold changes in mRNA levels of pentose phosphates proteins in the Control KO and MICU2 KO cell lines (N=5, ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test, *p<0.05 and ***p<0.001).

Figure S6. Expression of MICU2 related to genes involved in glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycle

(A) The expression of MCU, MICU1, and MICU2 was determined in the Control and MICU2 KO cell lines treated with the inhibitor UK5099 using RT-qPCR. The data are presented as the mean ± standard error of the mean of four independent experiments. (B) Heatmap representing the expression of genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial

respiration, and the TCA cycle as a function of the MICU2/MICU1 status of primary tumor samples from the TCGA-COAD dataset. (C) Boxplot representing the mean expression of genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycle according to the MICU1 and MICU2/MICU1 ratio status of primary tumor samples of the TCGA-COAD dataset. (D) Scatter plot representing the correlation of the average expression of genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycles as a function of the expression of MICU1, MICU2, or the MICU2/MICU1 ratio in a panel of 57 CRC cell lines from the RNA-Seq dataset of the CCLE. (R is the Pearson correlation coefficient). (E) Boxplots representing the average expression of genes associated with glycolysis, hypoxia, mitochondrial respiration, and the TCA cycle in a panel of 57 CRC cell lines from the RNA-Seq dataset of the CCLE classified as low or high expression of MICU1, MICU2, or the MICU2/MICU1 ratio as a function of the median expression of MICU1, MICU2 or the MICU2/MICU1 ratio. On all plots, *$p<0.05$, **$p<0.01$, and ***$p<0.001$.

Methods

Transcriptomic analysis

Transcriptomic analyses and heatmaps were generated using R software. RNA-Seq data from colon cancer and normal colon were generated by The Cancer Genome Atlas Research Network (http://cancergenome.nih.gov/). Read counts and clinical annotation were download from GDC using the *tcgaworkflow* package. Read counts were then filtered, normalized, processed, and logarithmically transformed using the *edgeR* package. Primary tumors of TCGA-COAD were classified as "High" or "Low" if the value of their expression is respectively superior to the 95th percentile or inferior to the 5th percentile of their expression in normal samples. Heatmaps were generated using the *ComplexHeatmap* package. Differential expression analysis was performed on read counts using the *edgeR* package. DEA was obtained by comparing groups defined according to the expression of MICU2, MICU1, or the MICU2/MICU1 ratio. GSEA was performed on the log_2(fold change)-ranked gene lists obtained by DEA using the *fgsea* package and gene set collections from MSigDB (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb-c5.go.bp.v7.5.1.symbols.gmt). Published transcriptomic data of normal, primary, and metastatic CRC generated by microarrays (GSE41258) were used[55]. Raw data were downloaded and RMA pre-processed using the *affy* package.

Cell culture

The CRC cell lines HT29, DLD1, HCT116, SW480, and SW620 were chosen to investigate the role of MICU2. CRC cells were cultured in RPMI-1640 media + GlutaMax (Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Eurobio, Les Ulis, France) and 1% penicillin and streptomycin (Eurobio). NCM356 cells (Incell Corporation, LLC, San Antonio, TX, USA) were cultured in high-glucose Dulbecco's Modifed Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) supplemented with 10% FBS and antibiotics. All cells were cultured in an incubator at 37°C with 5% CO_2.

Generation MICU2 KO

Several MICU2 KO clones in HCT116-Luc cells were generated by Ubigene (China) using the CRISPR/Cas9 system. MICU2 KO was generated using two exon 2 targeting sequences, MICU2-gRNA3 (ACACTTAGAGATTAAACGAGG) and MICU2 gRNA6 (GTATTCCAGTACACTTAGGAAGG). All clones were validated by polymerase chain reaction (PCR) and imaging.

Metabolic pathway inhibitors

The following inhibitor references are described in the Star Methods: 2DG (5mM), 2NBDG (100µM), UK5099 (50µM), rotenone (0.5, 1, and 2.5µM), oligomycin (0.5, 1, and 2.5µM), trimetazidine (10µM), etomoxir (10µM), telaglenastat (1 and 5µM), V-9302 (5 and 10µM), BAPTA (2.5 and 5µM), and MITOTEMPO (2.5 and 5µM).

Specific media

Specific media were used: RPMI Medium 1640 [-] Glutamine (Reference: 42401018, Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France), RPMI Medium 1640 [-] Glucose (Reference: 11879020, Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France), RPMI Medium 1640 [+] 4.5 g/L D-Glucose (Reference: A1049101, Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France).

Cell proliferation

After harvesting, 3×10^3–5×10^3 cells were plated in each well of 96-well plates. The platers were incubated at 37°C in 5% CO_2 for 4 h to allow the cells to adhere to the plate. The CyQUANT-NF dye was diluted in HBSS buffer, and 100 µL of the mixture was added in each well. The plate was kept at 37°C in 5% CO_2. The fluorescence intensity (~485/~530nm) was measured using FlexStation 3 Multimode Plate Reader (Molecular Devices, California, USA).

Cell viability

Cell viability, survival in HBSS, and short-term toxicity were evaluated using standard sulforhodamine B (SRB) method after treatment for 24 and 48h. Briefly, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid for 1h at 4°C and stained for 15min with 0.4% SRB solution. Cells were then washed three times with 1% acetic acid and dye was dissolved using 10mM Tris over 10min. Absorbance at 540nm was determined with a BioTek (Vermont, United States) Spectrophotometer.

Cell cycle

Cells were harvested using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) 24h after treatment, washed in 1× phosphate-buffered saline (PBS), fixed in cold 70% ethanol, and incubated at -20°C for at least 2h. Subsequently, the samples were resuspended in PBS with RNase and stained with 0.025 mg/mL propidium iodide (PI) for 30min in the dark at room temperature. The DNA content of stained cells was analyzed using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). For each sample, a minimum of 5×10^4 cells were evaluated. Analyses were done using the Kaluza 1.3 software (Beckman Coulter).

Cell migration in the wound healing assay

First, 6×10^5 cells were seeded on each side of an Ibidi culture insert (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany) in 100µL of RPMI supplemented with 10% FBS and enriched with 1% antibiotics. The 24-well plate was incubated at 37°C and 5% CO_2 for 24h. The insert was then removed to create the scar and 500µL of medium was added. The plate containing the scarred cells was then placed in a chamber maintained at 37°C and 5% CO_2, connected to a camera so that photographs of the scar could be taken at regular intervals for 24h. At the end of the migration, the area of the scar not covered by cells was measured using the T-scratch software. The percentage of coverage is calculated using the formula:

$$\text{Recovery \%} = \frac{A_{T\,0H} - A_{T\,24H}}{A_{T\,0H}},$$

where $A_{T\,0H}$ is the uncovered scar area measured at time T0 immediately after scar creation and $A_{T\,24H}$ is the uncovered scar area measured at time T24, 24h after scar creation.

Spheroid base migration

Spheroids were prepared by seeding drops of cells at a rate of 3×10^3 cells per 30µL into the lid of a petri dish (Reference: 353003, Falcon), the lid was then turned over to form a spheroid. After 4 days, the spheroid was placed in a 96-well plate (Reference: 353077, Falcon) coated with fibronectin and the migration around the spheroid was photographed using a microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) at 0, 24, and 48h.

Subcutaneous CRC xenograft tumor model

CRC xenografts were established by injecting 5×10^6 cells per Swiss nude mouse (n=10 per cell line) as described previously by Gueguinou et al.[56] All mice were assessed weekly using whole-body bioluminescence imaging and photoacoustic imaging as described below. Authorization (Apafis 19933) was given by the regional ethical committee CEEA – 003 (Campus CNRS, Orléans) and the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation (MESRI).

Ultrasound/photoacoustic imaging, bioluminescence imaging, and hypoxia immunostaining

The protocols have already been described in detail.[57] Briefly, bioluminescence imaging was performed once a week until the end of the study using an IVIS-Lumina II (Perkin Elmer, France). Each mouse was injected intraperitoneally with 100mg/kg luciferin potassium salt (Promega, France). After mice were anesthetized, acquisition binning and duration were set depending on tumor activity. Signal intensity was quantified as the total flux (photons/seconds) within regions of interest drawn manually around the tumor area using Living Image 4.4 software (Perkin Elmer).

For photoacoustic imaging, mice were anesthetized with 1.5% isoflurane and placed on a thermostatically heating pad (37°C). Respiratory gating was derived from electrocardiography. A colorless aqueous warmed ultrasonic gel (Supragel1, LCH, France) without any air bubbles was applied between the skin and the transducer. Tumors were imaged with the VisualSonics VevoLAZR System (FUJIFILM VisualSonics Inc, Canada). Three-dimensional (3D) scans were made of digitally recorded ultrasound images. The tumor area was measured by delineating the margins using Vevo1LAB 3.2.6 software. For hypoxia assessments, tumors were investigated by photoacoustic imaging with the OxyHemo-Mode to determine the average SO2 values and the corresponding hypoxic volumes. A transducer with central frequency at 21 MHz was used for B-Mode imaging and photoacoustic imaging.

Pimonidazole immunostaining was performed with the Hypoxyprobe kit (Hypoxyprobe, Burlington, USA), following the supplier's instructions. Briefly, mice received an intravenous injection of 60 mg/kg of the pimonidazole solution and were sacrificed 60 min following the injection. The tumors were then resected and fixed for 24 h in 10% formaldehyde. The tumors were embedded in paraffin and sectioned. The primary antibody was mouse anti-

pimonidazole and the secondary antibody was FITC-labeled goat anti-mouse (Abcam, Cambridge, USA).

Lipid droplet staining

Forty-eight hours before fixation, 1×10^5 cells were placed per well in an 8-well cell culture chamber (Reference: 154534, Labtek, Brendale, QLD). The cells were fixed with a 4% paraformaldehyde at room temperature for 15 min. Cell culture chambers were rinsed twice with cold PBS, permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 5 min at room temperature, rinsed three times with PBS, and then incubated with blocking solution (PBS containing 0.2% bovine serum albumin [BSA], 0.02% sodium azide, 0.05% Triton X-100, and 10% FBS) for 1 h at room temperature. Cells were stained with 0.3% Oil Red O (diluted in 60% isopropanol) for 2 min at room temperature. The cell culture chambers were then washed twice in PBS and nuclei were stained with DAPI for 5 min. The cell culture chambers were then washed once more and mounted with coverslips using SlowFade Gold antifade mounting medium (Reference: P36961, Molecular Probes, Oregon, USA).

Oil Red O was used to quantify the number of lipid droplets. The images were acquired with a Leica SP8 microscope (microscopy department of the University of Tours). Image processing and analysis were performed using ImageJ/Fiji software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). After subtracting the background (using a 20-pixel rolling ball radius) and setting an identical threshold for all images, the particle analysis function was used to measure the number of lipid droplets per cell.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was done with a Discovery Ultra Machine (Roche, Mannheim, Germany) and the Chromo-Map Kit (Reference: 760-159, Roche). The primary antibody (Ki67) was diluted with Antibody Diluent (Reference: 760-108, Roche) and the samples were incubated 60 min at 37°C. Automatic application of secondary antibody was done with Omni Map anti-Rb HRP (Reference: 760-4311, Roche). The staining was visualized by automatic addition of the substrate (H_2O_2+DAB) of the Chromo-Map Kit and the HRP of the secondary antibody. Counter-staining was performed with Hematoxylin II (Reference: 790-2208, Roche) for 16 min and Bluing Reagent (Reference: 760-2037, Roche) for 4 min. The slides were then dehydrated and mounted with Pertex mounting media (Reference: 00811-EX, Histolab, Askim).

3D fluorescence microscopy

Cells were transfected with a mitochondria-targeted fluorescent protein (PDH_GFP) or incubated for 15 min with 100 nM Mitotracker green (Molecular Probes) to stain the mitochondrial network. For fluorescence imaging, coverslips were mounted in housing and placed on the stage of an inverted wide-field ECLIPSE Ti-E microscope (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a 100× oil immersion objective lens (Nikon Plan Apo100x, N.A. 1.45) and an Andor NEO sCOMS camera controlled by Metamorph® 7.7 software (Molecular Devices,

Sunnyvale, CA, USA). A precision piezoelectric driver mounted underneath the objective lens allowed faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting the objective lens. Fifty-five image planes were acquired along the Z-axis at 0.1-µm increments. For mitochondrial network characterization, the acquired images were iteratively deconvolved using Huygens Essential® software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, the Netherlands), with a maximum iteration score of 50 and a quality threshold of 0.01. Imaris 8.0® software (Bitplane, Zurich, Switzerland) was used for 3D processing and morphometric analysis. The mitochondrial network was modelled in 3D, and thresholds were defined to classify mitochondria depending on their volume (Imaris Isosurface Tools).

Reverse transcription real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Total RNA was collected using the Nucleospin RNA Kit (Macherey–Nagel, Hoerdt, France) and transcribed into complementary DNA (cDNA) with the PrimeScript RT Reagent Kit (RR037A, Takara, Kusatsu, Japan). cDNA was then amplified with the SYBR Green Master kit (Roche) using a Light Cycler 480 apparatus. RT-qPCR was performed in 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 45 s. The average ΔCt value was calculated for each cell line with respect to the housekeeping gene HPRT1. The primers sequences used are:

Primers	Forward	Reverse
HPRT1	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTCAGTCCT
MCU	CGCCAGGAATATGTTTATCCA	CTTGTAATGGGTCTCTCAGTCTGTT
MICU1	GAGGCAGCTCAAGAAGCACT	CAAACACCACATCACACACG
MICU1 Variant	CAATATATAATAAAACGCTTTGATGGAAAGA	GCGAATGATGCTCTGAACCT
MICU2	GGCAGTTTTACAGTCTCCGC	AAGAGGAAGTCTCGTGGTGTC
MCT1	GTGACCATTGTGGAATGCTG	CATGTCATTGAGCCGACCTA
MCT2	GTTGACAGCGAGGCGAAT	CTTGTTTCAGGTTTCACAGGAA
MCT4 Var1,2&5	GGGAAGGTCCAACCTTACACT	CCATCACAAACACATTCACCA
MCT4 Var3,6	GGGAAGGTCCAACCTTACACT	AATAGCAACCAGGGGACCA
SLC2A1	GGTTGTGCCATACTCATGACC	CAGATAGGACATCCAGGGTAGC
SLC2A3	GCCCTGAAAGTCCCAGATTT	TTCATCTCCTGGATGTCTTGG
SLC2A4	CTGTGCCACCTGATGACTG	CGTAGCTCATGGCTGGAACT
HK1	CACCTGTGAGGTTGGACTCA	CCACCATCTCCACGTTCTTC

HK2	TCCCCTGCCACCAGACTA	TGGACTTGAATCCCTTGGTC
GPI	CCCTATGACCAGTACCTGCAC	TTCCCATTGGACTCCATGTC
PFKM	GCCATCAGCCTTTGACAGA	CTCCAAAAGTGCCATCACTG
PFKL	GCTTCGACACCCGTGTAACT	ATGCCCATCTTGCTGCTC
ALDOA	TGCCAGTATGTGACCGAGAA	GCCTTCCAGGTAGATGTGGT
ALDOC	GAACCCGAGCTGTGCTTG	GTACGAGTGAGGCATGGTGA
TPI1	GTTGGGGAAACTGGAAGAT	TAGGGGGAGCACAAACCAC
PGK1	CAGCTGCTGGGTCTGTCAT	GCTGGCTCGGCTTTAACC
PGK2	CCAGCTCCTGGTTCAGTCA	TCCCTTCTTCCTCCACATGA
PGAM1	GGAGGGGAAACGTGTACTGAT	AGCTCCATGATAGCCTCTTCA
ENO1	TCCCAACATCCTGGAGAATAA	ATGCCGATGACCACCTTATC
PKM1	CAGCCAAAGGGGACTATCCT	CCTCAGCCTCACGAGCTATC
PKM2	CAGCCAAAGGGGACTATCCT	CAAATAATTGCAAGTGGTAGATGG
LDHA	GTCCTTGGGGAACATGGAG	TTCAGAGAGACACCAGCAACA
LDHB	GATGGATTTTGGGGGAACAT	AACACCTGCCACATTCACAC
LDHC	GCTCTGAAGACTCTGGACCCTA	TCAGCTTGATAATTTCATAGGCACT
CPT1	CCTCCGTAGCTGACTCGGTA	GGAGTGACCGTGAACTGAAAG
CPT2	TGACCAAAGAAGCAGCAATG	GAGCTCAGGAAGATGATCC

Western blot analysis

HT29, DLD1, SW480, HCT116, and SW620 colon cancer cells and NCM356 non-tumoral cells were collected with a lysis buffer containing protease inhibitors and phosphatase inhibitors and used for protein assay. A BCA protein assay kit (Reference: 23227, Thermo Fisher Scientific, France) was used to determine the protein concentration. The resulting proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (4%–15% Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, Bio-Rad, California, USA) and then transferred to a nitrocellulose membrane (Reference: 1704158, Bio-Rad). The membranes were incubated in primary antibody diluted 1:1000 in TBST with 5% milk overnight at 4°C with agitation. The primary antibodies were against MCU (Sigma-Aldrich), MICU2 (Abcam), MICU1 (Sigma-Aldrich), MFN2

(Cell Signaling, USA), OPA1 (BD Biosciences, France), DRP1 (Cell Signaling), PDRP1 (Cell Signaling). The following day, the membranes were washed three times with TBST and incubated with HRP-conjugated secondary antibody at room temperature for 1 h with shaking. The secondary antibodies used were: m-IgG Fc BP-HRP (1:5000, sc-525409) and Ms x Rb Light Chain specific HRP (1:2000, MAB201P). The internal control was total protein deposited and quantified with a gel stain. An ECL chemiluminescence kit (Clarity Western ECL substrate, Bio-Rad) was used to visualize the bands, which were quantified with Image Lab software (Bio-Rad).

MitoCa^{2+} measurements

To measure mitoCa^{2+} using mito-SP-linker-GCaMP6m, named mt-riG6m, cultured cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) with 1.5 µg of pCDNA3.1 mt-riG6m 2 days before imaging. Twenty-four hours before the experiments, transfected cells were plated in FluoroDish™ FD35-100. The cells were stimulated with 10 µM LPA in PBS containing 2 mM $CaCl_2$. Time-lapse images were acquired using epifluorescence microscopy (Nikon). mt-riG6m and miGer were gifts from Li et al.[58]

ER Ca^{2+} store depletion was quantified by transfecting parental and MICU2-KO HCT116 cells with red miGer[58] using Lipofectamine 48 h prior to imaging. Cells expressing miGer were then excited at 552 nm and relative ER Ca^{2+} measurements were recorded through a 20× objective lens. Immediately after identifying R-miGer-positive cells, the bath solution was replaced with nominally Ca^{2+}-free HBSS. One minute into the experiment, the cells were treated with TG (Reference: T7458, Life Technologies, Thermo Fisher).

SOCE measurement by Fura-2 AM

Intracellular Ca^{2+} imaging was performed as described previously.[59,60] Cells were plated in 96-well plates at 2 × 10^4 cells per well 24 h before the experiment. Adherent cells were for loaded with the ratiometric dye Fura2-acetoxymethyl ester (AM; 2 µM) at 37°C for 45 min and then washed with PBS supplemented with Ca^{2+}. During the experiment, the cells were incubated with Ca^{2+}-free physiological saline solution (PSS) solution and treated with 2 µM TG to deplete intracellular store of Ca^{2+}. Ca^{2+} entry was stimulated by injecting 2 mM of $CaCl_2$. Fluorescence emission was measured at 510 nm using the FlexStation-3 (Molecular Devices) with excitation at 340 and 380 nm. The maximum fluorescence (peak of Ca^{2+} influx [F340/F380]) was measured in MICU2 KO cells and compared with the Control cells.

Measurement of oxygen consumption

Seahorse analysis

The cellular oxygen consumption rate (OCR) data were obtained using a Seahorse™ XF96 Flux Analyzer from Seahorse Bioscience (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The experiments were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, HCT116 cells were seeded in XF96 cell culture plates at 2×10^4 cells/well. On the day of analysis, the

culture medium was replaced with XF DMEM (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) supplemented with 2mM glutamine and lacking bicarbonate (pH 7.4). The cells were then incubated at 37°C in a non-CO_2 incubator for 1h. Measurements were made as described in the relevant figure legends. Sequential injection of 10mM glucose, 1µM oligomycin, 100µM dinitrophenol (DNP), and 0.5µM rotenone/antimycin A permitted the determination of the main respiratory parameters. Finally, the data were normalized to the amount of DNA present in the cells and assayed using the Cyquant® Cell Proliferation Assay kit (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The data were acquired with the Seahorse Wave Controller and analyzed with the Seahorse Wave Desktop Software.

Whole cell measurement

The measurements were performed at 37°C under magnetic stirring by placing 2×10^6 cells in a final volume of 2mL of culture medium (RPMI, RPMI without glucose, or RPMI with high glucose) with 10% FBS in an oxygraph (OROBOROS oxygraph-2k). The cells of each line were treated with their respective medium 48h before the experiment. They were then harvested, counted, and centrifuged at 700*g* for 3min. The cell pellet was suspended in 5 mL of selected medium with FBS and centrifuged at 800*g* for 2min. The resulting residual pellet was then resuspended in 500µL of selected medium with SVF (cell solution used for the oxygenation measurement). The resuspended cells were added to 1.5mL of different medium with FBS already present in the measuring tank. As soon as a steady slope was obtained, the oxygen consumption was measured. OXPHOS was then inhibited by adding oligomycin (an ATP synthase inhibitor; 5.25µg/mL); the respiration rate obtained corresponds the energy wasting state. Successive additions of FCCP (a protonophoric uncoupler; 0.8µM) were then made until the maximum respiration rate was reached. Finally, 2µM antimycin A was added to determine non-mitochondrial oxygen consumption.

Measurement of permeabilized cells

Measurements were performed at 37°C—with agitation, in a final volume of 2 mL of respiration buffer with BSA and different [Ca^{2+}] (0, 500 nM, 1 µM and 8.4 µM) with 3×10^6 cells (OROBOROS oxygraph-2k) previously permeabilized with digitonin. The cells of each line were detached with trypsin, counted and centrifuged at 700*g* for 3min. The pellet was suspended in 1mL of ASB-free respiration buffer and the plasma membrane was permeabilized by adding digitonin (1mg/mL previously heated at 95°C for 2.5min) (6µL per 1×10^6 HCT116 cells). The whole set was gently shaken for 2 min. Then, 4 mL of respiration buffer (10 mM KH_2PO_4, 300mM mannitol, 10mM KCl, 5mM $MgCl_2$, and 1mM EGTA, pH 7.4 at 37°C) with ASB fatty acid free was added to stop the action of digitonin. The mixture was centrifuged at 800*g* for 2min. The resulting pellet was then resuspended in 500µL of respiration buffer with BSA (solution for oxygen measurement). The cells resuspended in the respiration buffer with BSA were added to the measuring cell containing 1.5mL of respiration buffer with BSA. As soon as a steady slope was obtained, succinate (10mM) and ADP (1.5mM) were added and the oxygen consumption related to ATP synthesis was determined. OXPHOS was then inhibited by adding

oligomycin (5.25µg/mL). Once the oxygen consumption stabilized, FCCP (0.8µM) was added until the maximum respiration was reached. Cytochrome *c* was added, to control the integrity of the outer mitochondrial membrane and then 2µM antimycin A was added to inhibit complex III.

Expression of super complexes

For supercomplex assembly analyses, mitochondria were enriched by using differential centrifugation, according to a slightly modified version of the method described by Bonnet et al.[61] Briefly, the cell pellets were incubated for 10 min on ice with cold digitonin (4mg/mL in PBS [v/v] or 0.2% w/v) to dissolve cell membranes. Then, digitonin was diluted by adding cold PBS (5% v/v). Cells were centrifugated at 10,000*g* for 10min at 4°C to recover the mitochondria-enriched fraction. The pellet was washed once more in 1mL of cold PBS, centrifuged (10,000*g* at 4°C), resuspended at 10 mg/mL in AC/BT buffer (1.5M aminocaproic acid and 75mM Bis-Tris/HCl, pH 7.0, supplemented with Complete Mini Protease Inhibitor [Roche Diagnostics, Stockholm, Sweden]), and kept frozen at -80°C until analysis. For blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) analyses, 50µg of each sample was diluted at 2mg/mL in AC/BT buffer and mitochondrial membrane proteins were solubilized by incubation with 6g/g protein digitonin (1.2% w/v) for 10min at 4°C. After centrifugation at 20,000*g* for 20min at 4°C, the supernatant was collected, and 5% Serva Blue G dye (Bio-Rad) in 1M aminocaproic acid/50mM Bis–Tris/HCl, pH7.0 was added (1/20 v/v) prior to loading. Respiratory chain complexes and supercomplexes were separated on Native PAGE Novex 3%–12% Bis-Tris gels (Invitrogen) for approximatively 3 h and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) in cold blotting buffer (25mM Tris, 192mM glycine, pH 8.3, and 20% methanol). Membranes were hybridized using dedicated monoclonal antibodies (NDUFS2 rabbit monoclonal, SDHA rabbit monoclonal, UQCRC2 mouse monoclonal, MT-CO1 (COX1) mouse monoclonal, Abcam, the Netherlands). Acquisitions were performed using the Odyssey FC imaging system and analysed using Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences).

Mitochondrial enzymatic activities

The activities of complex I (NADH ubiquinone reductase) and citrate synthase (CS) were measured at 37°C with a UVmc2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco) in a mitochondria-enriched fraction. Cells were resuspended in cell buffer (250mM saccharose, 20mM tris[hydroxymethyl]aminomethane, 2mM EGTA, 1mg/mL BSA, pH 7.2; 1×10^6 cells per 50µL), disrupted by two freeze-thaw cycles, washed, and centrifuged at 16000*g* for 1min to eliminate the cytosolic fraction. For complex I and V analyses, cells were further resuspended in the cell buffer (1×10^6 cells per 250µL) and sonicated (six times × 5s) on ice. The activities of respiratory chain complex activities were measured according to standard routine clinical protocols for CI (NADH:ubiquinone reductase, NUR),[62] complex II (succinate:ubiquinone reductase, SUR), Complex III (ubiquinol:cytochrome *c* reductase, UCCR), Complex IV (cytochrome *c* oxidase,

COX)[63], Complex V (F1-ATPase), and CS[63]. The protein content was determined with the bicinchoninic assay kit (Uptima, Interchim, Montluçon, France) using BSA as the standard.

PDH activity assays

The PDH activity of MICU2 KO cells was measured with the colorimetric PDH Assay Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions.

Acetyl-CoA ratio measurement assay

The acetyl-CoA content of the cell culture medium was determined with the Acetyl-CoA Assay Kit (Reference: ab87546, Abcam) according to the manufacturer's instructions.

Lactate production

Lactate production was assessed with the L-Lactic Acid Colorimetric Assay Kit (Reference: E-BC-K044-S, Elabscience, Texas, USA) according to the manufacturer's instructions.

Fatty acid oxidation activity

Visualization of fatty acid oxidation in the HCT116 Control and KO MICU2 cells lines treated with FAOBlue (Funakoshi, Japan) in HEPES-buffered saline (HBS) buffer with or without pre-treatment with etomoxir (20µM, 3h), a potent fatty acid oxidation inhibitor. After FAOBlue incubation, blue fluorescence (excitation 405nm, emission 430–480nm) was observed.

Detection of ROS

A total of 1×10^6 cells were stained for 10min at 37°C with 5 µM DCFDA and then washed and analysed by flow cytometry (excitation ~492–495nm, emission 517–527nm) to detect cytosolic ROS. Mitochondria-derived ROS were detected in 1×10^6 cells stained at 37°C for 10min with 5µM MitoSOX (DHE). After staining, the cells were washed and analysed by flow cytometry (excitation 510nm, emission 580nm). The cells were analysed immediately after completing staining.

Statistical analysis

The data are presented as the mean ± standard error of the mean and were analyzed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis was performed with a paired Mann–Whitney test, the Kruskal–Wallis test, or analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's, Dunn's, or Sidak's multiple comparisons test. The exact tests are indicated in the figure legends. A p-value <0.05 was considered significant.

SUPPLEMENTAL

Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

Primers	Forward	Reverse
MFN2	TGAGAGGCATCAGTGAGGTG	GCAGAACTTTGTCCCAGAGC
OPA1	AATCGGACCCAAGAACAGTG	ACTCCTCGGGATTCAAGGTT
FIS1	GGAGGACCTGCTGAAGTTTG	ACGATGCCTTTACGGATGTC
DRP1	GGAACAGCGAGATTGTGAGG	CCTTTGGCACACTGTCTTGA
PFKFB1	ACATGGAAGCCCTGCAAAT	GGCTGAGATAGTTGTGAACATCC
PFKFB2	ATCTCTCGGGGTGCCCTAT	TGCATAGGTCATCTCTTCACACA
PFKFB3	CAACAGCTTTGAGGAGCATGT	GGGAGCCTTTCATGTTTTGT
PFKFB4	CCAGATGAAGAGGACAATCCA	TCCTCGTAGGTCATTTCCTCA
PDK1	CACCAAGACCTCGTGTTGAG	ACGTGATATGGGCAATCCAT
PDK2	CTGGCCAACATCATGAAAGA	CCAGGAGGCTCTGGACATAC
PDK3	TGTGTGAACAGTATTACCTGGTAGC	GTTTGTCTGGCGCTTTGG
PDK4	CAGTGCAATTGGTTAAAAGCTG	GGTCATCTGGGCTTTTCTCA
PDP1 var 1	ATGTTGTCGGCTCCGTGT	TGGAACTTCTGACTGGGATTC
PDP1 var 5	TCGGGAAGAATCGTTTGGT	AAAAACAGTTGAGTTGGTGCTG
PDP2	CTGAGCCTGAGGTCACATACC	AGGCCAGCACAAGGAACTTA
PDPR	GTGGCCTATCACCTCTCCAA	GCCAGCACAGAACCTGGTAG
GCKR	AGATGATATTCGGGCTGCTC	GGCGATGGGTATCACCTGT
DLAT	GGGTGAGAAGCTAAGTGAAGGA	CAGGGACCAGGATTTTTGC
DLD	CCCAGAGGTAGAATTCCAGTCA	GAGCCAGCATTGGACCAG
PDHA1	GTCCGAGAGGCAACAAGGT	AAGTCTGCAGCTCCATCAGG
PDHB	CGGATAGAGGACACGACCA	GTCCAGTGAAAGCGCCTCT
DERA	CTGCGGGCCATTAGAGATT	AGAGAGCCAAGCAAGGGAAT

G6PD	GCAAACAGAGTGAGCCCTTC	GGCCAGCCACATAGGAGTT
H6PD	GGGTGGAGATCATCATGAAAG	GCGAATGACACCGTACTCCT
PGD	ATTGCTGCAAAAGTGGGAAC	GTTGTGCACCATCTTCACGA
PGLS	GCTGAGGACTACGCCAAGAA	AGGATCAGCAGGTCGAAAAC
PGM1	GATGGACGCGAGCAAACT	GACAGCCCACAGTCCATCTT
PRPS1	GCATTGCTCCAAAATACAGGT	AAGGGACATGGCTGAATAGG
PRPS2	ACACTTGCGGCACCATCT	TCCCATGGGTAAGGATAGCA
RBKS	CTACAGGAACTGCTTCTATAATTGTCA	TCAGATCCTCCGTATTCAAAAGT
RPE	CGATGGTGGAGTAGGTCCTG	AGCACTGCCAGACACAATCA
RPIA	TCATCGTGATCGCTGATTTC	GATGACCTCGATGGGGATT
TALDO1	CAGATGCCCGCTTACCAG	TTTAATCTGGTCCTCTTGTGACC
TKT	GGATGACCAGGTGACCGTTA	CGCGGATGTTGATCTTTTCT
UCP2 Blast 1	AAGGGGATCGGGCCATGATA	GAGCTGGGTTGCAGGATGTT
UCP2 Blast 2	CAAAGCCGGCTGGGTCTTAT	ACTGAGAAGGCTCAGGCAAA
UCP3 long	AGCCCCCTCGACTGTATGAT	ACTTTCATCAGGGCCCGTTT
UCP3 Short	AGCCCCCTCGACTGTATGAT	AGGAGGCTCACCCCTTGTAG
PRMT1 Cell	CCAGTGGAGAAGGTGGACAT	GTCATTCCGCTTCACTTGCA
PRMT1 Blast	CGCGAACTGCATCATGGAGAA	CTGGCCACAGGACACTTCTT
PLIN 2	CCTCCTGTCCAACATCCAAG	GCATTGCGGAACACTGAGTA
PLIN 3	CCACCAATGTGAAGGACCA	GAAGGAGTGGATGCTGGAAA
PLIN 4	AATGAGCAACTTCGGAGCAC	CACCGTGTGACTTTGGACAG
PLIN 5	CCACAAGCTGGGTTCTTCAC	TGATCCACCTGCCTCAGACT

STAR ★METHODS

REAGENT or RESSOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
MICU2	Abcam	ab101465
MICU1	Sigma	HPA037479
MCU	Abcam	ab272488
OPA1	BD Biosciences	612607
MFN2	Cell signaling	#11925
DRP1 (D8H5)	Cell signaling	#5391
P-DRP1 (S616)	Cell signaling	#3455
NDUFS2	Abcam	ab192022
SDHA	Abcam	ab137040
UQCRC2	Abcam	ab14745
MT-CO1	Abcam	ab14705
Chemicals, peptides and recombinant proteins		
CyQuant	Thermo Fisher Scientific	#35006
Mitotracker	Invitrogen/Molecular Probes	M7514
mt-riG6m	Li et al. 2020 (https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102165)	
miGer	Li et al. 2020 (https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102165)	
Nucleospin RNA plus Kit	Macherey–Nagel	740984-250
PrimeScript RT Reagent Kit	Takara	RR037A
SYBR Green Master kit	Takara	RR420L
Hypoxyprobe kit	Hypoxyprobe	HP1-1000Kit
Fura-2-AM	Thermo Fisher Scientific	#F1221
MitoSox Red	Thermo Fisher Scientific	#M36008
BCA protein assay kit	Thermo Fisher Scientific	#23227
FAOBlue	Funakoshi (Japan)	FDV-0033
Inhibitors		
2-Deoxy-D-glucose	Sigma-Aldrich	D8375
2NBDG	Abcam	ab146200
UK5099	MedChemExpress	HY-15475
Rotenone	TOCRIS	CAS 83-79-4
Oligomycin	Abcam	ab141829
Trimetazidine	Sigma-Aldrich	653322
Etomoxir	Sigma-Aldrich	E1905

Telaglenastat	MedChemExpress	HY-12248
V-9302	MedChemExpress	HY-112683
BAPTA	Sigma-Aldrich	A1076
MITOTEMPO	Sigma-Aldrich	SML0737
Treatments		
5-Fluorouracil	Fluorouracile Accord 50mg/ml	
Oxaliplatin	Oxaliplatine Accord 5mg/ml	
Software		
Image Lab	Bio Rad	
GraphPad Prism 6		
Kaluza 1.3 software	Beckman Coulter	
T-scratch software		
Image 4.4 software	Perkin Elmer	
VisualSonics VevoLAZR System	FUJIFILM	
ImageJ/Fiji		
Metamorph® 7.7	Molecular Devices	
Imaris 8.0®	Bitplane	
SoftMax Pro 4.5.6		
R 4.3.0	R-Cran	

Acknowledgments

The authors acknowledge H2P2 platform for technical assistance for immunohistochemistry analysis (Nicolas Mouchet, Anthony Sébillot, Gevorg Ghukasyan – Université Rennes 1) and PHENOMIN-TAAM-UPS44, CIPA (Alain Le Pape and Sharuja Natkunarajah - Centre d'Imagerie du Petit Animal, part of MOV2ING platform, Orléans) for *in vivo* models. Alison Robert is a recipient of a 3-years doctoral grant from Inserm / Région Centre Val-de-Loire. David Crottès is a recipient of Smart Loire Valley fellowship from Le Studium Loire Valley Institute for Advanced Studies. Thanks to Frederic Picou, member of the LNOx and Jacques Dupuy, INRAe Toxalim, for their help. Thanks to Agathe Brugoux, Oceane Pertegaz, Beatrice Genova, Cyrille Guimaraes and Michelle Pinault members of the N2C, for their technical help.

This project was partly supported by grants on behalf of the following french department committees of Ligue Contre le Cancer "Grand-Ouest": 16 (Charente), 37 (Indre-et-Loire), 49 (Maine-et-Loire), 72 (Sarthe) and 85 (Vendée). We acknowledge Inserm, INCa, Université de Tours and Région Centre-Val de Loire for their financial supports.

Inserm UMR 1069 is leader of Cancéropôle Grand-Ouest 3MC network (Marine Molecules, Metabolism and Cancer), member of Région Centre – Val de Loire thematic research consortium RTR MOTIVHEALTH (Molecular and Technological Innovation for Health) and member of CNRS research group APPICOM (GDR2082 - Integrative Approach for a multiscale functional analysis of membrane proteins). Alison Robert, Maxime Guéguinou, Arnaud Chevrollier, Naig Gueguen, Jean-François Dumas and William Raoul are also members of Meetochondrie French network.

Ethics:

Animal experimentation: This study was performed in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All of the animals were handled according to approved institutional animal care and use committee (authorisation Apafis 19933, regional ethical committee CEEA – 003 CNRS, Orleans) protocol. Every effort was made to minimize animal suffering.

Author contributions:

M.G. designed the project. A.R, D.C. J.B, I.D, A.C, N.G., M.G. performed cell culture experiments. A.R., J.B., S.S., J.F.D., C.G., M.P. performed metabolic experiments. D.C, S.C performed bioinformatics analyses. A.R., D.C., W.R. M.G. wrote the manuscript, and all authors contributed to revision and edits. Funding Acquisition: T.L., C.V., W.R., M.G..

Declaration of interests :

The authors have no conflicts of interest to declare.

1. Monteith, G.R., Prevarskaya, N., and Roberts-Thomson, S.J. (2017). The calcium-cancer signalling nexus. Nat Rev Cancer *17*, 367–380. 10.1038/nrc.2017.18.
2. Marchi, S., Giorgi, C., Galluzzi, L., and Pinton, P. (2020). Ca2+ Fluxes and Cancer. Molecular Cell *78*, 1055–1069. 10.1016/j.molcel.2020.04.017.
3. Vasan, N., Baselga, J., and Hyman, D.M. (2019). A view on drug resistance in cancer. Nature *575*, 299–309. 10.1038/s41586-019-1730-1.
4. Glancy, B., and Balaban, R.S. (2012). Role of Mitochondrial Ca $^{2+}$ in the Regulation of Cellular Energetics. Biochemistry *51*, 2959–2973. 10.1021/bi2018909.
5. McCormack, F.X., Fisher, J.H., Suwabe, A., Smith, D.L., Shannon, J.M., and Voelker, D.R. (1990). Expression and characterization of rat surfactant protein A synthesized in Chinese hamster ovary cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression *1087*, 190–198. 10.1016/0167-4781(90)90204-F.
6. McCormack, J.G., and Denton, R.M. (1993). Mitochondrial Ca2+ transport and the role of intramitochondrial Ca2+ in the regulation of energy metabolism. Dev Neurosci *15*, 165–173. 10.1159/000111332.
7. Wescott, A.P., Kao, J.P.Y., Lederer, W.J., and Boyman, L. (2019). Voltage-energized calcium-sensitive ATP production by mitochondria. Nat Metab *1*, 975–984. 10.1038/s42255-019-0126-8.
8. De Stefani, D., Patron, M., and Rizzuto, R. (2015). Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1853*, 2006–2011. 10.1016/j.bbamcr.2015.04.008.
9. Pathak, T., and Trebak, M. (2018). Mitochondrial Ca2+ signaling. Pharmacology & Therapeutics *192*, 112–123. 10.1016/j.pharmthera.2018.07.001.
10. Garg, V., Suzuki, J., Paranjpe, I., Unsulangi, T., Boyman, L., Milescu, L.S., Lederer, W.J., and Kirichok, Y. (2021). The mechanism of MICU-dependent gating of the mitochondrial Ca2+uniporter. eLife *10*, e69312. 10.7554/eLife.69312.
11. Liu, Y., Jin, M., Wang, Y., Zhu, J., Tan, R., Zhao, J., Ji, X., Jin, C., Jia, Y., Ren, T., et al. (2020). MCU-induced mitochondrial calcium uptake promotes mitochondrial biogenesis and colorectal cancer growth. Sig Transduct Target Ther *5*, 59. 10.1038/s41392-020-0155-5.
12. Wu, W., Shen, Q., Zhang, R., Qiu, Z., Wang, Y., Zheng, J., and Jia, Z. (2020). The structure of the MICU 1- MICU 2 complex unveils the regulation of the mitochondrial calcium uniporter. The EMBO Journal *39*, e104285. 10.15252/embj.2019104285.
13. Plovanich, M., Bogorad, R.L., Sancak, Y., Kamer, K.J., Strittmatter, L., Li, A.A., Girgis, H.S., Kuchimanchi, S., De Groot, J., Speciner, L., et al. (2013). MICU2, a Paralog of MICU1, Resides within the Mitochondrial Uniporter Complex to Regulate Calcium Handling. PLoS ONE *8*, e55785. 10.1371/journal.pone.0055785.
14. Kamer, K.J., and Mootha, V.K. (2014). MICU 1 and MICU 2 play nonredundant roles in the regulation of the mitochondrial calcium uniporter. EMBO Reports *15*, 299–307. 10.1002/embr.201337946.
15. Patron, M., Checchetto, V., Raffaello, A., Teardo, E., Vecellio Reane, D., Mantoan, M., Granatiero, V., Szabò, I., De Stefani, D., and Rizzuto, R. (2014). MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca2+ Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity. Molecular Cell *53*, 726–737. 10.1016/j.molcel.2014.01.013.

16. Vultur, A., Gibhardt, C.S., Stanisz, H., and Bogeski, I. (2018). The role of the mitochondrial calcium uniporter (MCU) complex in cancer. Pflugers Arch *470*, 1149–1163. 10.1007/s00424-018-2162-8.
17. Wu, W., Shen, Q., Zhang, R., Qiu, Z., Wang, Y., Zheng, J., and Jia, Z. (2020). The structure of the MICU1-MICU2 complex unveils the regulation of the mitochondrial calcium uniporter. EMBO J *39*, e104285. 10.15252/embj.2019104285.
18. Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., and Pozzan, T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca2+ responses. Science *280*, 1763–1766. 10.1126/science.280.5370.1763.
19. Lawrie, A.M., Rizzuto, R., Pozzan, T., and Simpson, A.W. (1996). A role for calcium influx in the regulation of mitochondrial calcium in endothelial cells. J Biol Chem *271*, 10753–10759. 10.1074/jbc.271.18.10753.
20. Szabadkai, G., Simoni, A.M., Bianchi, K., De Stefani, D., Leo, S., Wieckowski, M.R., and Rizzuto, R. (2006). Mitochondrial dynamics and Ca2+ signaling. Biochim Biophys Acta *1763*, 442–449. 10.1016/j.bbamcr.2006.04.002.
21. Jans, R., Mottram, L., Johnson, D.L., Brown, A.M., Sikkink, S., Ross, K., and Reynolds, N.J. (2013). Lysophosphatidic Acid Promotes Cell Migration through STIM1- and Orai1-Mediated Ca2+i Mobilization and NFAT2 Activation. J Invest Dermatol *133*, 793–802. 10.1038/jid.2012.370.
22. Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., and Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. Redox Biol *6*, 260–271. 10.1016/j.redox.2015.08.010.
23. Osellame, L.D., Blacker, T.S., and Duchen, M.R. (2012). Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab *26*, 711–723. 10.1016/j.beem.2012.05.003.
24. I, E., and E, O. (1979). Ca2+-induced activation of succinate dehydrogenase and the regulation of mitochondrial oxidative reactions. Journal of biochemistry *85*. 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132331.
25. Rajput, P., and Krishnamurthy, S. (2023). Standardization and validation of novel ex-vivo method for mitochondrial bioenergetics using mitochondrial modulators. J Pharmacol Toxicol Methods *119*, 107209. 10.1016/j.vascn.2022.107209.
26. Song, Z., Wei, B., Lu, C., Li, P., and Chen, L. (2017). Glutaminase sustains cell survival via the regulation of glycolysis and glutaminolysis in colorectal cancer. Oncol Lett *14*, 3117–3123. 10.3892/ol.2017.6538.
27. Jing, X., Wang, X.-J., Zhang, T., Zhu, W., Fang, Y., Wu, H., Liu, X., Ma, D., Ji, X., Jiang, Y., et al. (2019). Cell-Cycle-Dependent Phosphorylation of PRPS1 Fuels Nucleotide Synthesis and Promotes Tumorigenesis. Cancer Res *79*, 4650–4664. 10.1158/0008-5472.CAN-18-2486.
28. ZHENG, J. (2012). Energy metabolism of cancer: Glycolysis versus oxidative phosphorylation (Review). Oncol Lett *4*, 1151–1157. 10.3892/ol.2012.928.
29. Mallilankaraman, K., Doonan, P., Cárdenas, C., Chandramoorthy, H.C., Müller, M., Miller, R., Hoffman, N.E., Gandhirajan, R.K., Molgó, J., Birnbaum, M.J., et al. (2012). MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca(2+) uptake that regulates cell survival. Cell *151*, 630–644. 10.1016/j.cell.2012.10.011.
30. Patron, M., Granatiero, V., Espino, J., Rizzuto, R., and De Stefani, D. (2019). MICU3 is a tissue-specific enhancer of mitochondrial calcium uptake. Cell Death Differ *26*, 179–195. 10.1038/s41418-018-0113-8.

31. Chakraborty, P.K., Mustafi, S.B., Xiong, X., Dwivedi, S.K.D., Nesin, V., Saha, S., Zhang, M., Dhanasekaran, D., Jayaraman, M., Mannel, R., et al. (2017). MICU1 drives glycolysis and chemoresistance in ovarian cancer. Nat Commun *8*, 14634. 10.1038/ncomms14634.
32. Zhu, J., Zhang, W., Chang, J., Wu, J., Wu, H., Zhang, X., Ou, Z., Tang, T., Li, L., Liu, M., et al. (2023). Identification and Validation of a Mitochondria Calcium Uptake-Related Gene Signature for Predicting Prognosis in COAD. J Cancer *14*, 741–758. 10.7150/jca.81811.
33. Vishnu, N., Hamilton, A., Bagge, A., Wernersson, A., Cowan, E., Barnard, H., Sancak, Y., Kamer, K.J., Spégel, P., Fex, M., et al. (2021). Mitochondrial clearance of calcium facilitated by MICU2 controls insulin secretion. Mol Metab *51*, 101239. 10.1016/j.molmet.2021.101239.
34. Zhao, Y., Wang, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Jin, M., Zhou, F., Jin, C., Zhang, J., Xing, J., Wang, N., et al. (2021). PDE2 Inhibits PKA-Mediated Phosphorylation of TFAM to Promote Mitochondrial Ca2+-Induced Colorectal Cancer Growth. Front Oncol *11*, 663778. 10.3389/fonc.2021.663778.
35. Kowaltowski, A.J., Menezes-Filho, S.L., Assali, E.A., Gonçalves, I.G., Cabral-Costa, J.V., Abreu, P., Miller, N., Nolasco, P., Laurindo, F.R.M., Bruni-Cardoso, A., et al. (2019). Mitochondrial morphology regulates organellar Ca2+ uptake and changes cellular Ca2+ homeostasis. FASEB J *33*, 13176–13188. 10.1096/fj.201901136R.
36. Favaro, G., Romanello, V., Varanita, T., Andrea Desbats, M., Morbidoni, V., Tezze, C., Albiero, M., Canato, M., Gherardi, G., De Stefani, D., et al. (2019). DRP1-mediated mitochondrial shape controls calcium homeostasis and muscle mass. Nat Commun *10*, 2576. 10.1038/s41467-019-10226-9.
37. Kamer, K.J., and Mootha, V.K. (2014). MICU1 and MICU2 play nonredundant roles in the regulation of the mitochondrial calcium uniporter. EMBO Rep *15*, 299–307. 10.1002/embr.201337946.
38. Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 566–578. 10.1038/nrm3412.
39. Griffiths, E.J., and Rutter, G.A. (2009). Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics *1787*, 1324–1333. 10.1016/j.bbabio.2009.01.019.
40. Cárdenas, C., Müller, M., McNeal, A., Lovy, A., Jaňa, F., Bustos, G., Urra, F., Smith, N., Molgó, J., Diehl, J.A., et al. (2016). Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca2+ Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. Cell Reports *14*, 2313–2324. 10.1016/j.celrep.2016.02.030.
41. Paupe, V., Prudent, J., Dassa, E.P., Rendon, O.Z., and Shoubridge, E.A. (2015). CCDC90A (MCUR1) Is a Cytochrome c Oxidase Assembly Factor and Not a Regulator of the Mitochondrial Calcium Uniporter. Cell Metabolism *21*, 109–116. 10.1016/j.cmet.2014.12.004.
42. Missiroli, S., Perrone, M., Genovese, I., Pinton, P., and Giorgi, C. (2020). Cancer metabolism and mitochondria: Finding novel mechanisms to fight tumours. EBioMedicine *59*, 102943. 10.1016/j.ebiom.2020.102943.
43. Nenkov, M., Ma, Y., Gaßler, N., and Chen, Y. (2021). Metabolic Reprogramming of Colorectal Cancer Cells and the Microenvironment: Implication for Therapy. Int J Mol Sci *22*, 6262. 10.3390/ijms22126262.
44. Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Zhou, S., et al. (2009). Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. Science *325*, 1555–1559. 10.1126/science.1174229.

45. Zhang, J., Zou, S., and Fang, L. (2023). Metabolic reprogramming in colorectal cancer: regulatory networks and therapy. Cell & Bioscience *13*, 25. 10.1186/s13578-023-00977-w.
46. Gaglio, D., Soldati, C., Vanoni, M., Alberghina, L., and Chiaradonna, F. (2009). Glutamine deprivation induces abortive s-phase rescued by deoxyribonucleotides in k-ras transformed fibroblasts. PLoS One *4*, e4715. 10.1371/journal.pone.0004715.
47. Gaglio, D., Metallo, C.M., Gameiro, P.A., Hiller, K., Danna, L.S., Balestrieri, C., Alberghina, L., Stephanopoulos, G., and Chiaradonna, F. (2011). Oncogenic K-Ras decouples glucose and glutamine metabolism to support cancer cell growth. Molecular Systems Biology *7*, 523. 10.1038/msb.2011.56.
48. Menendez, J.A., and Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer *7*, 763–777. 10.1038/nrc2222.
49. Jiang, P., Du, W., Wang, X., Mancuso, A., Gao, X., Wu, M., and Yang, X. (2011). p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Nat Cell Biol *13*, 310–316. 10.1038/ncb2172.
50. Zeng, F., Chen, X., Cui, W., Wen, W., Lu, F., Sun, X., Ma, D., Yuan, Y., Li, Z., Hou, N., et al. (2018). RIPK1 Binds MCU to Mediate Induction of Mitochondrial Ca2+ Uptake and Promotes Colorectal Oncogenesis. Cancer Res *78*, 2876–2885. 10.1158/0008-5472.CAN-17-3082.
51. Wang, Y.-N., Zeng, Z.-L., Lu, J., Wang, Y., Liu, Z.-X., He, M.-M., Zhao, Q., Wang, Z.-X., Li, T., Lu, Y.-X., et al. (2018). CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis. Oncogene *37*, 6025–6040. 10.1038/s41388-018-0384-z.
52. Tomar, D., Jaña, F., Dong, Z., Quinn, W.J., Jadiya, P., Breves, S.L., Daw, C.C., Srikantan, S., Shanmughapriya, S., Nemani, N., et al. (2019). Blockade of MCU-Mediated Ca2+ Uptake Perturbs Lipid Metabolism via PP4-Dependent AMPK Dephosphorylation. Cell Rep *26*, 3709-3725.e7. 10.1016/j.celrep.2019.02.107.
53. Sun, L., Suo, C., Li, S., Zhang, H., and Gao, P. (2018). Metabolic reprogramming for cancer cells and their microenvironment: Beyond the Warburg Effect. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer *1870*, 51–66. 10.1016/j.bbcan.2018.06.005.
54. Tomar, D., Thomas, M., Garbincius, J.F., Kolmetzky, D.W., Salik, O., Jadiya, P., Joseph, S.K., Carpenter, A.C., Hajnóczky, G., and Elrod, J.W. (2023). MICU1 regulates mitochondrial cristae structure and function independently of the mitochondrial Ca2+ uniporter channel. Science Signaling *16*, eabi8948. 10.1126/scisignal.abi8948.
55. Sheffer, M., Bacolod, M.D., Zuk, O., Giardina, S.F., Pincas, H., Barany, F., Paty, P.B., Gerald, W.L., Notterman, D.A., and Domany, E. (2009). Association of survival and disease progression with chromosomal instability: A genomic exploration of colorectal cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 7131–7136. 10.1073/pnas.0902232106.
56. Guéguinou, M., Ibrahim, S., Bourgeais, J., Robert, A., Pathak, T., Zhang, X., Crottès, D., Dupuy, J., Ternant, D., Monbet, V., et al. (2022). Curcumin and NCLX inhibitors share anti-tumoral mechanisms in microsatellite-instability-driven colorectal cancer. Cell Mol Life Sci *79*, 284. 10.1007/s00018-022-04311-4.
57. Raes, F., Badiane, S.M., Renoux, B., Papot, S., Lerondel, S., and Le Pape, A. (2020). Development of an embedded multimodality imaging platform for onco-pharmacology using a smart anticancer prodrug as an example. Sci Rep *10*, 2661. 10.1038/s41598-020-59561-8.
58. Li, J., Wang, L., Chen, Y., Yang, Y., Liu, J., Liu, K., Lee, Y.-T., He, N., Zhou, Y., and Wang, Y. (2020). Visible light excited ratiometric-GECIs for long-term in-cellulo monitoring of calcium signals. Cell Calcium *87*, 102165. 10.1016/j.ceca.2020.102165.

59. Emrich, S.M., Yoast, R.E., Xin, P., Zhang, X., Pathak, T., Nwokonko, R., Gueguinou, M.F., Subedi, K.P., Zhou, Y., Ambudkar, I.S., et al. (2019). Cross-talk between N-terminal and C-terminal domains in stromal interaction molecule 2 (STIM2) determines enhanced STIM2 sensitivity. J Biol Chem *294*, 6318–6332. 10.1074/jbc.RA118.006801.
60. Zhang, X., Pathak, T., Yoast, R., Emrich, S., Xin, P., Nwokonko, R.M., Johnson, M., Wu, S., Delierneux, C., Gueguinou, M., et al. (2019). A calcium/cAMP signaling loop at the ORAI1 mouth drives channel inactivation to shape NFAT induction. Nat Commun *10*, 1971. 10.1038/s41467-019-09593-0.
61. Bonnet, C., Augustin, S., Ellouze, S., Bénit, P., Bouaita, A., Rustin, P., Sahel, J.-A., and Corral-Debrinski, M. (2008). The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1783*, 1707–1717. 10.1016/j.bbamcr.2008.04.018.
62. Desquiret-Dumas, V., Leman, G., Wetterwald, C., Chupin, S., Lebert, A., Khiati, S., Le Mao, M., Geffroy, G., Kane, M.S., Chevrollier, A., et al. (2019). Warburg-like effect is a hallmark of complex I assembly defects. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease *1865*, 2475–2489. 10.1016/j.bbadis.2019.05.011.
63. Medja, F., Allouche, S., Frachon, P., Jardel, C., Malgat, M., de Camaret, B.M., Slama, A., Lunardi, J., Mazat, J.P., and Lombès, A. (2009). Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. Mitochondrion *9*, 331–339. 10.1016/j.mito.2009.05.001.

II. Résultats complémentaires

Détermination de la capacité des lignées KO MICU2 à utiliser β-oxydation des AG pour la production d'ATP mitochondrial

Nous avons démontré une accumulation de gouttelettes lipidiques dans les lignées cellulaires KO MICU2, ainsi qu'une absence d'effet des inhibiteurs de la β-oxydation sur la viabilité cellulaire des lignées KO MICU2 (figure 5C et 5F de notre article « Encoding of the colorectal cancer metabolic program through MICU2 »). Par conséquent, nous avons voulu étudier si les lignées cellulaires KO MICU2 étaient capables sans autre choix possible d'utiliser la voie de la β-oxydation pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. Pour cela, nous avons mesuré le flux d'oxygène cellulaire des lignées cellulaires contrôle et KO MICU2 en absence de glucose et en présence d'acide oléique. L'etomoxir a été utilisé pour inhiber la β-oxydation afin de déterminer la consommation d'oxygène liée à la production d'ATP médiée par les acides gras. Par la suite, nous avons voulu regarder si un défaut de la voie de la β-oxydation était présent, d'où il venait et si c'était un défaut de la β-oxydation ou du transport des acides gras par les carnitines. Pour cela, nous avons évalué la viabilité cellulaire dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2 en absence de glucose supplémenté d'acide oléique avec un traitement à la carnitine.

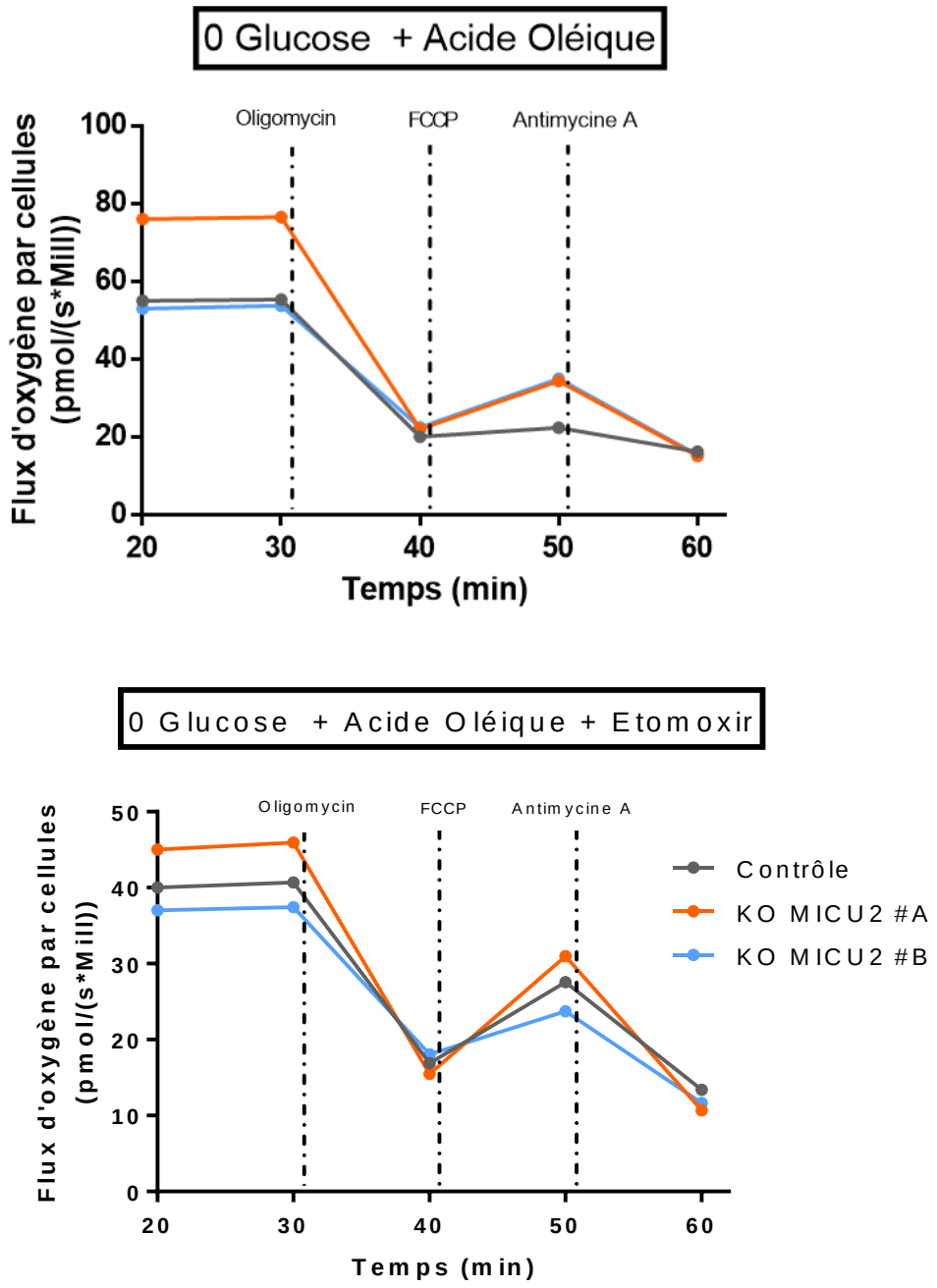


Figure 29 : Consommation d'oxygène mitochondriale dans les lignées cellulaire contrôle et KO MICU2 en absence de glucose supplémenté en acide oléique avec ou sans traitement à l'etomoxir

Graphique montrant les taux de consommation d'oxygène des lignées cellulaires KO MICU2 et contrôle après injections séquentielles d'oligomycine, de FCCP et d'antimycine A, en l'absence de glucose supplémenté en acide oléique (graphique du haut) en l'absence de glucose supplémenté en acide oléique (50 µM) avec un traitement de 6 heures à l'etomoxir (graphique du bas)

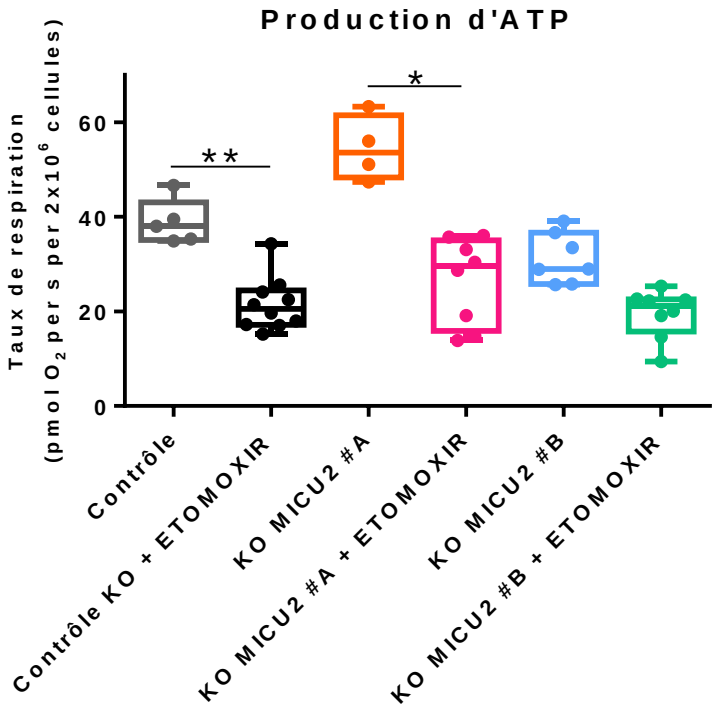


Figure 30 : Production d'ATP mitochondriale médiée par l'utilisation d'acide gras dans les lignées cellulaire contrôle et KO MICU2

*Boxplot représentant la production d'ATP dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2 en l'absence de glucose complété par de l'acide oléique avec ou sans traitement à l'etomoxir N = 4 à 8 *p<0,05, **p<0,01 (Kruskal-Wallis et tests post hoc).*

Nous n'observons pas de différence significative dans la consommation d'oxygène liée à la production d'ATP dépendante de la β-oxydation dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2 #A. Nous pouvons noter que les cellules KO MICU2 #B ont une consommation d'oxygène liée à la production d'ATP médiée par les acides gras réduite. Le traitement sous etomoxir montre que les lignées contrôle et KO MICU2 ont une consommation d'oxygène liée à la production d'ATP diminuée du fait que la bêta-oxydation est inhibée par l'etomoxir.

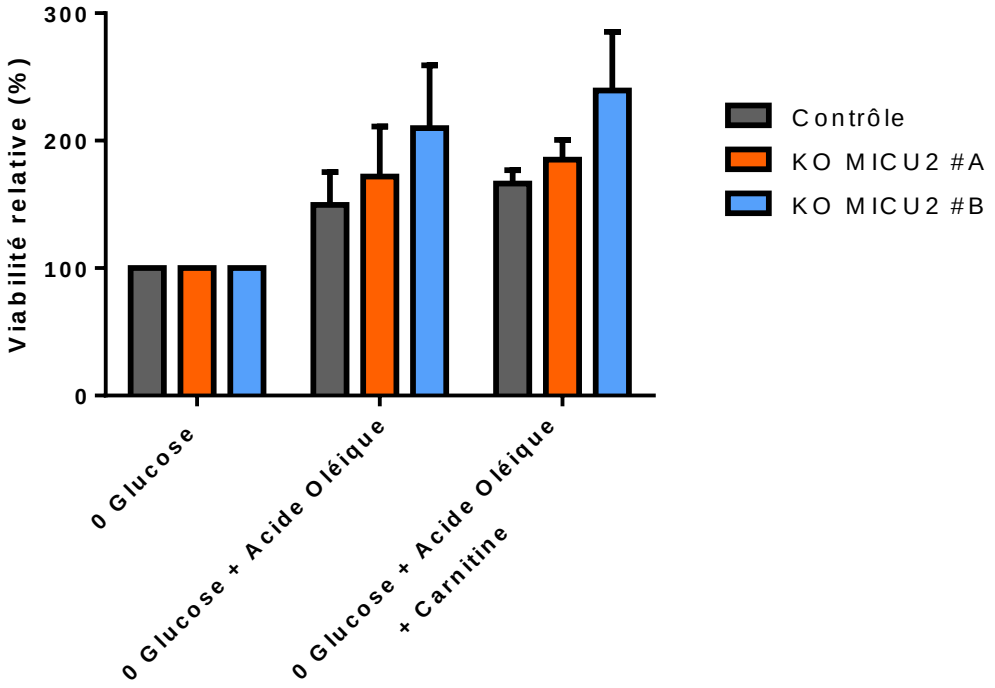


Figure 31 : Viabilité cellulaire des cellules contrôle et KO MICU2 avec ou sans carnitine

Histogramme représentant le pourcentage de viabilité des lignées cellulaires contrôle et KO MICU2 avec un milieu sans glucose supplémenté en acide oléique avec ou sans carnitine. Les barres d'erreur représentant l'erreur standard (N = 4).

De plus, en présence d'acide oléique et en l'absence de glucose, la viabilité cellulaire n'est pas modifiée entre les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2, la viabilité cellulaire n'est pas non plus modifiée avec ajout de carnitine. L'ensemble de ces résultats suggère que la voie des acides gras n'est pas la voie énergétique préférentielle des cellules KO MICU2 et que la perte de MICU2 pourrait légèrement modifier l'activité de la β-oxydation, mais qu'en l'absence d'un autre choix de carburant énergétique, elles peuvent l'utiliser.

L'expression de MICU2 ne joue pas sur la composition lipidique en acide gras

L'unité N2C a démontré il y a quelques années qu'un enrichissement en acide gras oméga 3 (DHA et/ou EPA) dans un régime alimentaire permettait d'augmenter l'efficacité de la radiothérapie ou des chimiothérapies (Colas et al. 2004). Ici, nous avons voulu établir si la présence ou l'absence de MICU2 pouvait être un élément impactant les compositions lipidiques membranaires. Précédemment, nous avons démontré par marquage à l'huile rouge (marqueur des lipides neutres) une augmentation des gouttelettes lipidiques dans les K0 MICU2, Pour aller plus loin nous avons analysé s'il y avait une variation de la masse totale des lipides dans les KO MICU2 ou si la composition en AG était modifiée les (acides gras à chaine longue, des acides gras saturés et mono-insaturés, omégas 3 et 6).

Tableau VIII : Analyse de la masse des acides gras

1er tableau : représente le pourcentage de la masse des acides gras a chaîne longue (moyenne et écart-type), des acides gras saturés et insaturés dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. 2d tableau : représente le pourcentage des acides gras saturés et mono-insaturés, avec le pourcentage d'oméga 3 et d'oméga 6 dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2.

	Contrôle		KO MICU2 #A		KO MICU2 #B	
Acide gras	**Moyenne**	**Ecart type**	**Moyenne**	**Ecart type**	**Moyenne**	**Ecart type**
14:0	2,35	0,131	3,729	0,422	3,043	0,145
15:0	0,291	0,028	0,33	0,049	0,401	0,045
16:0	25,749	1,068	25,11	0,718	26,338	0,946
17:0	0,388	0,031	0,379	0,064	0,453	0,075
18:0	11,134	0,253	10,06	0,417	10,471	1,04
20:0	0,597	0,126	0,635	0,095	0,628	0,075
22:0	0,97	0,22	0,945	0,181	0,968	0,135
23:0	0,132	0,021	0,117	0,012	0,158	0,037
24:0	1,081	0,183	1,369	0,129	1,697	0,163
14:1	0,049	0,002	0,056	0,028	0,056	0,026
15:1	0,074	0,015	0,073	0,011	0,101	0,007
16:1	6,285	0,614	6,34	0,497	5,867	0,241
17:1	0,579	0,095	0,618	0,073	0,725	0,034

18:1	35,838	0,963	32,468	0,961	30,505	1,823
20:1	2,442	0,245	2,315	0,178	2,031	0,114
22:1	0,306	0,105	0,325	0,036	0,285	0,039
24:1	0,927	0,153	0,753	0,134	0,75	0,194
18:2n-6	2,583	0,146	2,744	0,13	2,782	0,121
18:3n-6	0,304	0,066	0,261	0,026	0,295	0,055
20:2n-6	0,263	0,03	0,238	0,015	0,302	0,036
20:3n-6	0,569	0,064	0,578	0,043	0,685	0,072
20:4n-6	2,2	0,345	2,309	0,501	2,851	0,435
22:2n-6	0,041	0,006	0,065	0,012	0,067	0,024
22:4n-6	0,135	0,017	0,143	0,026	0,171	0,052
18:3n-3	0,092	0,011	0,076	0,008	0,08	0,016
20:3n-3	0,095	0,031	0,091	0,038	0,089	0,027
20:5n-3	0,41	0,081	0,46	0,04	0,521	0,099
22:5n-3	0,599	0,081	0,62	0,119	0,721	0,14
22:6n-3	0,999	0,122	1,186	0,1	1,319	0,197
pics identifiés	95,43		93,47		93,89	
pics non identifiés	4,57		6,53		6,11	

	Contrôle		**KO MICU2 #A**		**KO MICU2 #B**	
	Moyenne	**Ecart-type**	**Moyenne**	**Ecart-type**	**Moyenne**	**Ecart-type**
% saturés	42,144	1,172	42,673	0,702	43,953	0,985
% mono-insaturés	45,513	1,595	42,021	1,347	39,507	1,390
% oméga 6	6,014	0,447	6,338	0,483	6,537	1,530
% oméga 3	2,195	0,166	2,433	0,246	2,730	0,301
oméga 3 / oméga 6	0,365	0,016	0,385	0,047	0,445	0,148
oméga 6 / oméga 3	2,742	0,120	2,626	0,323	2,437	0,746

L'analyse de masse des acides gras à chaîne longue et le pourcentage d'acide gras saturés et mono-instaurés ainsi que la masse des omégas 3 et 6 n'a révélé aucune différence dans la composition lipidique entre les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2.

Caractérisation du facteur de transcription impliqué dans la reprogrammation métabolique et la biogenèse mitochondriale des KO MICU2

Plusieurs facteurs de transcriptions participent à la reprogrammation métabolique dans le cadre du développement des cancers. HIF1α et Myc sont les facteurs de transcriptions les plus connus dans ces processus (Stine et al. 2015; Nagaraju et al. 2015). L'oncogène MYC est un facteur de transcription avec de nombreuses fonctions affectant les activités cellulaires telles que le cycle cellulaire, l'apoptose, la réponse aux dommages à l'ADN, la glycolyse et la reprogrammation métabolique. La dérégulation de MYC peut donner lieu à une variété de cancers. Le facteur de transcription HIF1α est un facteur inductible par l'hypoxie, fortement impliqué dans la reprogrammation métabolique vers la glycolyse. Les acteurs de la signalisation calcique mitochondriale (MCU et NCLX) sont décrits comme des possibles modulateurs de ces facteurs de transcriptions dans le cancer du sein ou du côlon (Pathak et al. 2020; Tosatto et al. 2016).

En parallèle de ces éléments, nous avons étudié le rôle de MICU2 sur l'expression des facteurs de transcriptions responsables de la biogenèse mitochondriale. Dans le CCR un lien entre MTFA et MCU a été proposé. Ainsi, l'absorption de calcium mitochondrial par MCU, inhibe la phosphorylation de MTFA et améliore la biogenèse mitochondriale dans le CCR (Liu et al, 2020).

Le co facteur de transcription PGC1α est le régulateur majeur de la biogenèse mitochondriale, et peut aussi réguler la respiration mitochondriale (Tiraby and Langin 2005). PGC1α a été décrit comme central dans la dissémination des métastases via la biogenèse mitochondriale et l'OXPHOS des cellules cancéreuses, en effet la suppression de PGC1α entraîne une diminution de la biogenèse mitochondriale, de l'OXPHOS et de la dissémination des métastases (LeBleu et al. 2014).

Afin de compléter nos travaux présentés en amont dans cette thèse nous avons investigué l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la reprogrammation métabolique et la mitogenèse mitochondriale dans nos lignées KO MICU2. Pour cela nous avons analysé en absence de MICU2, l'expression de c-Myc, par immunofluorescence dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2 (*cf* figure 32 et 33). Nous avons aussi étudié le facteur inductible par

l'hypoxie HIF1α (*cf* figure 34). Enfin nous avons évalué la biogenèse mitochondriale, par mesure d'expression des facteurs MTFA et PGC1α par RT-qPCR (*cf* figure 35 et 36).

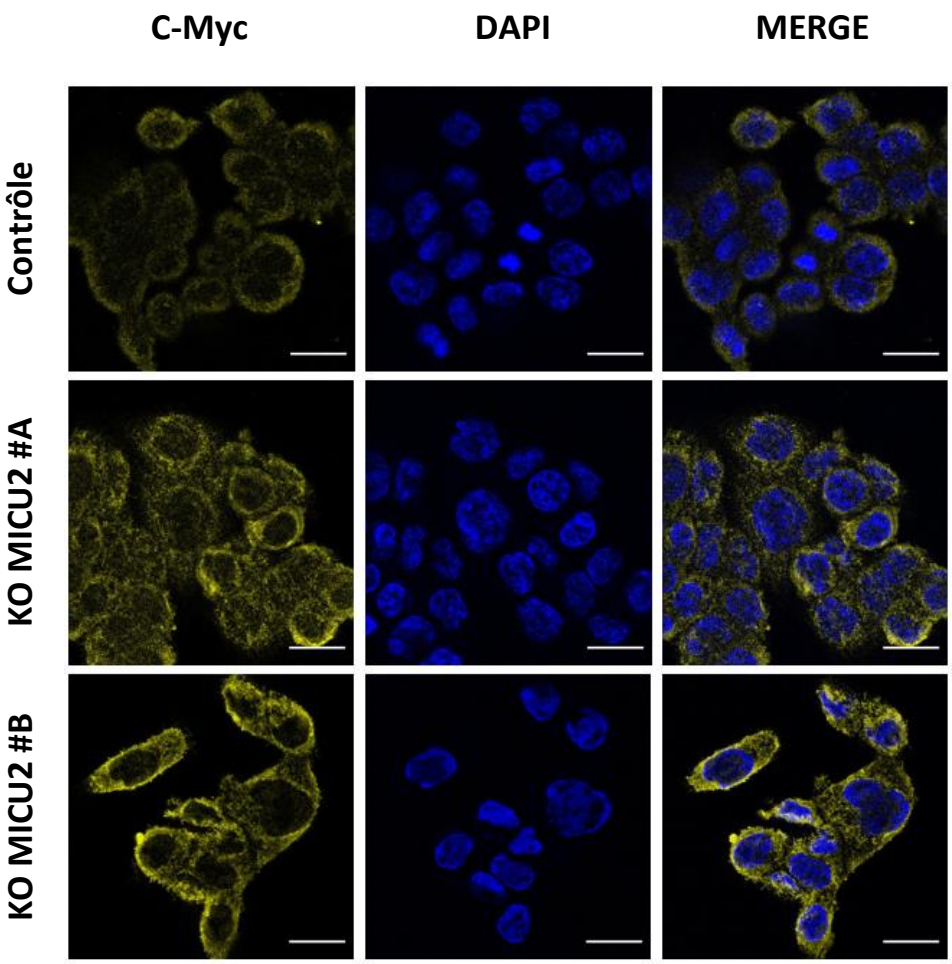


Figure 32 : Analyse de l'expression de Myc par immunofluorescence

Les noyaux des cellules ont été marqués avec du DAPI, puis les cellules ont été marqués à l'aide d'un anticorps fluorescent C-MYC. Les lames ont ensuite été montée à l'aide du milieu de montage : antifade SlowFade Gold (Molecular Probes™ P36961). Barre d'échelle : 10 µm

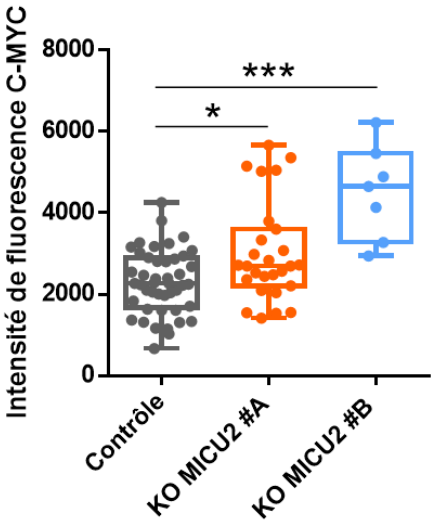


Figure 33 : Analyse de l'intensité de fluorescence de c-Myc

*Quantification de l'intensité de fluorescence de c-Myc dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. N = 7 à 45 cellules, *p<0,05, ***p<0,001 (Kruskal-Wallis et test post hoc).*

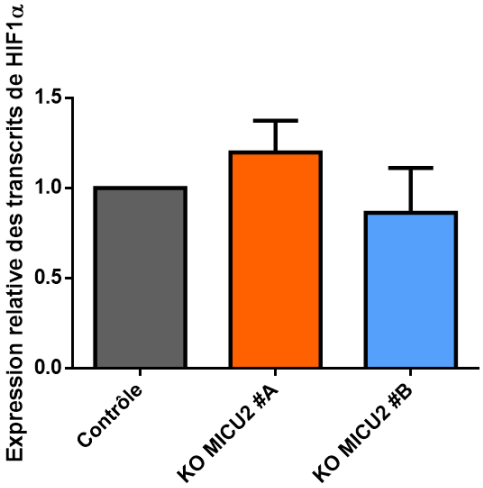


Figure 34 : Analyse de l'expression des transcrits de HIF1α

L'expression des transcrits du gène HIF1α *a été obtenu par RT-qPCR dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (N = 3).*

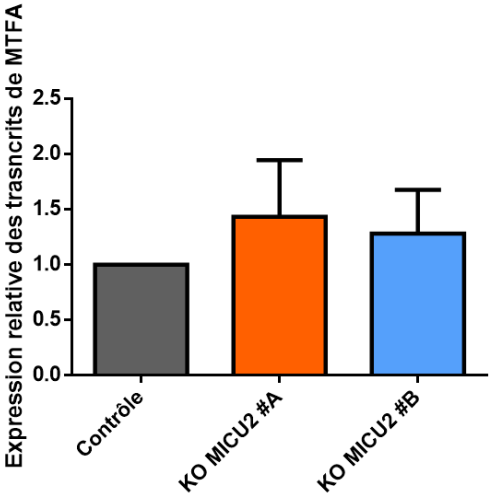


Figure 35 : Analyse de l'expression des transcrits de MTFA

L'expression des transcrits du gène MTFA a été obtenu par RT-qPCR dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (N = 3).

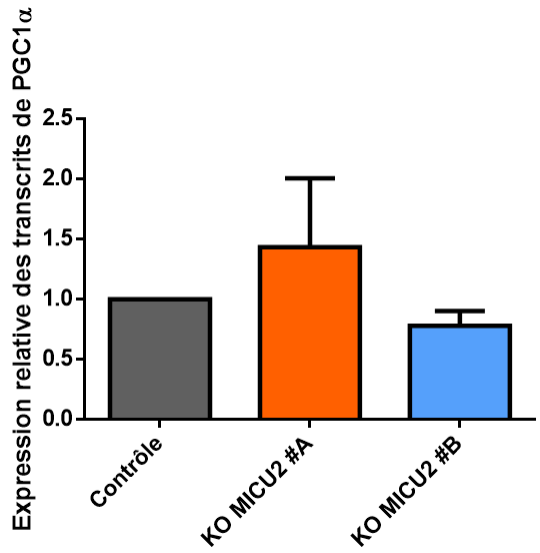


Figure 36 : Analyse de l'expression des transcrits de PGC1α

L'expression des transcrits du gène PGC1α a été obtenu par RT-qPCR dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (N = 3).

Par analyse d'immunofluorescence nous avons pu révéler une augmentation de l'expression de c-Myc dans les lignées contrôle et KO MICU2. Il a été démontré que c-Myc pouvait se conduire comme un oncogène, en stimulant la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses lors d'une surexpression ou de mutations (Sipos, Firneisz, and Műzes 2016). La surexpression de c-Myc dans le côlon participe à la tumorigenèse du CCR (Sipos, Firneisz, and Műzes 2016). Ces résultats ne sont pas en accord avec notre étude sur la prolifération cellulaire, puisqu'avec nos résultats précédents, nous avons démontré une diminution de la prolifération dans les lignées cellulaire KO MICU2, nous aurions dû nous attendre à une diminution de l'expression de c-Myc. Cependant, les résultats sur Myc dans nos lignée KO MICU2 semblent en accord avec une reprogrammation métabolique d'une glycolyse aérobie vers une glycolyse anaérobie. **Des études plus précises notamment par blocage de la voie Myc ou une suppression de celui-ci par siRNA permettraient de mieux déterminer son rôle éventuel dans la prolifération ou la reprogrammation métabolique.**

Nos résultats sur les transcrits de HIF1α, MTFA et PGC1α n'ont révélé aucune différence significative entre nos lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. Ces résultats sont à prendre avec précaution puisque nous n'avons pas d'analyse en immunofluorescence ou en Western Blot pour évaluer l'expression protéique pour ces 3 facteurs de transcription. A la différence de MCU les KO MICU2 ne particpent pas à la biogenèse mitochondriale dans le CCR.

Il est cependant nécessaire de souligner que des expériences de mesurant l'expression de HIF1α en Western blot sont encore nécessaire pour exclure définitivement son implication dans la reprogrammation des lignées KO MICU2.

La perte de MICU2 entraine un changement de potentiel de membrane mitochondrial

Le potentiel de membrane mitochondrial est un élément déterminant de la régulation de l'activité de la chaine respiratoire et de la production d'ATP (Zorova et al. 2018). Précédemment nous avons montré que les lignées cellulaires KO MICU2 avaient une réduction de l'influx calcique mitochondriale et une production d'ATP réduite. Les mesures de manière non quantitative du potentiel de membrane mitochondriale par utilisation d'une sonde fluorescente : l'ester éthylique de tétraméthylrhodamine, appelé aussi TMRE (Hough et al. 2019).

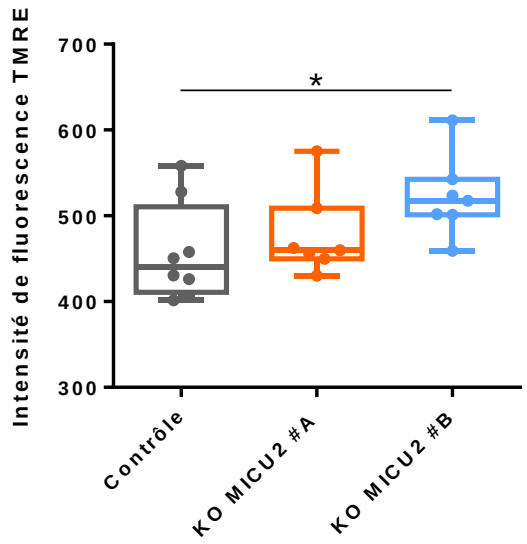


Figure 37 : Analyse du potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la sonde fluorescente TMRE

Boxplot représentant l'intensité de fluorescence du TMRE, évaluant le potentiel de membrane mitochondrial des lignées cellulaires contrôle et KO MICU2, N = 7 et 8
**p<0,05 (Kruskal-Wallis et tests post hoc)*

Nous démontrons une augmentation du potentiel de membrane dans la lignée cellulaire KO MICU2 #B et aucune modification dans les KO MICU2 #A. Le potentiel de membrane mitochondrial est essentiel pour maintenir la production d'ATP, par la CRM. De manière intéressante, l'augmentation du potentiel de membrane mitochondriale associée à une plus grande hyperpolarisation membranaire ne semble pas etre un élément pouvant améliorer la production d'ATP mitochondrial dans les KO MICU2 B (figure 5A de notre article « Encoding of the colorectal cancer metabolic program through MICU2 »).

L'inhibition de l'APMK affecte moins la viabilité des lignées cellulaires KO MICU2 comparée à la viabilité de la lignée cellulaire contrôle

Nous avons démontré une diminution de la production d'ATP dans les lignées cellulaires KO MICU2. Il a été rapporté que les changements de concentration en AMP et ATP sont les principaux régulateurs de l'activité de l'AMPK (Ke et al. 2018). L'AMP peut être produite lors de la synthèse de l'ATP. Nous nous sommes donc demandé si en raison de la diminution de la production d'ATP, la quantité d'AMP est augmenté pour activer la voie de l'AMPK. L'activité de l'AMPK est élevée dans les cellules souches cancéreuses colorectales (Guo et al. 2018). Nous avons donc évalué les conséquences du blocage de l'AMPK sur la viabilité cellulaire des lignées contrôle et KO MICU2.

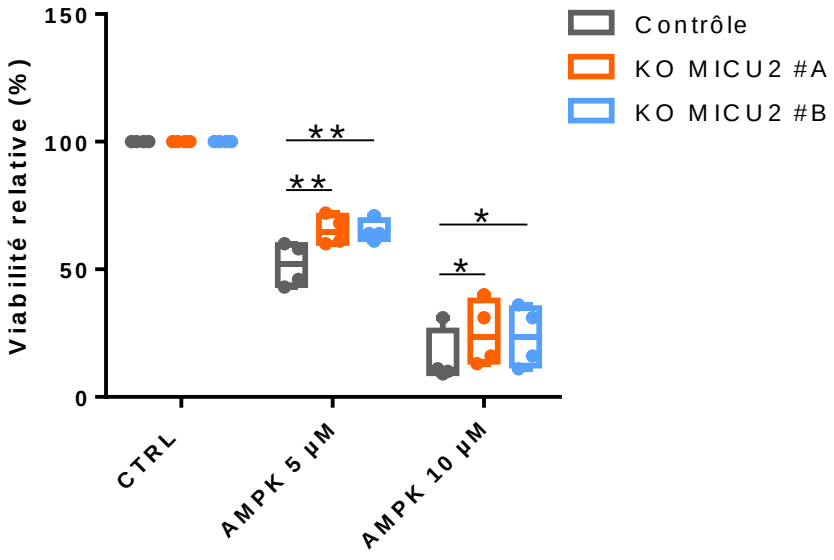


Figure 39 : Viabilité cellulaire des lignées contrôle et KO MICU2 en présence de l'inhibiteur de l'AMPK

*Pourcentage de viabilité des cellules contrôle et KO MICU2 en présence de l'inhibiteur de l'AMPK à des concentrations de 5 µM et 10 µM après 48 heures de traitement N = 4 *p<0,05 **p<0,01 (ANOVA et tests post hoc).*

Lorsque l'on inhibe l'AMPK, les lignées cellulaires KO MICU2 survivent mieux que la lignée cellulaire contrôle. Nous pouvons émettre l'hypothèse que les lignées cellulaires KO MICU2 utilisent moins l'AMPK pour proliférer. Mais nous sommes surpris de ce résultat, car si les KO MICU2 ont moins d'ATP, nous pouvons imaginer que la présence d'AMP est plus élevée, mais cela ne semble pas être le cas, il sera donc nécessaire de réaliser d'autres expériences pour établir s'il y a un lien entre MICU2 et l'AMPK notamment par mesure d'expression en Western blot ou des mesures de l'activité enzymatique de l'AMPK.

Conclusion générale et perspectives

Le but de mes travaux de thèse était d'étudier le rôle des protéines régulatrices de l'absorption du Ca^{2+} mitochondrial : les MICUs dans le CCR. Nos travaux se sont centrés plus particulièrement sur le rôle de la protéine MICU2 dans la carcinogénèse colique et son rôle effecteur dans le contrôle de la signalisation calcique mitochondriale et le métabolisme énergétique. Nous avons essentiellement utilisé des lignées cellulaires HCT116 KO MICU2 et des analyses de data set pour réaliser ces travaux. Nos résultats suggèrent un rôle crucial de MICU2 dans la régulation de l'absorption du Ca^{2+} mitochondrial dans le CCR ainsi que dans le maintien d'éléments capitaux pour le fonctionnement mitochondrial (l'intégrité du réseau mitochondrial, l'assemblage, le fonctionnement normal et optimisé de la CRM). Ainsi, MICU2 parait être un élément pivot de la balance énergétique glycolyse et OXPHOS au cours de la progression du CCR.

Rôle des acteurs du complexe MCU dans le CCR

L'expression du complexe MCU a été décrite comme liée à l'agressivité du CCR. En effet, l'expression des transcrits et l'expression protéique par marquage l'immunhistochimique démontrent une augmentation d'expression de MCU dans les tumeurs et également que son expression est de mauvais pronostic chez les patients atteints de CCR (Y. Liu et al. 2020). De plus, cette même équipe a montré que l'expression des transcrits de MICU1 était significativement diminuée dans les tissus tumoraux coliques (Y. Liu et al. 2020).

Nous avons évalué les expressions des transcrits de MICU1 et MICU2 dans les tissus tumoraux coliques comparés aux tissus sains grâce aux données TCGA. Fait intéressant, l'expression des transcrits de MICU1 a révélé une diminution dans les cellules tumorales comparées aux cellules normales, ce résultat vient conforter les données obtenues dans les travaux de l'équipe de Liu et al. De même, l'analyse TCGA sur l'expression des transcrits des acteurs du complexe MCU suivant les différents stades de la maladie suggère une augmentation significative de l'expression de MICU2 dans les tumeurs agressives du côlon (stade IV) par rapport aux tumeurs de stades inférieurs. A l'inverse, les expressions de MICU1, MCU et MCUb

révèlent une diminution significative dans les tumeurs du côlon de stade IV comparés aux tumeurs de stades inférieurs.

Dans une autre cohorte (GSE41252) comprenant des tumeurs primaires mais aussi des échantillons de CCR métastatiques au niveau du foie et du poumon, nous avons observé que l'expression des transcrits de MICU1 est régulée à la baisse alors que l'expression des transcrits de MICU2 est significativement régulée à la hausse dans les métastases hépatiques du CCR.

De plus, nous démontrons une expression protéique significativement plus élevée de MCU dans les lignées tumorales de CCR par rapport à une lignée cellulaire épithéliale colorectale non tumorale NCM356 et une expression protéique de MICU1 et MICU2 augmentée dans les lignées cellulaires tumorales les plus agressives par rapport aux lignées cellulaires moins agressives et à la lignée non tumorale.

Ces résultats sur l'expression protéique de ces acteurs sont légèrement contradictoires pour certains d'entre eux avec les résultats obtenus par analyse transcriptomique. Dans les années à venir, il semble important de déterminer en parallèle les variations d'expression transcriptomique ou protéomique des acteurs du complexe MCU, les influx calciques mitochondriaux des tumeurs coliques comparés aux influx calciques des tissus coliques non tumoraux adjacents. Ce type d'expérience réalisé par utilisation d'un macroscope à fluorescence pourra nous renseigner fonctionnellement sur l'augmentation ou la diminution de l'activité de l'uniporteur dans le contexte tumoral.

Ces dernières années, des études ont proposé l'utilisation du ratio de certaines composantes de l'uniporteur MCU.

Le rapport MICU1/MCU a été décrit comme régulateur physiologique du phénotype d'absorption mitochondriale du Ca^{2+} dans les tissus cardiaques (Paillard et al. 2017). Cependant, ce ratio MICU1/MCU n'a pas de sens d'un point de vue électrophysiologique car le ratio d'une protéine régulatrice sur son canal peut paraître étrange. Dans ce travail, il nous a semblé pertinent de prendre le ratio des protéines régulatrices de MCU comme représentation de l'activité de MCU. Nous avons effectué l'analyse du ratio MICU2/MICU1 dans la base de données TCGA. L'expression des transcrits suggère une augmentation significative de l'expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tumeurs du côlon atteints de CCR de stade IV par rapport aux tumeurs de stades inférieurs. Dans la cohorte GSE41252,

l'expression des transcrits du ratio MICU2/MICU1 est augmentée dans les métastases hépatiques du CCR comparées aux tumeurs primaires et aux tissus sains.

Nous avons également choisi d'analyser le ratio MICU2/MICU1 dans la base TCGA en fonction des tumeurs primaires de différents cancers, dans l'ordre d'importance du ratio (*cf* figure 40). De manière intéressante, le cancer du côlon et le cancer du rectum sont les cancers pour lesquels le rapport MICU2/MICU1 est le plus élevé. L'expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tissus normaux est moindre par rapport aux tumeurs primaires du CCR (résultats obtenus l'aide d'une autre base de données (GTEX pour Genotype-Tissue Expression) (*cf* figure 41). En conséquence, nous pouvons suspecter que la modulation du ratio MICU2/MICU1 est un élément central dans la progression du CCR en participant la fois à l'initiation tumorale ainsi qu'au développement métastatique

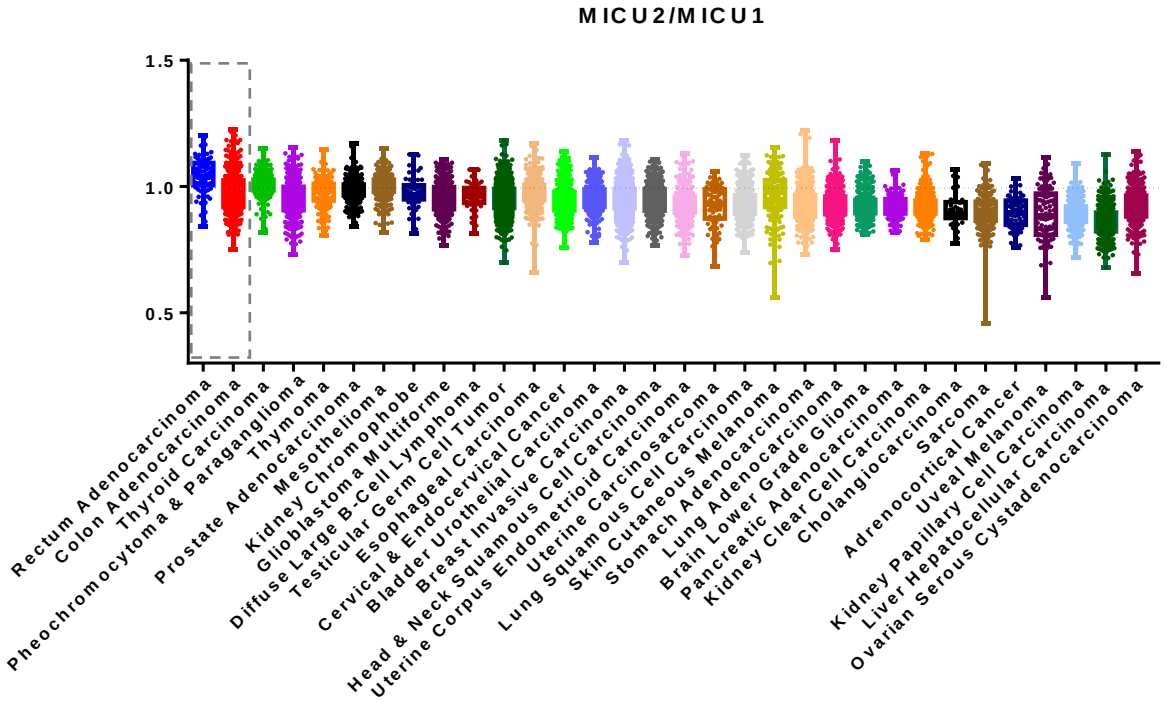


Figure 40 : Expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tumeurs primaires de différents cancer

Différence du niveau d'expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tumeurs primaires issues de différent types de cancer. Les expressions de MICU2 et de MICU1 ont été obtenues à partir des données de transcriptomique publiées et rendues publiques par le consortium The Cancer Genome Atlas (https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga).

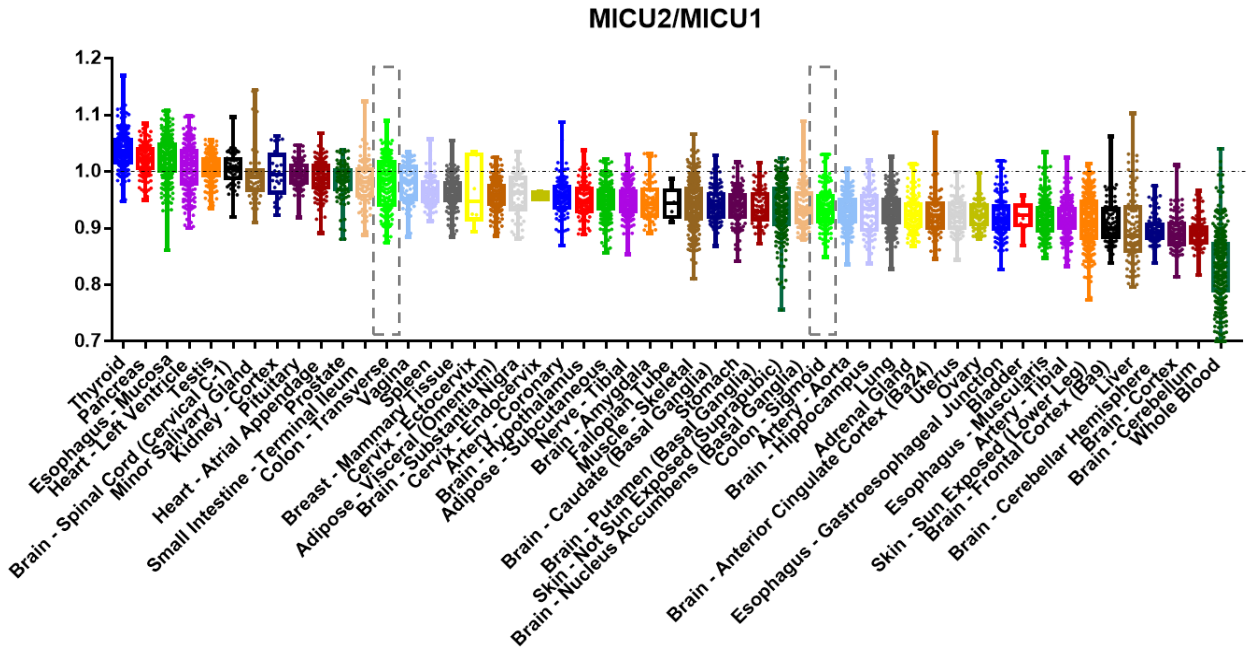


Figure 41 : Expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tissus normaux

Différence du niveau d'expression du ratio MICU2/MICU1 dans les tissus normaux. Les expressions de MICU2 et de MICU1 ont été obtenues à partir des données de transcriptomique publiées et rendues publiques par le consortium The Cancer Genome Atlas (https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga).

Rôle de MICU2 dans la régulation de l'homéostasie calcique

La stœchiométrie de MICU1 et MICU2 module l'influx de Ca^{2+} médié par l'uniporteur MCU (Wu et al. 2020a). Il a été démontré que l'absence de MICU1 augmentait l'absorption de Ca^{2+} mitochondriale (Mallilankaraman et al. 2012). Le rôle de MICU2 dans la régulation de l'activité de MCU dépend de son interaction avec MICU1 et également de la fixation du Ca^{2+} sur ses domaines EF (Wu et al. 2020b). Le rôle régulateur de MICU2 dans la régulation des flux calciques mitochondriaux est assez controversé, en effet certaines études démontrent que l'absence de MICU2 augmente la quantité de calcium intra-mitochondrial (Payne et al. 2017; Patron et al. 2014), alors que d'autres études démontrent que MICU2 réduit l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial (Vishnu et al. 2021). Un autre élément majeur venant ajouter de la complexité dans la compréhension des rôles des protéines MICU1 et MICU2 est que non seulement l'expression de MICU2 dépend principalement de MICU1, puisque la perte

d'expression de MICU1 entraîne la diminution d'expression de la protéine MICU2, mais également que la protéine MICU2 ne peut jouer son rôle de régulateur de pore de MCU sans la présence de MICU1 (Kamer and Mootha 2014; Patron et al. 2014). Ainsi les études montrant l'implication de MICU1 dans les influx calciques mitochondriaux par utilisation de technique d'invalidation moléculaire (KO ou shRNA) ont des conséquences directes sur MICU2. A contrario, la perte de MICU2 n'affecte pas l'expression ou la fixation de MICU1 sur MCU.

Nous avons évalué l'effet de la délétion de MICU2 sur l'ensemble des composantes de l'homéostasie calcique (Ca^{2+} mitochondrial, Ca^{2+} du RE et conséquences sur le Ca^{2+} cytosolique et l'influx SOCE. Nous avons démontré que la perte de MICU2 induisait une diminution de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial et une augmentation de la libération des réserves calciques du RE sans modifier le SOCE.

MICU2 serait donc un régulateur essentiel dans l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial pouvant affecter les contacts et les échanges calciques RE-mitochondries.

Perspectives sur le potentiel rôle de MICU2 sur les MAMs

Les échanges de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie ont lieu dans les MAMs grâce à la protéine dépendante du glucose GRP75 (Honrath et al. 2017). Nous avons démontré un rôle de MICU2 dans les flux calciques mitochondriaux et RE ainsi que la dynamique mitochondriale.

Nous pouvons proposer que MICU2 soit potentiellement un élément structural important au niveau des MAMs afin de stabiliser le transfert et la quantité de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie. **Les études des interactions physiques entre VDAC1 et MICU2 pourraient etre intéressantes du fait de leur proximité géographique. Nous avons également montré le rôle de MICU2 dans la stabilisation du réseau mitochondrial et la fragmentation mitochondriale. De ce fait, l'expression de MICU2 pourrait permettre l'optimisation des zones de contact RE-mitochondries. Pour ce faire, nous proposons d'étudier les distances RE-mitochondries dans les lignées contrôle et KO en microscopie électronique ou confocale. Des analyses en PLA (Proximal Ligation Assay) entre VDAC et les IP_3R pourraient nous donner des informations sur le nombre de points de contact RE-mitochondries. L'utilisation par transfection des sondes BRET Merlin (utilisées dans notre article en annexe II) pourrait aussi nous donner des réponses intéressantes sur la fonction de MICU2 dans les MAMs.**

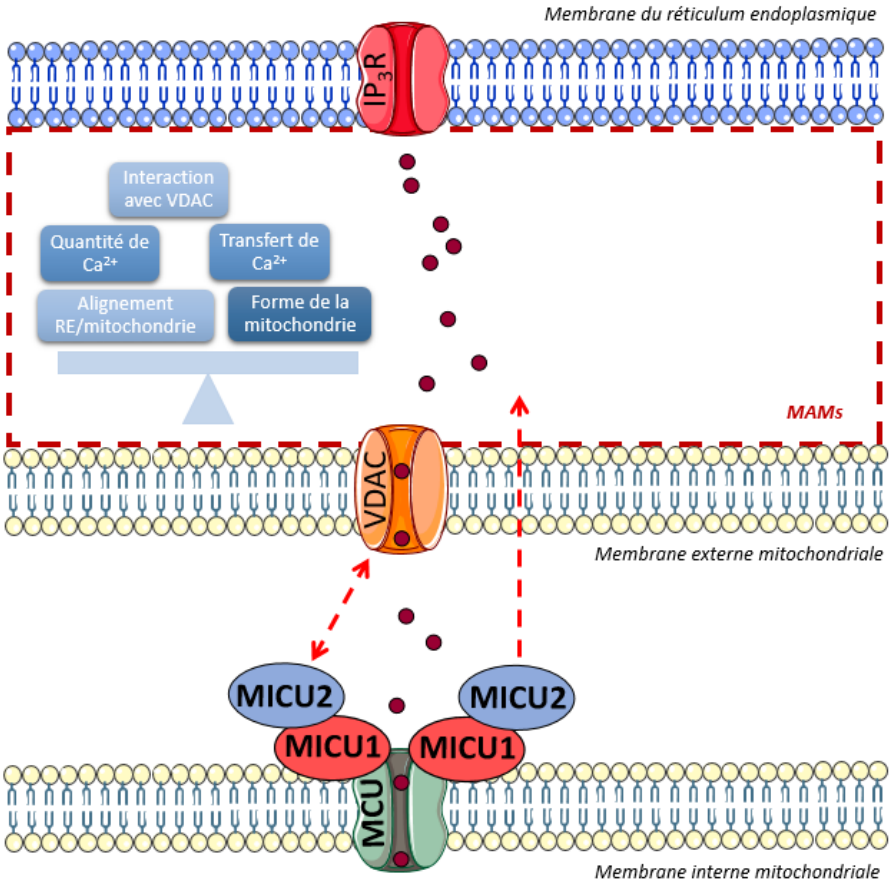


Figure 42 : Modèles proposés sur le potentiel rôle de MICU2 au sein des MAMs

Rôle de MICU2 et des variations calciques cytosoliques sur l'activité de la chaîne respiratoire

L'analyse de la variation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique sur la respiration mitochondriale a révélé que la perte de MICU2 entraînait la réduction de l'OXPHOS (état III) uniquement pour des concentrations de Ca^{2+} cytosolique proches de O. L'analyse a également montré la diminution du rapport de contrôle respiratoire (RCR) pour des concentrations de Ca^{2+} cytosoliques élevées (1 et 8,4 µM) et pour une absence de Ca^{2+}. Ces résultats suggèrent une réduction de la capacité OXPHOS, probablement due à l'activation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTP) pour des concentrations de Ca^{2+} extra-physiologiques.

A l'inverse, nous avons montré que, pour une concentration physiologique de Ca^{2+} cytosolique (150 nM) le RCR est diminué dans les cellules KO MICU2, ce qui suggère la réduction de la capacité OXPHOS, et un potentiel rôle de MICU2 sur l'optimisation de la respiration mitochondriale sous des concentrations physiologiques de Ca^{2+} cytosolique.

Le succinate s'incorpore après l'action des déshydrogénases sensibles au Ca^{2+}. **Il serait intéressant d'évaluer la consommation d'oxygène à l'aide de pyruvate et de malate comme substrats, ce qui permettrait également d'inclure la PDH, puisque le malate s'incorpore juste avant l'action enzymatique de la PDH et que le pyruvate est converti en AcétylCoA par la PDH.** Nous avons montré dans notre étude que l'activité de la PDH était réduite dans les lignées KO MICU2 (*cf* figure 5J de notre article « Encoding of the colorectal cancer metabolic program through MICU2 »), **nous pouvons proposer que contrairement aux expériences avec le succinate qui ont contourné les enzymes du TCA ayant une activité dépendant du Ca^{2+} la différence OXPHOS sera encore plus marquée par utilisation du pyruvate et du malate.**

Implication de MICU2 dans la régulation de la chaîne respiratoire et OXPHOS

Le Ca^{2+} mitochondrial joue un rôle majeur dans la régulation de la production d'ATP, produite par la CRM. Nous avons également observé que les échantillons avec une expression élevée de MICU2 présentent une expression plus élevée des gènes associés à l'assemblage des complexes de la CRM.

De plus, nous avons démontré une réduction de l'assemblage du supercomplexe I_1III_2IV liée à une réduction significative de la quantité et de l'activité du complexe IV.

Une étude récente a indiqué que l'uniporteur MCU pouvait former un complexe avec UCP1 (une protéine découplante présente dans les mitochondries du tissu adipeux brun, responsable de la thermogenèse) agissant comme un « thermoporteur » qui favorise la thermogenèse (Xue et al. 2022). Cette même étude a démontré que MICU1 pouvait diminuer la thermogenèse, en inhibant probablement la formation de complexe MCU-UCP1.

MICU2 pourrait également avoir des effets sur la CRM en dehors de son rôle dans le complexe MCU. Au laboratoire, nous disposons de lignées KO MCU, il serait intéressant de vérifier si, lors de l'absence de MCU, la délétion de MICU2 par siRNA ou shRNA affecte ou non la respiration mitochondriale. Si c'est le cas, alors MICU2 aurait un autre rôle indépendant de l'uniporteur MCU dans la régulation de l'activité de la CRM.

Rôle de MICU2 dans la dynamique mitochondriale

Des changements dans la taille et la forme des mitochondries ont été impliqués dans la régulation de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial. En effet, la régulation de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial peut déréguler l'expression d'OPA1 conduisant ainsi à un déséquilibre de la dynamique mitochondriale. Ainsi, le blocage pharmacologique de MCU avec le Ru360 augmentera la fusion mitochondriale (Guan et al. 2019). Quant à DRP1, sa perte de fonction révèle une augmentation de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial aboutissant à la dérégulation de l'homéostasie calcique (Favaro et al. 2019).

Pour comprendre l'impact de MICU2 sur la morphologie et le réseau mitochondrial, nous avons d'abord évalué le réseau et la taille des mitochondries. Nos résultats ont montré une diminution de la connexion des mitochondries et une augmentation de leur fragmentation après la perte de MICU2.

L'analyse des protéines de la dynamique mitochondriale a montré une augmentation de la fission mitochondriale, par l'augmentation de l'expression protéique du ratio DRP1 phosphorylée (Ser616) sur DRP1 totale.

Ces dernières années, plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude des déplacements des mitochondries dans le cytoplasme. Parmi les acteurs identifiés dans ce mécanisme, nous retrouvons les Rho GTPase mitochondriales (Miro 1 et Miro 2). Ces protéines Miro régulent le transport et l'organisation des mitochondries au niveau des extensions cellulaires, telles que les axones, et, dans certains cas, le transport intercellulaire de l'organite. Ces protéines disposent de deux domaines de liaison au Ca^{2+} du motif EF entrainant une régulation de leur activité GTPasique suivant les variations de concentration de Ca^{2+} cytosolique (Nemani et al. 2018). Nous avons analysé les transcrits des gènes Miro 1 et Miro 2 par RT-qPCR (*cf* figure 42). Nous pouvons observer une tendance à l'augmentation mais non significative dans la lignée cellulaire KO MICU2 #A. Ces résultats restent à confirmer. Les Miro localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale permettent la motilité des mitochondries via les microtubules avec la protéine Milton (Kruppa and Buss 2021), **il serait donc intéressant au regard des variations des transcrits de Miro, d'étudier les conséquences de la présence ou de l'absence de MICU2 sur le déplacement des mitochondries via les microtubules. Pour cela, nous pourrions analyser par imagerie la dynéine et la kinésine, les protéines majeures de la motricité des mitochondries le long des microtubules.**

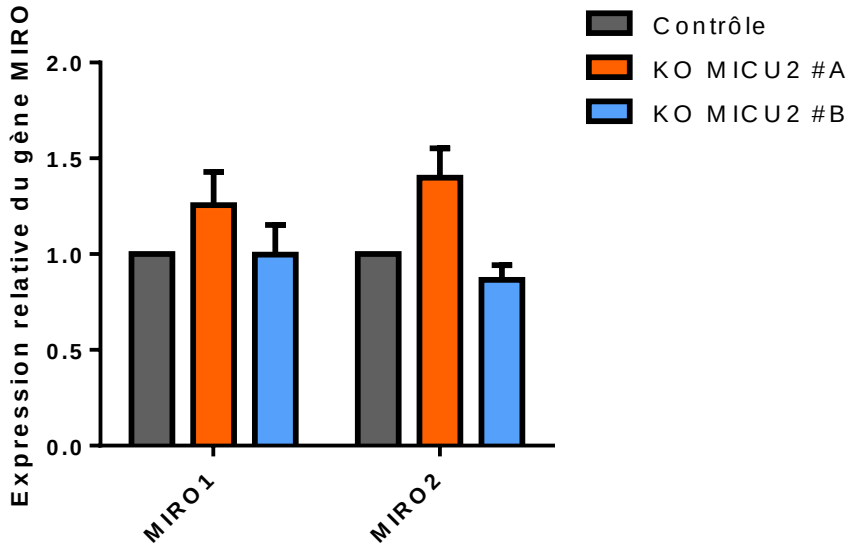


Figure 43 : Expression des transcrits des gènes Miro 1 et Miro 2 par RT-qPCR

Les expressions des transcrits des gènes MIRO 1 et MIRO 2 ont été obtenues par RT-qPCR dans les lignées cellulaires contrôle et KO MICU2. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard (N = 3).

Le complexe MCU joue un rôle important dans la régulation des processus autophagique et mitophagique (C. Liu et al. 2023; Pathak and Trebak 2018). Ces processus sont particulièrement dérégulés dans le cancer et peuvent être associés à des phénomènes de résistance. Dans le cas du CCR, il est proposé que les mécanismes d'autophagie sont impliqués dans la résistance à la chimiothérapie par le 5-FU (Jie Li et al. 2009; Sasaki et al. 2012). En conséquence, l'étude du rôle de MICU2 dans les processus autophagique pourrait être une piste pertinente. Au niveau cellulaire, il existe une autophagie particulière servant à la dégradation des mitochondries que l'on nomme mitophagie. Quelques études montrent l'existence d'un lien entre signalisation calcique mitochondriale et mitophagie (Yu et al. 2021; Kostic et al. 2015). **L'évaluation des voies cellulaires permettant la mitophagie notamment le couple PINK-1/Parkin et les récepteurs de l'autophagie BNIP3 et Nix serait intéressante à mener dans nos lignées KO MICU2. Ces voies pourraient être notamment étudiées par Western Blot pour évaluer les expressions protéiques et en imagerie.**

MICU2 et la biogenèse mitochondriale

L'augmentation de l'absorption calcique mitochondriale due à l'expression élevée de l'uniporteur MCU favorise la biogenèse mitochondriale pour faciliter la prolifération et la migration des cellules du CCR (Liu et al. 2020). Peu de choses sont connues sur l'implication des MICUs dans la biogenèse mitochondriale, nous avons voulu déterminer si la perte de MICU2 pouvait avoir un impact sur MTFA et PGC1α.

MTFA et PGC1α ne semblent pas être affectés au niveau de leur transcrits, à la différence de MCU, dans nos lignées KO MICU2. L'invalidation de MICU2 ne semble donc pas affecter les processus de biogenèse mitochondriale dans le CCR. Ceci est également confirmé par l'absence de différence significative de la quantité de mitochondries entre les cellules contrôles et KO MICU2 (*cf* figure 3 de notre article « Encoding of the colorectal cancer metabolic program through MICU2 »).

Pour aller plus loin, nous avons étudié l'effet de l'expression de MICU2 sur les gènes codant pour les protéines associées à la biogenèse mitochondriale (*cf* figure 43). Nous pouvons observer que MTFA est central dans ce réseau, et est surexprimé dans les tumeurs avec une expression élevée de MICU2. Par conséquent, il serait intéressant de vérifier l'expression protéique de MTFA dans nos lignées KO MICU2. La quantité de mitochondrie n'étant pas différente entre les lignées KO MICU2 et la lignée contrôle, les conséquences de l'invalidation de MTFA sur l'expression des complexes de la CRM semble une piste particulièrement intéressante à étudier.

Les autres protéines surexprimées dans les tumeurs avec une expression élevée de MICU2 sont la protéine CYCS (Cytochrome C somatique) qui joue un rôle dans les complexes de la CRM et TFB2M qui est un facteur de transcription B2 mitochondrial. Nous pouvons nous demander si MICU2 ne joue pas un rôle direct sur la protéine cytochrome C, puisque dans notre étude nous avons démontré une diminution de l'activité et de l'expression du complexe IV après la perte de MICU2. En effet, le cytochrome C est aussi une molécule transporteur d'électrons du complexe IV de la CRM.

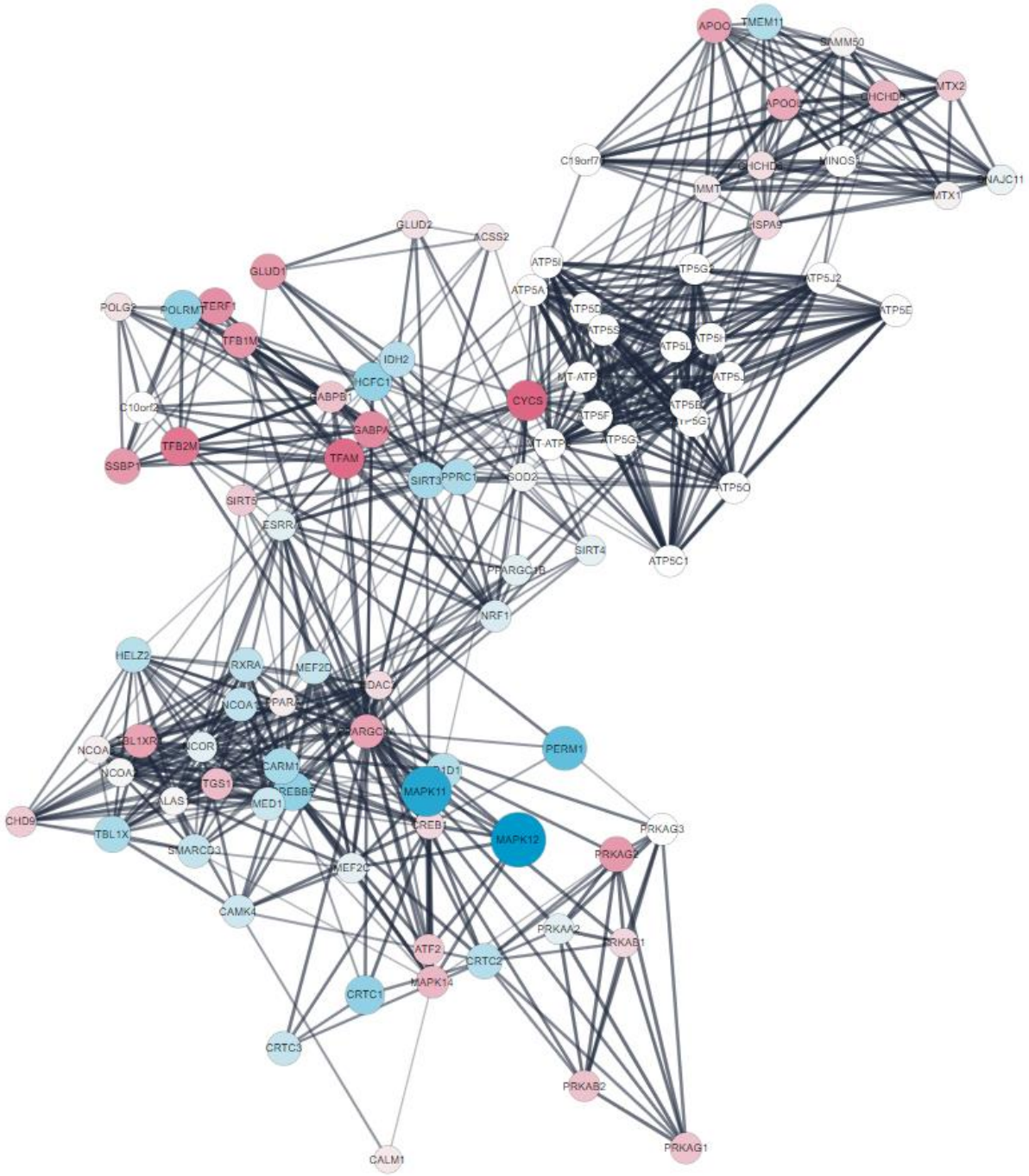


Figure 44 : Effet de l'expression de MICU2 sur la biogenèse mitochondriale

Le réseau d'interactions des protéines associées à la biogenèse mitochondriale a été obtenu par Cytoscape et l'application Stringr. A partir des données du consortium TCGA, nous avons pu comparer les échantillons tumoraux présentant une forte expression de MICU2 avec ceux présentant une expression normale ou faible. Nous avons ainsi défini l'expression différentielle des gènes associée à la biogenèse mitochondriale et représenté les gènes sous-exprimés (en bleu) et ceux surexprimés (en rouge) dans les tumeurs avec une forte expression de MICU2.

Etude des conséquences de l'environnement lipidique de MCU sur le fonctionnement de MICU2

Les cardiolipines joue un rôle sur la structure et l'activité des différents complexes de la CRM (Vergeade et al. 2016). Elles sont également connues pour réguler la stabilité et l'activité de MCU (Ghosh et al. 2020) et peuvent réguler les interactions des MICU avec le canal MCU (Kamer and Mootha 2014). En effet, les protéines MICU1 et MICU2 présentent une affinité pour les cardiolipines, avec une affinité plus importante pour la protéine MICU2 (Kamer and Mootha 2014). Dans diverses pathologies la quantité de cardiolipine varie (pour revue Ahmadpour et al. 2020). **Il serait intéressant d'étudier l'impact de la modulation de la quantité de cardiolipines sur l'activité de l'uniporteur MCU avec ou sans expression de MICU2. Il serait sans doute important d'établir si MICU2 peut encore se fixer et moduler l'activité du canal MCU en absence de cardiolipine.**

Les conséquences de la perte de MICU2 sur l'orientation métabolique du CCR

Le CCR résulte principalement de l'apparition séquentielle des mutations telles que APC, KRAS, p53 et MYC, qui participent activement à la reprogrammation métabolique (Yun et al. 2009). De plus, l'ensemble des voies métaboliques indispensables à la production d'énergie sous forme d'ATP sont dérégulées dans le CCR (Zhang, Zou, and Fang 2023). Lors de mes travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact que pouvait avoir la protéine MICU2 sur l'utilisation de ces voies métaboliques. La réalisation de ce travail nous a permis de discriminer la voie préférentielle des cellules KO MICU2 dans le CCR.

L'analyse de la voie des lipides a d'abord démontré une accumulation de lipides après la délétion de MICU2, suggérant un stockage abondant ou une utilisation réduite des lipides pour couvrir les besoins énergétiques. En l'absence de MICU2, nous démontrons une diminution de l'utilisation de la voie de la β-oxydation et une diminution de son activité dans le mécanisme de prolifération cellulaire après utilisation d'inhibiteurs spécifiques (etomoxir et trimetazidine).

Le glucose exerce des effets importants sur le métabolisme des cellules tumorales. Une diminution de la production d'ATP mitochondriale implique souvent une augmentation de la synthèse d'énergie par la glycolyse. Nous avons observé après la perte de MICU2 une augmentation de l'absorption de glucose et une dépendance plus importante du glucose dans

la survie des cellules du CCR. De plus, nous démontrons une augmentation de la production de lactate dans les cellules KO MICU2. Ces derniers résultats suggèrent un métabolisme glycolytique prédominant dans les cellules du CCR en absence de MICU2.

L'absorption de Ca^{2+} mitochondrial est essentielle pour activer les déshydrogénases dépendantes du Ca^{2+} du cycle de Krebs et pour augmenter l'OXPHOS. Nous avons observé que la délétion de MICU2 inhibait la phosphorylation de la PDH et la quantité d'Acétyl-CoA. Ce qui est cohérent avec nos résultats sur la diminution de l'absorption de Ca^{2+} mitochondrial et l'OXPHOS. Pour finir, nous avons montré que la glutamine est essentielle pour la viabilité des cellules du CCR.

Ces éléments suggèrent que la présence de MICU2 facilite l'utilisation du pyruvate mitochondrial *via* la glycolyse aérobie et le bon fonctionnement de la β-oxydation mitochondriale permettant ainsi de soutenir la production d'Acétyl-CoA.

Ces deux voies sont importantes dans le CCR. En effet, les voies du glucose et de la β-oxydation sont importante pour le développement, la croissance, la survie et la formation de métastases dans les cellules cancéreuses du CCR (Wang et al. 2018).

L'orientation métabolique des cellules cancéreuses est définie comme une caractéristique majeure « hallmark » dans le cancer. L'identification d'un phénotype bien défini pourrait aider à la compréhension de l'orientation métabolique**.** En effet, une forte expression de MICU1 est associée à un phénotype glycolytique, tandis qu'une forte expression de MICU2 favorise la respiration et le métabolisme mitochondrial**. De plus, il serait intéressant de regarder les orientations de la glycolyse ou de l'OXPHOS en fonction des expressions de MICU2 dans d'autres cancers. Afin d'améliorer notre compréhension sur le rôle de MICU2 dans la dynamique et l'utilisation du glucose, des analyses de Fluxomique par RMN après utilisation de glucose marqué avec le traceur isotopique C13 seraient intéressante à mener.**

La suppression de MCU entraîne également la diminution de l'expression de HIF1α dans le cancer du sein (Tosatto et al. 2016). La suppression de l'échangeur NCLX, entraîne à l'inverse une augmentation de l'expression de HIF1α dans le CCR (Pathak et al. 2020). Contrairement à ce qui est connu sur MCU et NCLX dans le cancer, la modulation des trancripts HIF1α ne semble pas être modifiée dans notre étude à la différence de l'expression de Myc qui semble être le facteur de transcription majoritaire dans la reprogrammation métabolique induite par la perte de MICU2. Cependant, l'expression protéique de HIF1α n'a pas été quantifiée, il faut donc rester prudent sur cette dernière conclusion.

Perspectives thérapeutiques ciblant les membres du complexe MCU

Dans le mélanome, il a été démontré que la régulation à la hausse de MCU sensibilise les cellules aux immunothérapies favorisant la survie du patient (Stejerean-Todoran et al. 2022). De plus, cette étude a observé une diminution de l'expression des transcrits d'EMRE et de MICU1 dans des lignées cellulaires résistantes aux thérapies ciblées, bien que cette diminution ne soit pas statistiquement significative. En revanche, une augmentation significative de l'expression des transcrits de MICU2 a été observée dans une lignée cellulaire résistante aux thérapies ciblées (Stejerean-Todoran et al. 2022).

Les inhibiteurs chimiques de MCU tels que le rouge de ruthénium et ses dérivés possèdent une limite par le manque de spécificité et leur imperméabilité à la membrane. La mitoxantrone a été décrite comme un inhibiteur sélectif de MCU (Arduino et al. 2017), qui, combiné avec un traitement d'immunothérapie (ciblant TGFβ et PD-1), potentialise l'effet antitumoral en induisant l'activation de cellules immunitaires telles que les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$ dans le neuroblastome (Lucarini et al. 2022). Dans une autre étude, il a été décrit que MCU-i4 et MCU-i11 seraient des molécules potentiellement intéressantes pour le développement de traitement ciblant MICU1. Ces composés régulent négativement MCU diminuant ainsi l'absorption calcique mitochondriale en se liant avec MICU1. De plus il est important de noter que ces composés n'ont eu aucun effet sur MICU2 (Di Marco et al. 2020). Au cours de ce manuscrit, j'ai mentionné à de nombreuses reprises le manque d'étude sur le rôle de MICU2. Avant de proposer la création de molécule ciblant MICU2 afin de favoriser son activation ou son inhibition fonctionnelle. **Il serait sans doute prudent de réaliser des investigations sur le rôle de MICU2 dans les différents types cellulaires présents dans le microenvironnement tumoral (cellules immunitaires, fibroblastes, adipocytes…).**

L'ensemble de mes travaux de thèse offre une meilleure compréhension du rôle différentiel des protéines MICUs dans la régulation de l'uniporteur MCU. Le lien entre les expressions des MICUs et les préférences métaboliques ouvre des pistes prometteuses pour mieux comprendre certaines maladies métaboliques. De plus, le ratio MICU2/MICU1 pourrait représenter un marqueur prédictif singulier des préférences métaboliques et ouvrir la voie au développement de thérapies personnalisées.

Bibliographie

Acin-Perez, Rebeca, and Jose A. Enriquez. 2014. “The Function of the Respiratory Supercomplexes: The Plasticity Model.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1837 (4): 444–50. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.12.009.

Acín-Pérez, Rebeca, Patricio Fernández-Silva, Maria Luisa Peleato, Acisclo Pérez-Martos, and Jose Antonio Enriquez. 2008. “Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes.” *Molecular Cell* 32 (4): 529–39. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.021.

Adlakha, Jyoti, Ioanna Karamichali, Juthaporn Sangwallek, Silvia Deiss, Kerstin Bär, Murray Coles, Marcus D. Hartmann, Andrei N. Lupas, and Birte Hernandez Alvarez. 2019. “Characterization of MCU-Binding Proteins MCUR1 and CCDC90B - Representatives of a Protein Family Conserved in Prokaryotes and Eukaryotic Organelles.” *Structure (London, England: 1993)* 27 (3): 464-475.e6. https://doi.org/10.1016/j.str.2018.11.004.

Ahmadpour, Seyedeh Tayebeh, Karine Mahéo, Stéphane Servais, Lucie Brisson, and Jean-François Dumas. 2020. “Cardiolipin, the Mitochondrial Signature Lipid: Implication in Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 8031. https://doi.org/10.3390/ijms21218031.

Akram, M. 2013. “Mini-Review on Glycolysis and Cancer.” *Journal of Cancer Education: The Official Journal of the American Association for Cancer Education* 28 (3): 454–57. https://doi.org/10.1007/s13187-013-0486-9.

Alabduladhem, Tamim O., and Bruno Bordoni. 2023. “Physiology, Krebs Cycle.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556032/.

André, Thierry, and Romain Cohen. n.d. “Cancer du côlon : traitements adjuvants.”

Arduino, Daniela M., Jennifer Wettmarshausen, Horia Vais, Paloma Navas-Navarro, Yiming Cheng, Anja Leimpek, Zhongming Ma, et al. 2017. “Systematic Identification of MCU Modulators by Orthogonal Interspecies Chemical Screening.” *Molecular Cell* 67 (4): 711-723.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.07.019.

Austin, Shane, Ronald Mekis, Sami E M Mohammed, Mariafrancesca Scalise, Wen-An Wang, Michele Galluccio, Christina Pfeiffer, et al. 2022. “TMBIM5 Is the Ca2+/H+ Antiporter of Mammalian Mitochondria.” *EMBO Reports* 23 (12): e54978. https://doi.org/10.15252/embr.202254978.

Azimi, Iman, Michael J. G. Milevskiy, Silke B. Chalmers, Kunsala T. D. S. Yapa, Mélanie Robitaille, Christopher Henry, Gregory J. Baillie, Erik W. Thompson, Sarah J. Roberts-Thomson, and Gregory R. Monteith. 2019. “ORAI1 and ORAI3 in Breast Cancer Molecular Subtypes and the Identification of ORAI3 as a Hypoxia Sensitive Gene and a Regulator of Hypoxia Responses.” *Cancers* 11 (2): 208. https://doi.org/10.3390/cancers11020208.

Azoulay-Zohar, Heftsi, Adrian Israelson, Salah Abu-Hamad, and Varda Shoshan-Barmatz. 2004. “In Self-Defence: Hexokinase Promotes Voltage-Dependent Anion Channel Closure and Prevents Mitochondria-Mediated Apoptotic Cell Death.” *The Biochemical Journal* 377 (Pt 2): 347–55. https://doi.org/10.1042/BJ20031465.

Bastin, Jean, and Fatima Djouadi. 2019. “Anomalies de la β-oxydation mitochondriale des acides gras - Maladies rares et maladies communes.” *médecine/sciences* 35 (10): 779–86. https://doi.org/10.1051/medsci/2019156.

Baughman, Joshua M., Fabiana Perocchi, Hany S. Girgis, Molly Plovanich, Casey A. Belcher-Timme, Yasemin Sancak, X. Robert Bao, et al. 2011. “Integrative Genomics Identifies MCU as an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter.” *Nature* 476 (7360): 341–45. https://doi.org/10.1038/nature10234.

Bergers, Gabriele, and Sarah-Maria Fendt. 2021. “The Metabolism of Cancer Cells during Metastasis.” *Nature Reviews. Cancer* 21 (3): 162–80. https://doi.org/10.1038/s41568-020-00320-2.

Bernardi, Paolo, and Fabio Di Lisa. 2015. “The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Molecular Nature and Role as a Target in Cardioprotection.” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78 (January): 100–106. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.023.

Berndtsson, Jens, Andreas Kohler, Sorbhi Rathore, Lorena Marin-Buera, Hannah Dawitz, Jutta Diessl, Verena Kohler, et al. 2020. “Respiratory Supercomplexes Enhance Electron Transport by Decreasing Cytochrome c Diffusion Distance.” *EMBO Reports* 21 (12): e51015. https://doi.org/10.15252/embr.202051015.

Bernstein, Adam M., Mingyang Song, Xuehong Zhang, An Pan, Molin Wang, Charles S. Fuchs, Ngoan Le, et al. 2015. “Processed and Unprocessed Red Meat and Risk of Colorectal Cancer: Analysis by Tumor Location and Modification by Time.” *PLoS ONE* 10 (8): e0135959. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135959.

Berridge, M. J., P. Lipp, and M. D. Bootman. 2000. “The Versatility and Universality of Calcium Signalling.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 11–21. https://doi.org/10.1038/35036035.

Berridge, Michael J., Martin D. Bootman, and H. Llewelyn Roderick. 2003. “Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7): 517–29. https://doi.org/10.1038/nrm1155.

Bhalla, Kavita, Bor Jang Hwang, Ruby E. Dewi, Lihui Ou, William Twaddel, Hong-bin Fang, Scott B. Vafai, et al. 2011. “PGC1α Promotes Tumor Growth by Inducing Gene Expression Programs Supporting Lipogenesis.” *Cancer Research* 71 (21): 6888–98. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1011.

Biller, Leah H., Sapna Syngal, and Matthew B. Yurgelun. 2019. “Recent Advances in Lynch Syndrome.” *Familial Cancer* 18 (2): 211–19. https://doi.org/10.1007/s10689-018-00117-1.

Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. “A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification.” *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37 (8): 911–17. https://doi.org/10.1139/o59-099.

Bonnefont, Jean-Paul, Fatima Djouadi, Carina Prip-Buus, Stephanie Gobin, Arnold Munnich, and Jean Bastin. 2004. “Carnitine Palmitoyltransferases 1 and 2: Biochemical, Molecular and Medical Aspects.” *Molecular Aspects of Medicine* 25 (5–6): 495–520. https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.06.004.

Bonnet, Crystel, Sébastien Augustin, Sami Ellouze, Paule Bénit, Aicha Bouaita, Pierre Rustin, José-Alain Sahel, and Marisol Corral-Debrinski. 2008. “The Optimized Allotopic Expression of ND1 or ND4 Genes Restores Respiratory Chain Complex I Activity in Fibroblasts Harboring Mutations in These Genes.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1783 (10): 1707–17. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.04.018.

Brustovetsky, Nickolay, Maximilian Tropschug, Simone Heimpel, Doerthe Heidkämper, and Martin Klingenberg. 2002. “A Large Ca2+-Dependent Channel Formed by Recombinant ADP/ATP Carrier from Neurospora Crassa Resembles the Mitochondrial Permeability Transition Pore.” *Biochemistry* 41 (39): 11804–11. https://doi.org/10.1021/bi0200110.

Buecher, Bruno, and Hervé M. Blottière. 2004. “Nouvelles Approches Pharmacologiques de Traitement Des Cancers.” *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 28 (2): 167–80. https://doi.org/10.1016/S0399-8320(04)94872-5.

Carroll, Joe, Jiuya He, Shujing Ding, Ian M. Fearnley, and John E. Walker. 2019. “Persistence of the Permeability Transition Pore in Human Mitochondria Devoid of an Assembled ATP Synthase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (26): 12816–21. https://doi.org/10.1073/pnas.1904005116.

Chakrabarti, Rajarshi, Wei-Ke Ji, Radu V. Stan, Jaime De Juan Sanz, Timothy A. Ryan, and Henry N. Higgs. 2018. “INF2-Mediated Actin Polymerization at the ER Stimulates Mitochondrial Calcium Uptake, Inner Membrane Constriction, and Division.” *Journal of Cell Biology* 217 (1): 251–68. https://doi.org/10.1083/jcb.201709111.

Chakraborty, Prabir K., Soumyajit Banerjee Mustafi, Xunhao Xiong, Shailendra Kumar Dhar Dwivedi, Vasyl Nesin, Sounik Saha, Min Zhang, et al. 2017. “MICU1 Drives Glycolysis and

Chemoresistance in Ovarian Cancer." *Nature Communications* 8 (May): 14634. https://doi.org/10.1038/ncomms14634.
Chandel, Navdeep S. 2021. "Glycolysis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 13 (5): a040535. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040535.
Chandhok, Gursimran, Michael Lazarou, and Brent Neumann. 2018. "Structure, Function, and Regulation of Mitofusin-2 in Health and Disease." *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 93 (2): 933–49. https://doi.org/10.1111/brv.12378.
Chantôme, Aurélie, Marie Potier-Cartereau, Lucie Clarysse, Gaëlle Fromont, Séverine Marionneau-Lambot, Maxime Guéguinou, Jean-Christophe Pagès, et al. 2013. "Pivotal Role of the Lipid Raft SK3-Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases." *Cancer Research* 73 (15): 4852–61. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4572.
Chaudhry, Raheel, and Matthew Varacallo. 2023. "Biochemistry, Glycolysis." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/.
Che, Nan, Zhaoting Yang, Xingzhe Liu, Mengxuan Li, Ying Feng, Chengye Zhang, Chao Li, Yan Cui, and Yanhua Xuan. 2021. "Suppression of LETM1 Inhibits the Proliferation and Stemness of Colorectal Cancer Cells through Reactive Oxygen Species-Induced Autophagy." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25 (4): 2110–20. https://doi.org/10.1111/jcmm.16169.
Chen, Li, Zhaoyue Zhang, Atsushi Hoshino, Henry D. Zheng, Michael Morley, Zoltan Arany, and Joshua D. Rabinowitz. 2019. "NADPH Production by the Oxidative Pentose-Phosphate Pathway Supports Folate Metabolism." *Nature Metabolism* 1 (March): 404–15.
Chen, Linghui, Qiang Sun, Dongkai Zhou, Wei Song, Qifan Yang, Bingjie Ju, Lufei Zhang, et al. 2017. "HINT2 Triggers Mitochondrial Ca2+ Influx by Regulating the Mitochondrial Ca2+ Uniporter (MCU) Complex and Enhances Gemcitabine Apoptotic Effect in Pancreatic Cancer." *Cancer Letters* 411 (December): 106–16. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.020.
Chial et Craig. 2008. "mtDNA and Mitochondrial Diseases | Learn Science at Scitable." 2008. http://www.nature.com/scitable/topicpage/mtdna-and-mitochondrial-diseases-903.
Colas, Séverine, Lénaic Paon, Fabrice Denis, Marie Prat, Pascal Louisot, Claude Hoinard, Olivier Le Floch, Gregory Ogilvie, and Philippe Bougnoux. 2004. "Enhanced Radiosensitivity of Rat Autochthonous Mammary Tumors by Dietary Docosahexaenoic Acid." *International Journal of Cancer* 109 (3): 449–54. https://doi.org/10.1002/ijc.11725.
Cooper, C. E., P. Nicholls, and J. A. Freedman. 1991. "Cytochrome c Oxidase: Structure, Function, and Membrane Topology of the Polypeptide Subunits." *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 69 (9): 586–607. https://doi.org/10.1139/o91-089.
Cotte, Alexia Karen, Virginie Aires, Maxime Fredon, Emeric Limagne, Valentin Derangère, Marion Thibaudin, Etienne Humblin, et al. 2018. "Lysophosphatidylcholine Acyltransferase 2-Mediated Lipid Droplet Production Supports Colorectal Cancer Chemoresistance." *Nature Communications* 9 (1): 322. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02732-5.
Csordás, György, Tünde Golenár, Erin L. Seifert, Kimberli J. Kamer, Yasemin Sancak, Fabiana Perocchi, Cynthia Moffat, et al. 2013. "MICU1 Controls Both the Threshold and Cooperative Activation of the Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter." *Cell Metabolism* 17 (6): 976–87. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.020.
Curry, Merril C., Amelia A. Peters, Paraic A. Kenny, Sarah J. Roberts-Thomson, and Gregory R. Monteith. 2013. "Mitochondrial Calcium Uniporter Silencing Potentiates Caspase-Independent Cell Death in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (3): 695–700. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.04.015.
Dai, Yi, Fan Li, Yuwen Jiao, Guoguang Wang, Tian Zhan, Yunwei Xia, Hanyang Liu, Haojun Yang, Jianping Zhang, and Liming Tang. 2021. "Mortalin/Glucose-Regulated Protein 75 Promotes the Cisplatin-Resistance of Gastric Cancer via Regulating Anti-Oxidation/Apoptosis and Metabolic Reprogramming." *Cell Death Discovery* 7 (1): 1–12. https://doi.org/10.1038/s41420-021-00517-w.

D'Angelo, Donato, and Rosario Rizzuto. 2023. "The Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU): Molecular Identity and Role in Human Diseases." *Biomolecules* 13 (9): 1304. https://doi.org/10.3390/biom13091304.

Danhier, Pierre, Piotr Bański, Valéry L Payen, Debora Grasso, Luigi Ippolito, Pierre Sonveaux, and Paolo E Porporato. 2017. "Cancer Metabolism in Space and Time: Beyond the Warburg Effect." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1858 (8): 556–72. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2017.02.001.

De Marchi, Umberto, Jaime Santo-Domingo, Cyril Castelbou, Israel Sekler, Andreas Wiederkehr, and Nicolas Demaurex. 2014. "NCLX Protein, but Not LETM1, Mediates Mitochondrial Ca2+ Extrusion, Thereby Limiting Ca2+-Induced NAD(P)H Production and Modulating Matrix Redox State." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 20377–85. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540898.

De Marchi, Umberto, Jonathan Thevenet, Aurelie Hermant, Elhadji Dioum, and Andreas Wiederkehr. 2014. "Calcium Co-Regulates Oxidative Metabolism and ATP Synthase-Dependent Respiration in Pancreatic Beta Cells." *Journal of Biological Chemistry* 289 (13): 9182–94. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513184.

De Stefani, D., A. Bononi, A. Romagnoli, A. Messina, V. De Pinto, P. Pinton, and R. Rizzuto. 2012. "VDAC1 Selectively Transfers Apoptotic Ca2+ Signals to Mitochondria." *Cell Death and Differentiation* 19 (2): 267–73. https://doi.org/10.1038/cdd.2011.92.

De Stefani, Diego, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Ildikò Szabò, and Rosario Rizzuto. 2011. "A Forty-Kilodalton Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter." *Nature* 476 (7360): 336–40. https://doi.org/10.1038/nature10230.

De Stefani, Diego, Rosario Rizzuto, and Tullio Pozzan. 2016. "Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth." *Annual Review of Biochemistry* 85 (June): 161–92. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034216.

Dekker, Evelien, Pieter J Tanis, Jasper L A Vleugels, Pashtoon M Kasi, and Michael B Wallace. 2019. "Colorectal Cancer." *The Lancet* 394 (10207): 1467–80. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0.

Delgado, Bryce D., and Stephen B. Long. 2022. "Mechanisms of Ion Selectivity and Throughput in the Mitochondrial Calcium Uniporter." *Science Advances* 8 (50): eade1516. https://doi.org/10.1126/sciadv.ade1516.

Déliot, Nadine, and Bruno Constantin. 2015. "Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1848 (10 Pt B): 2512–22. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009.

Desquiret-Dumas, Valerie, Geraldine Leman, Celine Wetterwald, Stephanie Chupin, Anaïs Lebert, Salim Khiati, Morgane Le Mao, et al. 2019. "Warburg-like Effect Is a Hallmark of Complex I Assembly Defects." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1865 (9): 2475–89. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.05.011.

Devenish, Rodney J., Mark Prescott, and Andrew J. W. Rodgers. 2008. "The Structure and Function of Mitochondrial F1F0-ATP Synthases." *International Review of Cell and Molecular Biology* 267: 1–58. https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00601-1.

Di Marco, Giulia, Francesca Vallese, Benjamin Jourde, Christian Bergsdorf, Mattia Sturlese, Agnese De Mario, Valerie Techer-Etienne, et al. 2020. "A High-Throughput Screening Identifies MICU1 Targeting Compounds." *Cell Reports* 30 (7): 2321-2331.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.01.081.

Diasio, R. B., and B. E. Harris. 1989. "Clinical Pharmacology of 5-Fluorouracil." *Clinical Pharmacokinetics* 16 (4): 215–37. https://doi.org/10.2165/00003088-198916040-00002.

Dieu-Nosjean, Marie-Caroline, and Christophe Caux. 2019. "La biologie des cibles PD-1 et CTLA-4 et la question des biomarqueurs." *médecine/sciences* 35 (12): 957–65. https://doi.org/10.1051/medsci/2019192.

Dinarvand, Peyman, Elizabeth Davaro, James Doan, Mary Ising, Neil Evans, Nancy Phillips, Jinping Lai, and Miguel Guzman. 2019. "Familial Adenomatous Polyposis Syndrome: An Update and

Review of Extraintestinal Manifestations." *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 143 (May). https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0570-RA.

Dubois, Charlotte, Fabien Vanden Abeele, V'yacheslav Lehen'kyi, Dimitra Gkika, Basma Guarmit, Gilbert Lepage, Christian Slomianny, et al. 2014. "Remodeling of Channel-Forming ORAI Proteins Determines an Oncogenic Switch in Prostate Cancer." *Cancer Cell* 26 (1): 19–32. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.025.

Dundas, Sinclair R., Laura C. Lawrie, Patrick H. Rooney, and Graeme I. Murray. 2005. "Mortalin Is Over-Expressed by Colorectal Adenocarcinomas and Correlates with Poor Survival." *The Journal of Pathology* 205 (1): 74–81. https://doi.org/10.1002/path.1672.

Erez, Neta, Morgan Truitt, Peter Olson, Sarah Tuttleton Arron, and Douglas Hanahan. 2010. "Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner." *Cancer Cell* 17 (2): 135–47. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.041.

Esteban-Martínez, Lorena, Elena Sierra-Filardi, Rebecca S McGreal, María Salazar-Roa, Guillermo Mariño, Esther Seco, Sylvère Durand, et al. 2017. "Programmed Mitophagy Is Essential for the Glycolytic Switch during Cell Differentiation." *The EMBO Journal* 36 (12): 1688–1706. https://doi.org/10.15252/embj.201695916.

Evrard, Camille, Gaëlle Tachon, Violaine Randrian, Lucie Karayan-Tapon, and David Tougeron. 2019. "Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer." *Cancers* 11 (10): 1567. https://doi.org/10.3390/cancers11101567.

Faivre, Jean, Vincent Dancourt, Catherine Lejeune, Mohamed A. Tazi, Joseph Lamour, Dominique Gerard, Frederic Dassonville, and Claire Bonithon-Kopp. 2004. "Reduction in Colorectal Cancer Mortality by Fecal Occult Blood Screening in a French Controlled Study." *Gastroenterology* 126 (7): 1674–80. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.018.

Faivre, Sandrine, Guido Kroemer, and Eric Raymond. 2006. "Current Development of mTOR Inhibitors as Anticancer Agents." *Nature Reviews Drug Discovery* 5 (8): 671–88. https://doi.org/10.1038/nrd2062.

Fan, Minrui, Jinru Zhang, Chen-Wei Tsai, Benjamin J. Orlando, Madison Rodriguez, Yan Xu, Maofu Liao, Ming-Feng Tsai, and Liang Feng. 2020. "Structure and Mechanism of the Mitochondrial Ca2+ Uniporter Holocomplex." *Nature* 582 (7810): 129–33. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2309-6.

Favaro, Giulia, Vanina Romanello, Tatiana Varanita, Maria Andrea Desbats, Valeria Morbidoni, Caterina Tezze, Mattia Albiero, et al. 2019. "DRP1-Mediated Mitochondrial Shape Controls Calcium Homeostasis and Muscle Mass." *Nature Communications* 10 (1): 2576. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10226-9.

Garg, Vivek, Junji Suzuki, Ishan Paranjpe, Tiffany Unsulangi, Liron Boyman, Lorin S Milescu, W Jonathan Lederer, and Yuriy Kirichok. 2021. "The Mechanism of MICU-Dependent Gating of the Mitochondrial Ca2+uniporter." *eLife* 10 (August): e69312. https://doi.org/10.7554/eLife.69312.

Ghosh, Sagnika, Writoban Basu Ball, Travis R. Madaris, Subramanya Srikantan, Muniswamy Madesh, Vamsi K. Mootha, and Vishal M. Gohil. 2020. "An Essential Role for Cardiolipin in the Stability and Function of the Mitochondrial Calcium Uniporter." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (28): 16383–90. https://doi.org/10.1073/pnas.2000640117.

Giladi, Moshe, Su Youn Lee, Bosmat Refaeli, Reuben Hiller, Ka Young Chung, and Daniel Khananshvili. 2019. "Structure-Dynamic and Functional Relationships in a Li+-Transporting Sodium-calcium Exchanger Mutant." *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1860 (3): 189–200. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2018.11.015.

Ginkel, Jurriaan van, Ian Tomlinson, and Ignacio Soriano. 2023. "The Evolutionary Landscape of Colorectal Tumorigenesis: Recent Paradigms, Models, and Hypotheses." *Gastroenterology* 164 (5): 841–46. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2022.11.049.

Giorgi, Carlotta, Saverio Marchi, and Paolo Pinton. 2018. “The Machineries, Regulation and Cellular Functions of Mitochondrial Calcium.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19 (11): 713–30. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8.

Görlach, Agnes, Katharina Bertram, Sona Hudecova, and Olga Krizanova. 2015. “Calcium and ROS: A Mutual Interplay.” *Redox Biology* 6 (August): 260–71. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010.

Granchi, C., S. Bertini, M. Macchia, and F. Minutolo. 2010. “Inhibitors of Lactate Dehydrogenase Isoforms and Their Therapeutic Potentials.” *Current Medicinal Chemistry* 17 (7): 672–97. https://doi.org/10.2174/092986710790416263.

Gu, Jinke, Meng Wu, Runyu Guo, Kaige Yan, Jianlin Lei, Ning Gao, and Maojun Yang. 2016. “The Architecture of the Mammalian Respirasome.” *Nature* 537 (7622): 639–43. https://doi.org/10.1038/nature19359.

Guan, Lichun, Zhimei Che, Xiangdong Meng, Yong Yu, Minghui Li, Ziqin Yu, Hui Shi, Dicheng Yang, and Min Yu. 2019. “MCU Up-Regulation Contributes to Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through Calpain/OPA-1-Mediated Mitochondrial Fusion/Mitophagy Inhibition.” *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 23 (11): 7830–43. https://doi.org/10.1111/jcmm.14662.

Guéguinou, Maxime, Thomas Harnois, David Crottes, Arnaud Uguen, Nadine Deliot, Audrey Gambade, Aurélie Chantôme, et al. 2016. “SK3/TRPC1/Orai1 Complex Regulates SOCE-Dependent Colon Cancer Cell Migration: A Novel Opportunity to Modulate Anti-EGFR mAb Action by the Alkyl-Lipid Ohmline.” *Oncotarget* 7 (24): 36168–84. https://doi.org/10.18632/oncotarget.8786.

Guéguinou, Maxime, Sajida Ibrahim, Jérôme Bourgeais, Alison Robert, Trayambak Pathak, Xuexin Zhang, David Crottès, et al. 2022. “Curcumin and NCLX Inhibitors Share Anti-Tumoral Mechanisms in Microsatellite-Instability-Driven Colorectal Cancer.” *Cellular and Molecular Life Sciences* 79 (6): 284. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04311-4.

Guinney, Justin, Rodrigo Dienstmann, Xin Wang, Aurélien de Reyniès, Andreas Schlicker, Charlotte Soneson, Laetitia Marisa, et al. 2015. “The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer.” *Nature Medicine* 21 (11): 1350–56. https://doi.org/10.1038/nm.3967.

Guo, Xiaoxin, Qi Jiang, Alessandra Tuccitto, Darren Chan, Samih Alqawlaq, Gah-Jone Won, and Jeremy M. Sivak. 2018. “The AMPK-PGC-1α Signaling Axis Regulates the Astrocyte Glutathione System to Protect against Oxidative and Metabolic Injury.” *Neurobiology of Disease* 113 (May): 59–69. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.004.

Gustavsson, Anna-Karin, David D. van Niekerk, Caroline B. Adiels, Bob Kooi, Mattias Goksör, and Jacky L. Snoep. 2014. “Allosteric Regulation of Phosphofructokinase Controls the Emergence of Glycolytic Oscillations in Isolated Yeast Cells.” *The FEBS Journal* 281 (12): 2784–93. https://doi.org/10.1111/febs.12820.

Häfner, Matthias F., and Jürgen Debus. 2016. “Radiotherapy for Colorectal Cancer: Current Standards and Future Perspectives.” *Visceral Medicine* 32 (3): 172. https://doi.org/10.1159/000446486.

Hanahan, Douglas. 2022. “Hallmarks of Cancer: New Dimensions.” *Cancer Discovery* 12 (1): 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. 2011. “Hallmarks of Cancer: The next Generation.” *Cell* 144 (5): 646–74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hansford, R. G. 1994. “Physiological Role of Mitochondrial Ca2+ Transport.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26 (5): 495–508. https://doi.org/10.1007/BF00762734.

Hao, Yujun, Yardena Samuels, Qingling Li, Dawid Krokowski, Bo-Jhih Guan, Chao Wang, Zhicheng Jin, et al. 2016. “Oncogenic PIK3CA Mutations Reprogram Glutamine Metabolism in Colorectal Cancer.” *Nature Communications* 7 (June): 11971. https://doi.org/10.1038/ncomms11971.

Hatch, Anna L., Pinar S. Gurel, and Henry N. Higgs. 2014. “Novel Roles for Actin in Mitochondrial Fission.” *Journal of Cell Science* 127 (Pt 21): 4549–60. https://doi.org/10.1242/jcs.153791.

He, Yan, Miao Miao Sun, Guo Geng Zhang, Jing Yang, Kui Sheng Chen, Wen Wen Xu, and Bin Li. 2021. “Targeting PI3K/Akt Signal Transduction for Cancer Therapy.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 6 (December): 425. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00828-5.

Heslop, Kareem A., Veronica Milesi, and Eduardo N. Maldonado. 2021. “VDAC Modulation of Cancer Metabolism: Advances and Therapeutic Challenges.” *Frontiers in Physiology* 12 (September): 742839. https://doi.org/10.3389/fphys.2021.742839.

Hewitson, P., P. Glasziou, L. Irwig, B. Towler, and E. Watson. 2007. “Screening for Colorectal Cancer Using the Faecal Occult Blood Test, Hemoccult.” *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007 (1): CD001216. https://doi.org/10.1002/14651858.CD001216.pub2.

Hoffman, Nicholas E., Harish C. Chandramoorthy, Santhanam Shamugapriya, Xueqian Zhang, Sudarsan Rajan, Karthik Mallilankaraman, Rajesh Kumar Gandhirajan, et al. 2013. “MICU1 Motifs Define Mitochondrial Calcium Uniporter Binding and Activity.” *Cell Reports* 5 (6): 1576–88. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.026.

Hofhaus, G., H. Weiss, and K. Leonard. 1991. “Electron Microscopic Analysis of the Peripheral and Membrane Parts of Mitochondrial NADH Dehydrogenase (Complex I).” *Journal of Molecular Biology* 221 (3): 1027–43. https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)80190-6.

Honrath, Birgit, Isabell Metz, Nadia Bendridi, Jennifer Rieusset, Carsten Culmsee, and Amalia M Dolga. 2017. “Glucose-Regulated Protein 75 Determines ER–Mitochondrial Coupling and Sensitivity to Oxidative Stress in Neuronal Cells.” *Cell Death Discovery* 3 (November): 17076. https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.76.

Hough, Rebecca F., Mohammad N. Islam, Galina A. Gusarova, Guangchun Jin, Shonit Das, and Jahar Bhattacharya. 2019. “Endothelial Mitochondria Determine Rapid Barrier Failure in Chemical Lung Injury.” American Society for Clinical Investigation. February 7, 2019. https://doi.org/10.1172/jci.insight.124329.

Huang, Bisheng, Jingwei Zhang, Xiaolu Zhang, Chi Huang, Guanghui Hu, Saiyang Li, Tiancheng Xie, Mengnan Liu, and Yunfei Xu. 2017. “Suppression of LETM1 by siRNA Inhibits Cell Proliferation and Invasion of Bladder Cancer Cells.” *Oncology Reports* 38 (5): 2935–40. https://doi.org/10.3892/or.2017.5959.

Huang, Ho-Kai, Yi-Hsin Lin, Heng-Ai Chang, Yi-Shyun Lai, Ying-Chi Chen, Soon-Cen Huang, Cheng-Yang Chou, and Wen-Tai Chiu. 2020. “Chemoresistant Ovarian Cancer Enhances Its Migration Abilities by Increasing Store-Operated Ca2+ Entry-Mediated Turnover of Focal Adhesions.” *Journal of Biomedical Science* 27 (1): 36. https://doi.org/10.1186/s12929-020-00630-5.

Huo, Jiuzhou, Shan Lu, Jennifer Q. Kwong, Michael J. Bround, Kelly M. Grimes, Michelle A. Sargent, Milton E. Brown, Michael E. Davis, Donald M. Bers, and Jeffery D. Molkentin. 2020. “MCUb Induction Protects the Heart From Postischemic Remodeling.” *Circulation Research* 127 (3): 379–90. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316369.

Hwang, M.-S., C. T. Schwall, E. Pazarentzos, C. Datler, N. N. Alder, and S. Grimm. 2014. “Mitochondrial Ca(2+) Influx Targets Cardiolipin to Disintegrate Respiratory Chain Complex II for Cell Death Induction.” *Cell Death and Differentiation* 21 (11): 1733–45. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.84.

IARC Working Group on the Evaluation of Cancer-Preventive Interventions. 2019. *Colorectal Cancer Screening*. IARC Handbooks of Cancer Prevention. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553200/.

Ibrahim, Sajida, Justine Chaigne, Hassan Dakik, Yann Fourbon, Laetitia Corset, Thierry Lecomte, William Raoul, and Maxime Guéguinou. 2021. “SK4 Oncochannels Regulate Calcium Entry and Promote Cell Migration in KRAS-Mutated Colorectal Cancer.” *Cell Calcium* 96 (June): 102384. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102384.

Ibrahim, Sajida, Hassan Dakik, Christophe Vandier, Romain Chautard, Gilles Paintaud, Frédéric Mazurier, Thierry Lecomte, Maxime Guéguinou, and William Raoul. 2019. “Expression Profiling of Calcium Channels and Calcium-Activated Potassium Channels in Colorectal Cancer.” *Cancers* 11 (4): 561. https://doi.org/10.3390/cancers11040561.

James, Dominic I., Philippe A. Parone, Yves Mattenberger, and Jean-Claude Martinou. 2003. “hFis1, a Novel Component of the Mammalian Mitochondrial Fission Machinery.” *Journal of Biological Chemistry* 278 (38): 36373–79. https://doi.org/10.1074/jbc.M303758200.

Ji, Wei-ke, Anna L. Hatch, Ronald A. Merrill, Stefan Strack, and Henry N. Higgs. 2015. “Actin Filaments Target the Oligomeric Maturation of the Dynamin GTPase Drp1 to Mitochondrial Fission Sites.” *eLife* 4 (November): e11553. https://doi.org/10.7554/eLife.11553.

Jiang, Dawei, Linlin Zhao, and David E. Clapham. 2009. “Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca2+/H+ Antiporter.” *Science (New York, N.Y.)* 326 (5949): 144–47. https://doi.org/10.1126/science.1175145.

Jones, Russell G., David R. Plas, Sara Kubek, Monica Buzzai, James Mu, Yang Xu, Morris J. Birnbaum, and Craig B. Thompson. 2005. “AMP-Activated Protein Kinase Induces a P53-Dependent Metabolic Checkpoint.” *Molecular Cell* 18 (3): 283–93. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.03.027.

Kamer, Kimberli J., and Vamsi K. Mootha. 2014. “MICU1 and MICU2 Play Nonredundant Roles in the Regulation of the Mitochondrial Calcium Uniporter.” *EMBO Reports* 15 (3): 299–307. https://doi.org/10.1002/embr.201337946.

Kassouf, Elie, Samer Tabchi, and Mustapha Tehfe. 2016. “Anti-EGFR Therapy for Metastatic Colorectal Cancer in the Era of Extended RAS Gene Mutational Analysis.” *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 30 (2): 95–104. https://doi.org/10.1007/s40259-016-0166-5.

Ke, Rong, Qicao Xu, Cong Li, Lingyu Luo, and Deqiang Huang. 2018. “Mechanisms of AMPK in the Maintenance of ATP Balance during Energy Metabolism.” *Cell Biology International* 42 (4): 384–92. https://doi.org/10.1002/cbin.10915.

Kim, Yong Tae, Ji Hye Min, Kyue-Hee Choi, and Honsoul Kim. 2022. “Colon Cancer Microsatellite Instability Influences Computed Tomography Assessment of Regional Lymph Node Morphology and Diagnostic Performance.” *European Journal of Radiology* 154 (September): 110396. https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2022.110396.

Kostic, Marko, Marthe H. R. Ludtmann, Hilmar Bading, Michal Hershfinkel, Erin Steer, Charleen T. Chu, Andrey Y. Abramov, and Israel Sekler. 2015. “PKA Phosphorylation of NCLX Reverses Mitochondrial Calcium Overload and Depolarization, Promoting Survival of PINK1-Deficient Dopaminergic Neurons.” *Cell Reports* 13 (2): 376–86. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.079.

Kovács-Bogdán, Erika, Yasemin Sancak, Kimberli J. Kamer, Molly Plovanich, Ashwini Jambhekar, Robert J. Huber, Michael A. Myre, Michael D. Blower, and Vamsi K. Mootha. 2014. “Reconstitution of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Yeast.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (24): 8985–90. https://doi.org/10.1073/pnas.1400514111.

Krebs, Joachim, Luis B. Agellon, and Marek Michalak. 2015. “Ca(2+) Homeostasis and Endoplasmic Reticulum (ER) Stress: An Integrated View of Calcium Signaling.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460 (1): 114–21. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.004.

Kruppa, Antonina J., and Folma Buss. 2021. “Motor Proteins at the Mitochondria–Cytoskeleton Interface.” *Journal of Cell Science* 134 (7): jcs226084. https://doi.org/10.1242/jcs.226084.

Kuo, Chih-Chia, Hsiang-Hsi Ling, Ming-Chen Chiang, Chu-Hung Chung, Wen-Ying Lee, Cheng-Ying Chu, Yu-Chih Wu, et al. 2019. “Metastatic Colorectal Cancer Rewrites Metabolic Program Through a Glut3-YAP-Dependent Signaling Circuit.” *Theranostics* 9 (9): 2526. https://doi.org/10.7150/thno.32915.

Kussmaul, Lothar, and Judy Hirst. 2006. “The Mechanism of Superoxide Production by NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from Bovine Heart Mitochondria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (20): 7607–12. https://doi.org/10.1073/pnas.0510977103.

Lamas, Bruno, Mathias L Richard, Valentin Leducq, Hang-Phuong Pham, Marie-Laure Michel, Gregory Da Costa, Chantal Bridonneau, et al. 2016. “CARD9 Impacts Colitis by Altering Gut Microbiota Metabolism of Tryptophan into Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands.” *Nature Medicine* 22 (6): 598–605. https://doi.org/10.1038/nm.4102.

Lambert, Jonathan P., Timothy S. Luongo, Dhanendra Tomar, Pooja Jadiya, Erhe Gao, Xueqian Zhang, Anna Maria Lucchese, Devin W. Kolmetzky, Neil S. Shah, and John W. Elrod. 2019. "MCUB Regulates the Molecular Composition of the Mitochondrial Calcium Uniporter Channel to Limit Mitochondrial Calcium Overload During Stress." *Circulation* 140 (21): 1720–33. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037968.

LeBleu, Valerie S., Joyce T. O'Connell, Karina N. Gonzalez Herrera, Harriet Wikman-Kocher, Klaus Pantel, Marcia C. Haigis, Fernanda Machado de Carvalho, et al. 2014. "PGC-1α Mediates Mitochondrial Biogenesis and Oxidative Phosphorylation to Promote Metastasis." *Nature Cell Biology* 16 (10): 992–15. https://doi.org/10.1038/ncb3039.

Lehninger, A L. 1970. "Mitochondria and Calcium Ion Transport." *Biochemical Journal* 119 (2): 129–38.

Lenzen, Sigurd. 2014. "A Fresh View of Glycolysis and Glucokinase Regulation: History and Current Status." *The Journal of Biological Chemistry* 289 (18): 12189–94. https://doi.org/10.1074/jbc.R114.557314.

Letts, James A., Karol Fiedorczuk, Gianluca Degliesposti, Mark Skehel, and Leonid A. Sazanov. 2019. "Structures of Respiratory Supercomplex I+III2 Reveal Functional and Conformational Crosstalk." *Molecular Cell* 75 (6): 1131-1146.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.022.

Li, Jia, Liuqing Wang, Yilan Chen, Yang Yang, Jin Liu, Kai Liu, Yi-Tsang Lee, Ningjia He, Yubin Zhou, and Youjun Wang. 2020. "Visible Light Excited Ratiometric-GECIs for Long-Term in-Cellulo Monitoring of Calcium Signals." *Cell Calcium* 87 (May): 102165. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102165.

Li, Jie, Ni Hou, Ahmad Faried, Soichi Tsutsumi, Toshiyuki Takeuchi, and Hiroyuki Kuwano. 2009. "Inhibition of Autophagy by 3-MA Enhances the Effect of 5-FU-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells." *Annals of Surgical Oncology* 16 (3): 761–71. https://doi.org/10.1245/s10434-008-0260-0.

Li, Nan, Yahui Zheng, Chouhui Xuan, Zhenhua Lin, Longzhen Piao, and Shuangping Liu. 2015. "LETM1 Overexpression Is Correlated with the Clinical Features and Survival Outcome of Breast Cancer." *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (10): 12893–900.

Liesa, Marc, Manuel Palacín, and Antonio Zorzano. 2009. "Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease." *Physiological Reviews* 89 (3): 799–845. https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2008.

Lisak, Dmitrij A., Teresa Schacht, Vitalij Enders, Jörn Habicht, Santeri Kiviluoto, Julia Schneider, Nadine Henke, Geert Bultynck, and Axel Methner. 2015. "The Transmembrane Bax Inhibitor Motif (TMBIM) Containing Protein Family: Tissue Expression, Intracellular Localization and Effects on the ER CA^{2+}-Filling State." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (9): 2104–14. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.002.

Liu, Cong, Hui-Juan Li, Wei-Xia Duan, Yu Duan, Qin Yu, Tian Zhang, Ya-Pei Sun, Yuan-Yuan Li, Yong-Sheng Liu, and Shang-Cheng Xu. 2023. "MCU Upregulation Overactivates Mitophagy by Promoting VDAC1 Dimerization and Ubiquitination in the Hepatotoxicity of Cadmium." *Advanced Science* 10 (7): 2203869. https://doi.org/10.1002/advs.202203869.

Liu, Shuang, Hui Zhao, Yibing Hu, Chang Yan, Yulong Mi, Xiaolan Li, Deding Tao, and Jichao Qin. 2022. "Lactate Promotes Metastasis of Normoxic Colorectal Cancer Stem Cells through PGC-1α-Mediated Oxidative Phosphorylation." *Cell Death & Disease* 13 (7): 651. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05111-1.

Liu, Tao, and Honglei Yin. 2017. "PDK1 Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration by Enhancing the Warburg Effect in Non-Small Cell Lung Cancer." *Oncology Reports* 37 (1): 193–200. https://doi.org/10.3892/or.2016.5253.

Liu, Yang, Mingpeng Jin, Yaya Wang, Jianjun Zhu, Rui Tan, Jing Zhao, Xiaoying Ji, et al. 2020. "MCU-Induced Mitochondrial Calcium Uptake Promotes Mitochondrial Biogenesis and Colorectal Cancer Growth." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 59. https://doi.org/10.1038/s41392-020-0155-5.

Loree, Jonathan M., Allan A.L. Pereira, Michael Lam, Alexandra N. Willauer, Kanwal Raghav, Arvind Dasari, Van. K Morris, et al. 2018. “Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes.” *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 24 (5): 1062–72. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2484.

Lucarini, Valeria, Ombretta Melaiu, Silvia D’Amico, Fabio Pastorino, Patrizia Tempora, Marco Scarsella, Marco Pezzullo, et al. 2022. “Combined Mitoxantrone and Anti-TGFβ Treatment with PD-1 Blockade Enhances Antitumor Immunity by Remodelling the Tumor Immune Landscape in Neuroblastoma.” *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 41 (1): 326. https://doi.org/10.1186/s13046-022-02525-9.

Luo, Dongjun, Zhongxia Wang, Junyi Wu, Chunping Jiang, and Junhua Wu. 2014. “The Role of Hypoxia Inducible Factor-1 in Hepatocellular Carcinoma.” *BioMed Research International* 2014: 409272. https://doi.org/10.1155/2014/409272.

Luongo, Timothy S., Jonathan P. Lambert, Polina Gross, Mary Nwokedi, Alyssa A. Lombardi, Santhanam Shanmughapriya, April C. Carpenter, et al. 2017. “The Mitochondrial Na+/Ca2+ Exchanger Is Essential for Ca2+ Homeostasis and Viability.” *Nature* 545 (7652): 93–97. https://doi.org/10.1038/nature22082.

M, Giacomello, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, and Pozzan T. 2010. “Ca2+ Hot Spots on the Mitochondrial Surface Are Generated by Ca2+ Mobilization from Stores, but Not by Activation of Store-Operated Ca2+ Channels.” *Molecular Cell* 38 (2). https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.003.

Macheda, Maria L., Suzanne Rogers, and James D. Best. 2005. “Molecular and Cellular Regulation of Glucose Transporter (GLUT) Proteins in Cancer.” *Journal of Cellular Physiology* 202 (3): 654–62. https://doi.org/10.1002/jcp.20166.

Malka, Florence, Olwenn Guillery, Carmen Cifuentes-Diaz, Emmanuelle Guillou, Pascale Belenguer, Anne Lombès, and Manuel Rojo. 2005. “Separate Fusion of Outer and Inner Mitochondrial Membranes.” *EMBO Reports* 6 (9): 853–59. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400488.

Mallilankaraman, Karthik, Patrick Doonan, César Cárdenas, Harish C. Chandramoorthy, Marioly Müller, Russell Miller, Nicholas E. Hoffman, et al. 2012. “MICU1 Is an Essential Gatekeeper for MCU-Mediated Mitochondrial Ca(2+) Uptake That Regulates Cell Survival.” *Cell* 151 (3): 630–44. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.011.

Mammucari, Cristina, and Rosario Rizzuto. 2010. “Signaling Pathways in Mitochondrial Dysfunction and Aging.” *Mechanisms of Ageing and Development* 131 (7–8): 536–43. https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.07.003.

Maranzana, Evelina, Giovanna Barbero, Anna Ida Falasca, Giorgio Lenaz, and Maria Luisa Genova. 2013. “Mitochondrial Respiratory Supercomplex Association Limits Production of Reactive Oxygen Species from Complex I.” *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (13): 1469–80. https://doi.org/10.1089/ars.2012.4845.

Marchi, Saverio, Veronica Angela Maria Vitto, Alberto Danese, Mariusz R. Wieckowski, Carlotta Giorgi, and Paolo Pinton. 2019. “Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Modulation in Cancerogenesis.” *Cell Cycle* 18 (10): 1068–83. https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1612698.

Márkus, Nóra M., Philip Hasel, Jing Qiu, Karen F. S. Bell, Samuel Heron, Peter C. Kind, Owen Dando, T. Ian Simpson, and Giles E. Hardingham. 2016. “Expression of mRNA Encoding Mcu and Other Mitochondrial Calcium Regulatory Genes Depends on Cell Type, Neuronal Subtype, and Ca2+ Signaling.” *PLOS ONE* 11 (2): e0148164. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148164.

McCormack, J G, and R M Denton. 1980. “Role of Calcium Ions in the Regulation of Intramitochondrial Metabolism. Properties of the Ca2+-Sensitive Dehydrogenases within Intact Uncoupled Mitochondria from the White and Brown Adipose Tissue of the Rat.” *Biochemical Journal* 190 (1): 95–105.

Medja, F., S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. Mousson de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J.P. Mazat, and A. Lombès. 2009. “Development and Implementation of Standardized

Respiratory Chain Spectrophotometric Assays for Clinical Diagnosis." *Mitochondrion* 9 (5): 331–39. https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.05.001.

Messersmith, Wells A. 2019. "NCCN Guidelines Updates: Management of Metastatic Colorectal Cancer." *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN* 17 (5.5): 599–601. https://doi.org/10.6004/jnccn.2019.5014.

Mignen, Olivier, Bruno Constantin, Marie Potier-Cartereau, Aubin Penna, Mathieu Gautier, Maxime Guéguinou, Yves Renaudineau, et al. 2017. "Constitutive Calcium Entry and Cancer: Updated Views and Insights." *European Biophysics Journal* 46 (5): 395–413. https://doi.org/10.1007/s00249-017-1216-8.

Mignen, Olivier, Jill L. Thompson, and Trevor J. Shuttleworth. 2009. "The Molecular Architecture of the Arachidonate-Regulated Ca2+-Selective ARC Channel Is a Pentameric Assembly of Orai1 and Orai3 Subunits." *The Journal of Physiology* 587 (Pt 17): 4181–97. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174193.

Mignen, Olivier, Jill L Thompson, David I Yule, and Trevor J Shuttleworth. 2005. "Agonist Activation of Arachidonate-Regulated Ca2+-Selective (ARC) Channels in Murine Parotid and Pancreatic Acinar Cells." *The Journal of Physiology* 564 (Pt 3): 791–801. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.085704.

Mnatsakanyan, Nelli, and Elizabeth Ann Jonas. 2020. "ATP Synthase C-Subunit Ring as the Channel of Mitochondrial Permeability Transition: Regulator of Metabolism in Development and Degeneration." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 144 (July): 109–18. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.05.013.

Monteith, Gregory R., Natalia Prevarskaya, and Sarah J. Roberts-Thomson. 2017. "The Calcium-Cancer Signalling Nexus." *Nature Reviews. Cancer* 17 (6): 367–80. https://doi.org/10.1038/nrc.2017.18.

Morris, John P., Jossie J. Yashinskie, Richard Koche, Rohit Chandwani, Sha Tian, Chi-Chao Chen, Timour Baslan, et al. 2019. "α-Ketoglutarate Links P53 to Cell Fate during Tumour Suppression." *Nature* 573 (7775): 595–99. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1577-5.

Morrison, W. R., and L. M. Smith. 1964. "PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL." *Journal of Lipid Research* 5 (October): 600–608.

Murphy, Elizabeth, Louis Levy, Bore Raju, Charles Steenbergen, John T. Gerig, Phirtu Singh, and Robert E. London. 1990. "Measurement of Cytosolic Calcium Using 19 F NMR." *Environmental Health Perspectives* 84: 95–98. https://doi.org/10.2307/3430709.

Nagaraju, Ganji Purnachandra, Pallaval Veera Bramhachari, Godi Raghu, and Bassel F. El-Rayes. 2015. "Hypoxia Inducible Factor-1α: Its Role in Colorectal Carcinogenesis and Metastasis." *Cancer Letters* 366 (1): 11–18. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.005.

Nakamura, Hajime, and Kohichi Takada. 2021. "Reactive Oxygen Species in Cancer: Current Findings and Future Directions." *Cancer Science* 112 (10): 3945–52. https://doi.org/10.1111/cas.15068.

Navale, Archana M., and Archana N. Paranjape. 2016. "Glucose Transporters: Physiological and Pathological Roles." *Biophysical Reviews* 8 (1): 5–9. https://doi.org/10.1007/s12551-015-0186-2.

Neitzel, Carina, Philipp Demuth, Simon Wittmann, and Jörg Fahrer. 2020. "Targeting Altered Energy Metabolism in Colorectal Cancer: Oncogenic Reprogramming, the Central Role of the TCA Cycle and Therapeutic Opportunities." *Cancers* 12 (7): 1731. https://doi.org/10.3390/cancers12071731.

Nemani, Neeharika, Edmund Carvalho, Dhanendra Tomar, Zhiwei Dong, Andrea Ketschek, Sarah L. Breves, Fabián Jaña, et al. 2018. "MIRO-1 Determines Mitochondrial Shape Transition upon GPCR Activation and Ca2+ Stress." *Cell Reports* 23 (4): 1005–19. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.098.

Neupane, Prashant, Sudina Bhuju, Nita Thapa, and Hitesh Kumar Bhattarai. 2019. “ATP Synthase: Structure, Function and Inhibition.” *Biomolecular Concepts* 10 (1): 1–10. https://doi.org/10.1515/bmc-2019-0001.

Neupert, Walter, and Johannes M. Herrmann. 2007. “Translocation of Proteins into Mitochondria.” *Annual Review of Biochemistry* 76: 723–49. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409.

Ni, Rui, Ziwei Li, Li Li, Dan Peng, Yue Ming, Lin Li, and Yao Liu. 2023. “Rethinking Glutamine Metabolism and the Regulation of Glutamine Addiction by Oncogenes in Cancer.” *Frontiers in Oncology* 13. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1143798.

Noskov, Sergei Yu., Tatiana K. Rostovtseva, and Sergey M. Bezrukov. 2013. “ATP Transport through VDAC and the VDAC–Tubulin Complex Probed by Equilibrium and Nonequilibrium MD Simulations.” *Biochemistry* 52 (51): 9246–56. https://doi.org/10.1021/bi4011495.

Oh, Do-Youn, and Yung-Jue Bang. 2020. “HER2-Targeted Therapies - a Role beyond Breast Cancer.” *Nature Reviews. Clinical Oncology* 17 (1): 33–48. https://doi.org/10.1038/s41571-019-0268-3.

Oka, Toshihiko, Tomoko Sayano, Shoko Tamai, Sadaki Yokota, Hiroki Kato, Gen Fujii, and Katsuyoshi Mihara. 2008. “Identification of a Novel Protein MICS1 That Is Involved in Maintenance of Mitochondrial Morphology and Apoptotic Release of Cytochrome c.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (6): 2597–2608. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1205.

Paillard, Melanie, György Csordás, Kai-Ting Huang, Peter Várnai, Suresh K. Joseph, and György Hajnóczky. 2018. “MICU1 Interacts with the D-Ring of the MCU Pore to Control Its Ca2+ Flux and Sensitivity to Ru360.” *Molecular Cell* 72 (4): 778-785.e3. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.008.

Paillard, Melanie, György Csordás, Gergö Szanda, Tünde Golenár, Valentina Debattisti, Adam Bartok, Nadan Wang, et al. 2017. “Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca2+ Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU.” *Cell Reports* 18 (10): 2291–2300. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.032.

Palade, G. E. 1953. “An Electron Microscope Study of the Mitochondrial Structure.” *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 1 (4): 188–211. https://doi.org/10.1177/1.4.188.

Pallafacchina, Giorgia, Sofia Zanin, and Rosario Rizzuto. 2021. “From the Identification to the Dissection of the Physiological Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter: An Ongoing Story.” *Biomolecules* 11 (6): 786. https://doi.org/10.3390/biom11060786.

Palty, Raz, William F. Silverman, Michal Hershfinkel, Teresa Caporale, Stefano L. Sensi, Julia Parnis, Christiane Nolte, et al. 2010. “NCLX Is an Essential Component of Mitochondrial Na+/Ca2+ Exchange.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1): 436–41. https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107.

Pate, Kira T., Chiara Stringari, Stephanie Sprowl-Tanio, Kehui Wang, Tara TeSlaa, Nate P. Hoverter, Miriam M. McQuade, et al. 2014. “Wnt Signaling Directs a Metabolic Program of Glycolysis and Angiogenesis in Colon Cancer.” *The EMBO Journal* 33 (13): 1454–73. https://doi.org/10.15252/embj.201488598.

Pathak, Trayambak, Maxime Gueguinou, Vonn Walter, Celine Delierneux, Martin T. Johnson, Xuexin Zhang, Ping Xin, et al. 2020. “Dichotomous Role of the Human Mitochondrial Na+/Ca2+/Li+ Exchanger NCLX in Colorectal Cancer Growth and Metastasis.” *eLife* 9 (September): e59686. https://doi.org/10.7554/eLife.59686.

Pathak, Trayambak, and Mohamed Trebak. 2018. “Mitochondrial Ca2+ Signaling.” *Pharmacology & Therapeutics* 192 (December): 112–23. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.07.001.

Patron, Maria, Vanessa Checchetto, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Denis Vecellio Reane, Maura Mantoan, Veronica Granatiero, Ildikò Szabò, Diego De Stefani, and Rosario Rizzuto. 2014. “MICU1 and MICU2 Finely Tune the Mitochondrial Ca2+ Uniporter by Exerting Opposite Effects on MCU Activity.” *Molecular Cell* 53 (5): 726–37. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.013.

Patron, Maria, Veronica Granatiero, Javier Espino, Rosario Rizzuto, and Diego De Stefani. 2019a. "MICU3 Is a Tissue-Specific Enhancer of Mitochondrial Calcium Uptake." *Cell Death and Differentiation* 26 (1): 179–95. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0113-8.

———. 2019b. "MICU3 Is a Tissue-Specific Enhancer of Mitochondrial Calcium Uptake." *Cell Death and Differentiation* 26 (1): 179–95. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0113-8.

Payne, Riley, Henry Hoff, Anne Roskowski, and J. Kevin Foskett. 2017. "MICU2 Restricts Spatial Crosstalk between InsP3R and MCU Channels by Regulating Threshold and Gain of MICU1-Mediated Inhibition and Activation of MCU." *Cell Reports* 21 (11): 3141–54. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.064.

Payne, Riley, Carmen Li, and J. Kevin Foskett. 2020. "Variable Assembly of EMRE and MCU Creates Functional Channels with Distinct Gatekeeping Profiles." *iScience* 23 (4): 101037. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101037.

Pérez-Riesgo, Enrique, Lucía G. Gutiérrez, Daniel Ubierna, Alberto Acedo, Mary P. Moyer, Lucía Núñez, and Carlos Villalobos. 2017. "Transcriptomic Analysis of Calcium Remodeling in Colorectal Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5): 922. https://doi.org/10.3390/ijms18050922.

Perillo, Bruno, Marzia Di Donato, Antonio Pezone, Erika Di Zazzo, Pia Giovannelli, Giovanni Galasso, Gabriella Castoria, and Antimo Migliaccio. 2020. "ROS in Cancer Therapy: The Bright Side of the Moon." *Experimental & Molecular Medicine* 52 (2): 192–203. https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2.

Perocchi, Fabiana, Vishal M. Gohil, Hany S. Girgis, X. Robert Bao, Janet E. McCombs, Amy E. Palmer, and Vamsi K. Mootha. 2010. "MICU1 Encodes a Mitochondrial EF Hand Protein Required for Ca(2+) Uptake." *Nature* 467 (7313): 291–96. https://doi.org/10.1038/nature09358.

Perrone, Mariasole, Natascia Caroccia, Ilaria Genovese, Sonia Missiroli, Lorenzo Modesti, Gaia Pedriali, Bianca Vezzani, et al. 2020. "The Role of Mitochondria-Associated Membranes in Cellular Homeostasis and Diseases." *International Review of Cell and Molecular Biology* 350: 119–96. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.11.002.

Petrelli, Fausto, Gianluca Tomasello, Karen Borgonovo, Michele Ghidini, Luca Turati, Pierpaolo Dallera, Rodolfo Passalacqua, Giovanni Sgroi, and Sandro Barni. 2017. "Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis." *JAMA Oncology* 3 (2): 211–19. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.4227.

Petrungaro, Carmelina, Katharina M. Zimmermann, Victoria Küttner, Manuel Fischer, Jörn Dengjel, Ivan Bogeski, and Jan Riemer. 2015. "The Ca(2+)-Dependent Release of the Mia40-Induced MICU1-MICU2 Dimer from MCU Regulates Mitochondrial Ca(2+) Uptake." *Cell Metabolism* 22 (4): 721–33. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.08.019.

Piao, Lihua, Ying Feng, Zhaoting Yang, Wenbo Qi, Haoyue Li, Hengmin Han, and Yanhua Xuan. 2019. "LETM1 Is a Potential Cancer Stem-like Cell Marker and Predicts Poor Prognosis in Colorectal Adenocarcinoma." *Pathology - Research and Practice* 215 (7): 152437. https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152437.

Pierro, Cristina, Simon J. Cook, Thomas C. F. Foets, Martin D. Bootman, and H. Llewelyn Roderick. 2014. "Oncogenic K-Ras Suppresses IP_3-Dependent Ca^{2+} Release through Remodelling of the Isoform Composition of IP_3Rs and ER Luminal Ca^{2+} Levels in Colorectal Cancer Cell Lines." *Journal of Cell Science* 127 (Pt 7): 1607–19. https://doi.org/10.1242/jcs.141408.

Pinedo, H. M., and G. F. Peters. 1988. "Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 6 (10): 1653–64. https://doi.org/10.1200/JCO.1988.6.10.1653.

Plovanich, Molly, Roman L. Bogorad, Yasemin Sancak, Kimberli J. Kamer, Laura Strittmatter, Andrew A. Li, Hany S. Girgis, Satya Kuchimanchi, Jack De Groot, Lauren Speciner, Nathan Taneja, Jonathan Oshea, et al. 2013. "MICU2, a Paralog of MICU1, Resides within the Mitochondrial Uniporter Complex to Regulate Calcium Handling." *PloS One* 8 (2): e55785. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055785.

Plovanich, Molly, Roman L. Bogorad, Yasemin Sancak, Kimberli J. Kamer, Laura Strittmatter, Andrew A. Li, Hany S. Girgis, Satya Kuchimanchi, Jack De Groot, Lauren Speciner, Nathan Taneja, Jonathan OShea, et al. 2013. "MICU2, a Paralog of MICU1, Resides within the Mitochondrial Uniporter Complex to Regulate Calcium Handling." Edited by Yidong Bai. *PLoS ONE* 8 (2): e55785. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055785.

Pontisso, Ilaria, and Laurent Combettes. 2021. "Role of Sigma-1 Receptor in Calcium Modulation: Possible Involvement in Cancer." *Genes* 12 (2): 139. https://doi.org/10.3390/genes12020139.

Prakriya, Murali, and Richard S. Lewis. 2015. "Store-Operated Calcium Channels." *Physiological Reviews* 95 (4): 1383–1436. https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014.

Prevarskaya, Natalia, Roman Skryma, and Yaroslav Shuba. 2018. "Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?" *Physiological Reviews* 98 (2): 559–621. https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016.

Puccini, Alberto, Martin D Berger, Madiha Naseem, Ryuma Tokunaga, Francesca Battaglin, Shu Cao, Diana L. Hanna, et al. 2017. "Colorectal Cancer: Epigenetic Alterations and Their Clinical Implications." *Biochimica et Biophysica Acta* 1868 (2): 439–48. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2017.09.003.

Raffaello, Anna, Diego De Stefani, Davide Sabbadin, Enrico Teardo, Giulia Merli, Anne Picard, Vanessa Checchetto, Stefano Moro, Ildikò Szabò, and Rosario Rizzuto. 2013. "The Mitochondrial Calcium Uniporter Is a Multimer That Can Include a Dominant-Negative Pore-Forming Subunit." *The EMBO Journal* 32 (17): 2362–76. https://doi.org/10.1038/emboj.2013.157.

Rahate, Kiran, Lokesh Kumar Bhatt, and Kedar S. Prabhavalkar. 2020. "SERCA Stimulation: A Potential Approach in Therapeutics." *Chemical Biology & Drug Design* 95 (1): 5–15. https://doi.org/10.1111/cbdd.13620.

Ren, Lin, Xiaodan Chen, Xiaobing Chen, Jiayan Li, Bin Cheng, and Juan Xia. 2020. "Mitochondrial Dynamics: Fission and Fusion in Fate Determination of Mesenchymal Stem Cells." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 580070. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.580070.

Rezende, Leandro Fórnias Machado de, Thiago Hérick de Sá, Georgios Markozannes, Juan Pablo Rey-López, I.-Min Lee, Konstantinos K. Tsilidis, John P. A. Ioannidis, and José Eluf-Neto. 2018. "Physical Activity and Cancer: An Umbrella Review of the Literature Including 22 Major Anatomical Sites and 770 000 Cancer Cases." *British Journal of Sports Medicine* 52 (13): 826–33. https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-098391.

Ribic, Christine M., Daniel J. Sargent, Malcolm J. Moore, Stephen N. Thibodeau, Amy J. French, Richard M. Goldberg, Stanley R. Hamilton, et al. 2003. "Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer." *The New England Journal of Medicine* 349 (3): 247–57. https://doi.org/10.1056/NEJMoa022289.

Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. "Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca2+ Responses." *Science (New York, N.Y.)* 280 (5370): 1763–66. https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763.

Rizzuto, Rosario, Diego De Stefani, Anna Raffaello, and Cristina Mammucari. 2012. "Mitochondria as Sensors and Regulators of Calcium Signalling." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (9): 566–78. https://doi.org/10.1038/nrm3412.

Romero-Garcia, Susana, and Heriberto Prado-Garcia. 2019. "Mitochondrial Calcium: Transport and Modulation of Cellular Processes in Homeostasis and Cancer (Review)." *International Journal of Oncology* 54 (4): 1155–67. https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4696.

Rossi, Daniela, Bianca Vezzani, Lucia Galli, Cecilia Paolini, Luana Toniolo, Enrico Pierantozzi, Simone Spinozzi, et al. 2014. "A Mutation in the CASQ1 Gene Causes a Vacuolar Myopathy with Accumulation of Sarcoplasmic Reticulum Protein Aggregates." *Human Mutation* 35 (10): 1163–70. https://doi.org/10.1002/humu.22631.

Rostovtseva, Tatiana K., Kely L. Sheldon, Elnaz Hassanzadeh, Claire Monge, Valdur Saks, Sergey M. Bezrukov, and Dan L. Sackett. 2008. "Tubulin Binding Blocks Mitochondrial Voltage-

Dependent Anion Channel and Regulates Respiration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (48): 18746–51. https://doi.org/10.1073/pnas.0806303105.

Ruiz-Casado, Ana, Asunción Martín-Ruiz, Laura M. Pérez, Mariano Provencio, Carmen Fiuza-Luces, and Alejandro Lucia. 2017. "Exercise and the Hallmarks of Cancer." *Trends in Cancer* 3 (6): 423–41. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.04.007.

Samanta, Krishna, Gary R. Mirams, and Anant B. Parekh. 2018. "Sequential Forward and Reverse Transport of the Na+ Ca2+ Exchanger Generates Ca2+ Oscillations within Mitochondria." *Nature Communications* 9 (1): 156. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02638-2.

Samaras, Nikolaos, Thierry Chevalley, Dimitrios Samaras, and Gabriel Gold. 2010. "Older Patients in the Emergency Department: A Review." *Annals of Emergency Medicine* 56 (3): 261–69. https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2010.04.015.

Sancak, Yasemin, Andrew L. Markhard, Toshimori Kitami, Erika Kovács-Bogdán, Kimberli J. Kamer, Namrata D. Udeshi, Steven A. Carr, et al. 2013. "EMRE Is an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex." *Science (New York, N.Y.)* 342 (6164): 1379–82. https://doi.org/10.1126/science.1242993.

Sargent, Daniel J., Silvia Marsoni, Genevieve Monges, Stephen N. Thibodeau, Roberto Labianca, Stanley R. Hamilton, Amy J. French, et al. 2010. "Defective Mismatch Repair as a Predictive Marker for Lack of Efficacy of Fluorouracil-Based Adjuvant Therapy in Colon Cancer." *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (20): 3219–26. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.1825.

Sasaki, Kazuhito, Nelson H. Tsuno, Eiji Sunami, Kazushige Kawai, Kumiko Hongo, Masaya Hiyoshi, Manabu Kaneko, et al. 2012. "Resistance of Colon Cancer to 5-Fluorouracil May Be Overcome by Combination with Chloroquine, an in Vivo Study." *Anti-Cancer Drugs* 23 (7): 675–82. https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328353f8c7.

Satoh, Kiyotoshi, Shinichi Yachida, Masahiro Sugimoto, Minoru Oshima, Toshitaka Nakagawa, Shintaro Akamoto, Sho Tabata, et al. 2017. "Global Metabolic Reprogramming of Colorectal Cancer Occurs at Adenoma Stage and Is Induced by MYC." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (37): E7697–7706. https://doi.org/10.1073/pnas.1710366114.

Sauer, Heinrich, Maria Wartenberg, and Jürgen Hescheler. 2001. "Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation." *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 11 (February): 173–86. https://doi.org/10.1159/000047804.

Scherübl, Hans. 2022. "Tobacco Smoking and Gastrointestinal Cancer Risk." *Visceral Medicine* 38 (3): 217–22. https://doi.org/10.1159/000523668.

Seitz, Helmut K., and Felix Stickel. 2007. "Molecular Mechanisms of Alcohol-Mediated Carcinogenesis." *Nature Reviews. Cancer* 7 (8): 599–612. https://doi.org/10.1038/nrc2191.

Sharma, Lokendra K., Jianxin Lu, and Yidong Bai. 2009. "Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases." *Current Medicinal Chemistry* 16 (10): 1266–77.

Sharma, Yati, and Debapriya Garabadu. 2020. "Ruthenium Red, Mitochondrial Calcium Uniporter Inhibitor, Attenuates Cognitive Deficits in STZ-ICV Challenged Experimental Animals." *Brain Research Bulletin* 164 (November): 121–35. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.08.020.

Shibao, Kazunori, Michael J. Fiedler, Jun Nagata, Noritaka Minagawa, Keiji Hirata, Yoshifumi Nakayama, Yasuko Iwakiri, Michael H. Nathanson, and Koji Yamaguchi. 2010. "The Type III Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Is Associated with Aggressiveness of Colorectal Carcinoma." *Cell Calcium* 48 (6): 315–23. https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.005.

Shoshan-Barmatz, Varda, Danya Ben-Hail, Lee Admoni, Yakov Krelin, and Shambhoo Sharan Tripathi. 2015. "The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1 in Tumor Cells." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1848 (10 Pt B): 2547–75. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.040.

Shoshan-Barmatz, Varda, and Dan Gincel. 2003. “The Voltage-Dependent Anion Channel.” *Cell Biochemistry and Biophysics* 39 (3): 279–92. https://doi.org/10.1385/CBB:39:3:279.

Sipos, Ferenc, Gábor Firneisz, and Györgyi Műzes. 2016. “Therapeutic Aspects of C-MYC Signaling in Inflammatory and Cancerous Colonic Diseases.” *World Journal of Gastroenterology* 22 (35): 7938–50. https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i35.7938.

Sjöstrand, Fritiof S. 1953. “Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes: Ultra-Structure of Rod-Shaped Mitochondria.” *Nature* 171 (4340): 30–31. https://doi.org/10.1038/171030a0.

Smani, Tarik, George Shapovalov, Roman Skryma, Natalia Prevarskaya, and Juan A. Rosado. 2015. “Functional and Physiopathological Implications of TRP Channels.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (8): 1772–82. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.016.

Smirnova, E., D. L. Shurland, S. N. Ryazantsev, and A. M. van der Bliek. 1998. “A Human Dynamin-Related Protein Controls the Distribution of Mitochondria.” *The Journal of Cell Biology* 143 (2): 351–58. https://doi.org/10.1083/jcb.143.2.351.

Smith, Bradley, Xenia L. Schafer, Aslihan Ambeskovic, Cody M. Spencer, Hartmut Land, and Joshua Munger. 2016. “Addiction to Coupling of the Warburg Effect with Glutamine Catabolism in Cancer Cells.” *Cell Reports* 17 (3): 821–36. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.045.

Sousa, Joana S., Edoardo D’Imprima, and Janet Vonck. 2018. “Mitochondrial Respiratory Chain Complexes.” In *Membrane Protein Complexes: Structure and Function*, edited by J. Robin Harris and Egbert J. Boekema, 167–227. Subcellular Biochemistry. Singapore: Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7.

Spinelli, Jessica B., and Marcia C. Haigis. 2018. “The Multifaceted Contributions of Mitochondria to Cellular Metabolism.” *Nature Cell Biology* 20 (7): 745–54. https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1.

Stavsky, Alexandra, Ohad Stoler, Marko Kostic, Tomer Katoshevsky, Essam A. Assali, Ivana Savic, Yael Amitai, et al. 2021. “Aberrant Activity of Mitochondrial NCLX Is Linked to Impaired Synaptic Transmission and Is Associated with Mental Retardation.” *Communications Biology* 4 (1): 666. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02114-0.

Stejerean-Todoran, Ioana, Katharina Zimmermann, Christine S Gibhardt, Adina Vultur, Christian Ickes, Batool Shannan, Zuriñe Bonilla del Rio, et al. 2022. “MCU Controls Melanoma Progression through a Redox-Controlled Phenotype Switch.” *EMBO Reports* 23 (11): e54746. https://doi.org/10.15252/embr.202254746.

Stine, Zachary E., Zandra E. Walton, Brian J. Altman, Annie L. Hsieh, and Chi V. Dang. 2015. “MYC, Metabolism, and Cancer.” *Cancer Discovery* 5 (10): 1024–39. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0507.

Sung, Hyuna, Jacques Ferlay, Rebecca L. Siegel, Mathieu Laversanne, Isabelle Soerjomataram, Ahmedin Jemal, and Freddie Bray. 2021. “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71 (3): 209–49. https://doi.org/10.3322/caac.21660.

Svrcek, Magali, Paula Borralho Nunes, Vincenzo Villanacci, Laurent Beaugerie, Gerhard Rogler, Gert De Hertogh, Monika Tripathi, Roger Feakins, and H-ECCO group. 2018. “Clinicopathological and Molecular Specificities of Inflammatory Bowel Disease–Related Colorectal Neoplastic Lesions: The Role of Inflammation.” *Journal of Crohn’s and Colitis* 12 (12): 1486–98. https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjy132.

Taieb, Julien, Magali Svrcek, Romain Cohen, Debora Basile, David Tougeron, and Jean-Marc Phelip. 2022. “Deficient Mismatch Repair/Microsatellite Unstable Colorectal Cancer: Diagnosis, Prognosis and Treatment.” *European Journal of Cancer* 175 (November): 136–57. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2022.07.020.

Tajada, Sendoa, and Carlos Villalobos. 2020. “Calcium Permeable Channels in Cancer Hallmarks.” *Frontiers in Pharmacology* 11: 968. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00968.

Takeuchi, Ayako, and Satoshi Matsuoka. 2022. “Spatial and Functional Crosstalk between the Mitochondrial Na+-Ca2+ Exchanger NCLX and the Sarcoplasmic Reticulum Ca2+ Pump SERCA

in Cardiomyocytes." *International Journal of Molecular Sciences* 23 (14): 7948. https://doi.org/10.3390/ijms23147948.

Tam, Shing Yau, and Vincent W. C. Wu. 2019. "A Review on the Special Radiotherapy Techniques of Colorectal Cancer." *Frontiers in Oncology* 9 (April): 208. https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00208.

Territo, P. R., V. K. Mootha, S. A. French, and R. S. Balaban. 2000. "Ca(2+) Activation of Heart Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Role of the F(0)/F(1)-ATPase." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 278 (2): C423-435. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C423.

Tevoufouet, Etienne E., Erastus N. Nembo, Maxine Dibué-Adjei, Jürgen Hescheler, Filomain Nguemo, and Toni Schneider. 2014. "Cardiac Functions of Voltage-Gated Ca(2+) Channels: Role of the Pharmacoresistant Type (E-/R-Type) in Cardiac Modulation and Putative Implication in Sudden Unexpected Death in Epilepsy (SUDEP)." *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 167: 115–39. https://doi.org/10.1007/112_2014_21.

Tiraby, Claire, and Dominique Langin. 2005. "[PGC-1alpha, a transcriptional coactivator involved in metabolism]." *Medecine Sciences: M/S* 21 (1): 49–54. https://doi.org/10.1051/medsci/200521149.

Tomar, Dhanendra, Zhiwei Dong, Santhanam Shanmughapriya, Diana A. Koch, Toby Thomas, Nicholas E. Hoffman, Shrishiv A. Timbalia, et al. 2016. "MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics." *Cell Reports* 15 (8): 1673–85. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.050.

Tosatto, Anna, Roberta Sommaggio, Carsten Kummerow, Robert B Bentham, Thomas S Blacker, Tunde Berecz, Michael R Duchen, et al. 2016. "The Mitochondrial Calcium Uniporter Regulates Breast Cancer Progression via HIF-1α." *EMBO Molecular Medicine* 8 (5): 569–85. https://doi.org/10.15252/emmm.201606255.

Tran, Quangdon, Hyunji Lee, Jae Hun Jung, Seung-Hee Chang, Robin Shrestha, Gyeyeong Kong, Jisoo Park, et al. 2022. "Emerging Role of LETM1/GRP78 Axis in Lung Cancer." *Cell Death & Disease* 13 (6): 1–15. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04993-5.

Tsai, Chen-Wei, Tsung-Yun Liu, Fan-Yi Chao, Yung-Chi Tu, Madison X. Rodriguez, Anna M. Van Keuren, Zhiwei Ma, John Bankston, and Ming-Feng Tsai. 2023. "Evidence Supporting the MICU1 Occlusion Mechanism and against the Potentiation Model in the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (16): e2217665120. https://doi.org/10.1073/pnas.2217665120.

Tsai, Ming-Feng, Charles B Phillips, Matthew Ranaghan, Chen-Wei Tsai, Yujiao Wu, Carole Williams, and Christopher Miller. 2016. "Dual Functions of a Small Regulatory Subunit in the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex." *eLife* 5 (April): e15545. https://doi.org/10.7554/eLife.15545.

Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J. A. Molina, Hibo Mohamed, Jakob D. Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008. "Fission and Selective Fusion Govern Mitochondrial Segregation and Elimination by Autophagy." *The EMBO Journal* 27 (2): 433–46. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963.

Uchikado, Yoshihiro, Yoshiyuki Ikeda, and Mitsuru Ohishi. 2022. "Current Understanding of the Pivotal Role of Mitochondrial Dynamics in Cardiovascular Diseases and Senescence." *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.905072.

Ujwal, Rachna, Duilio Cascio, Jacques-Philippe Colletier, Salem Faham, Jun Zhang, Ligia Toro, Peipei Ping, and Jeff Abramson. 2008. "The Crystal Structure of Mouse VDAC1 at 2.3 A Resolution Reveals Mechanistic Insights into Metabolite Gating." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (46): 17742–47. https://doi.org/10.1073/pnas.0809634105.

Unterlass, Judith E., and Nicola J. Curtin. 2019. "Warburg and Krebs and Related Effects in Cancer." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 21 (January): e4. https://doi.org/10.1017/erm.2019.4.

Vais, Horia, Karthik Mallilankaraman, Don-On Daniel Mak, Henry Hoff, Riley Payne, Jessica E. Tanis, and J. Kevin Foskett. 2016. “EMRE Is a Matrix Ca2+ Sensor That Governs Gatekeeping of the Mitochondrial Ca2+ Uniporter.” *Cell Reports* 14 (3): 403–10. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.054.

Van Cutsem, Eric, Josep Tabernero, Radek Lakomy, Hans Prenen, Jana Prausová, Teresa Macarulla, Paul Ruff, et al. 2012. “Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated with an Oxaliplatin-Based Regimen.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 30 (28): 3499–3506. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.8201.

Van Den Bossche, Jan, Jeroen Baardman, and Menno P.J. De Winther. 2015. “Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-Derived Macrophages Using Real-Time Extracellular Flux Analysis.” *Journal of Visualized Experiments*, no. 105 (November): 53424. https://doi.org/10.3791/53424.

Vander Heiden, Matthew G., Lewis C. Cantley, and Craig B. Thompson. 2009. “Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation.” *Science (New York, N.Y.)* 324 (5930): 1029–33. https://doi.org/10.1126/science.1160809.

Vecellio Reane, Denis, Francesca Vallese, Vanessa Checchetto, Laura Acquasaliente, Gaia Butera, Vincenzo De Filippis, Ildikò Szabò, Giuseppe Zanotti, Rosario Rizzuto, and Anna Raffaello. 2016. “A MICU1 Splice Variant Confers High Sensitivity to the Mitochondrial Ca2+ Uptake Machinery of Skeletal Muscle.” *Molecular Cell* 64 (4): 760–73. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.001.

Vergeade, Aurelia, Clinton C. Bertram, Alfiya T. Bikineyeva, William E. Zackert, Sandra S. Zinkel, James M. May, Sergey I. Dikalov, L. Jackson Roberts, and Olivier Boutaud. 2016. “Cardiolipin Fatty Acid Remodeling Regulates Mitochondrial Function by Modifying the Electron Entry Point in the Respiratory Chain.” *Mitochondrion* 28 (May): 88–95. https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.04.002.

Vishnu, N., A. Hamilton, A. Bagge, A. Wernersson, E. Cowan, H. Barnard, Y. Sancak, et al. 2021. “Mitochondrial Clearance of Calcium Facilitated by MICU2 Controls Insulin Secretion.” *Molecular Metabolism* 51 (September): 101239. https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101239.

Vultur, Adina, Christine S. Gibhardt, Hedwig Stanisz, and Ivan Bogeski. 2018. “The Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) Complex in Cancer.” *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 470 (8): 1149–63. https://doi.org/10.1007/s00424-018-2162-8.

Vyas, Sejal, Elma Zaganjor, and Marcia C. Haigis. 2016. “Mitochondria and Cancer.” *Cell* 166 (3): 555–66. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.002.

Wacquier, Benjamin, Laurent Combettes, and Geneviève Dupont. 2019. “Cytoplasmic and Mitochondrial Calcium Signaling: A Two-Way Relationship.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (10): a035139. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035139.

Wadhwa, Renu, Syuichi Takano, Kamaljit Kaur, Custer C. Deocaris, Olivia M. Pereira-Smith, Roger R. Reddel, and Sunil C. Kaul. 2006. “Upregulation of Mortalin/Mthsp70/Grp75 Contributes to Human Carcinogenesis.” *International Journal of Cancer* 118 (12): 2973–80. https://doi.org/10.1002/ijc.21773.

Wagner, Konstanze M., Marcel Rüegg, Axel Niemann, and Ueli Suter. 2009. “Targeting and Function of the Mitochondrial Fission Factor GDAP1 Are Dependent on Its Tail-Anchor.” *PLoS ONE* 4 (4): e5160. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005160.

Wang, Chongyuan, Rozbeh Baradaran, and Stephen Barstow Long. 2020. “Structure and Reconstitution of an MCU–EMRE Mitochondrial Ca2+ Uniporter Complex.” *Journal of Molecular Biology* 432 (20): 5632–48. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.08.013.

Wang, J.-Y., J. Sun, M.-Y. Huang, Y.-S. Wang, M.-F. Hou, Y. Sun, H. He, et al. 2015. “STIM1 Overexpression Promotes Colorectal Cancer Progression, Cell Motility and COX-2 Expression.” *Oncogene* 34 (33): 4358–67. https://doi.org/10.1038/onc.2014.366.

Wang, Wenjian, Yin Wang, Jianyin Long, Jinrong Wang, Sandra B. Haudek, Paul Overbeek, Benny H.J. Chang, Paul T. Schumacker, and Farhad R. Danesh. 2012. “Mitochondrial Fission Triggered by Hyperglycemia Is Mediated by ROCK1 Activation in Podocytes and Endothelial Cells.” *Cell Metabolism* 15 (2): 186–200. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.01.009.

Wang, Yan, Nam X. Nguyen, Ji She, Weizhong Zeng, Yi Yang, Xiao-Chen Bai, and Youxing Jiang. 2019. “Structural Mechanism of EMRE-Dependent Gating of the Human Mitochondrial Calcium Uniporter.” *Cell* 177 (5): 1252-1261.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.050.

Wang, Ying-Nan, Zhao-Lei Zeng, Jiahuan Lu, Yun Wang, Ze-Xian Liu, Ming-Ming He, Qi Zhao, et al. 2018. “CPT1A-Mediated Fatty Acid Oxidation Promotes Colorectal Cancer Cell Metastasis by Inhibiting Anoikis.” *Oncogene* 37 (46): 6025–40. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0384-z.

Warburg, Otto, Franz Wind, and Erwin Negelein. 1927. “THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY.” *The Journal of General Physiology* 8 (6): 519–30.

Weiss, H., T. Friedrich, G. Hofhaus, and D. Preis. 1991. “The Respiratory-Chain NADH Dehydrogenase (Complex I) of Mitochondria.” *European Journal of Biochemistry* 197 (3): 563–76. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15945.x.

Wersäll, Ofra Castro, Lina Löfstedt, Igor Govorov, Miriam Mints, Marike Gabrielson, and Maria Shoshan. 2021. “PGC1α and VDAC1 Expression in Endometrial Cancer.” *Molecular and Clinical Oncology* 14 (2): 42. https://doi.org/10.3892/mco.2020.2203.

Wiedemann, Nils, and Nikolaus Pfanner. 2017. “Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly.” *Annual Review of Biochemistry* 86 (June): 685–714. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014352.

Wu, Wenping, Qingya Shen, Zhen Lei, Zhiyu Qiu, Dan Li, Hairun Pei, Jimin Zheng, and Zongchao Jia. 2019. “The Crystal Structure of MICU2 Provides Insight into Ca2+ Binding and MICU1-MICU2 Heterodimer Formation.” *EMBO Reports* 20 (9): e47488. https://doi.org/10.15252/embr.201847488.

Wu, Wenping, Qingya Shen, Ruiling Zhang, Zhiyu Qiu, Youjun Wang, Jimin Zheng, and Zongchao Jia. 2020a. “The Structure of the MICU 1- MICU 2 Complex Unveils the Regulation of the Mitochondrial Calcium Uniporter.” *The EMBO Journal* 39 (19): e104285. https://doi.org/10.15252/embj.2019104285.

———. 2020b. “The Structure of the MICU1-MICU2 Complex Unveils the Regulation of the Mitochondrial Calcium Uniporter.” *The EMBO Journal* 39 (19): e104285. https://doi.org/10.15252/embj.2019104285.

Wu, Wenping, Jimin Zheng, and Zongchao Jia. 2021. “Structural Characterization of the Mitochondrial Ca2+ Uniporter Provides Insights into Ca2+ Uptake and Regulation.” *iScience* 24 (8): 102895. https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102895.

Xie, Jiansheng, Hongming Pan, Junlin Yao, Yubin Zhou, and Weidong Han. 2016. “SOCE and Cancer: Recent Progress and New Perspectives.” *International Journal of Cancer* 138 (9): 2067–77. https://doi.org/10.1002/ijc.29840.

Xie, Yangli, Nan Su, Jing Yang, Qiaoyan Tan, Shuo Huang, Min Jin, Zhenhong Ni, et al. 2020. “FGF/FGFR Signaling in Health and Disease.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 181. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00222-7.

Xu, Yi-Fan, Xin Zhao, David S. Glass, Farnaz Absalan, David H. Perlman, James R. Broach, and Joshua D. Rabinowitz. 2012. “Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allostery Independent of Phosphorylation.” *Molecular Cell* 48 (1): 52–62. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.013.

Xue, Kaili, Dongmei Wu, Yushuang Wang, Yiheng Zhao, Hongyu Shen, Jingfei Yao, Xun Huang, et al. 2022. “The Mitochondrial Calcium Uniporter Engages UCP1 to Form a Thermoporter That Promotes Thermogenesis.” *Cell Metabolism* 34 (9): 1325-1341.e6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2022.07.011.

Yamaguchi, Naohiro. 2020. “Molecular Insights into Calcium Dependent Regulation of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1131: 321–36. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12457-1_13.

Yamamoto, Takenori, Ryohei Yamagoshi, Kazuki Harada, Mayu Kawano, Naoki Minami, Yusuke Ido, Kana Kuwahara, et al. 2016. “Analysis of the Structure and Function of EMRE in a Yeast Expression System.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1857 (6): 831–39. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.03.019.

Yang, Guochao, Dianwei Zhou, Jun Li, Wei Wang, Wei Zhong, Wei Fan, Mancheng Yu, and Hongtao Cheng. 2019. “VDAC1 Is Regulated by BRD4 and Contributes to JQ1 Resistance in Breast Cancer.” *Oncology Letters* 18 (3): 2340–47. https://doi.org/10.3892/ol.2019.10534.

Yoast, Ryan E., Scott M. Emrich, Xuexin Zhang, Ping Xin, Vikas Arige, Trayambak Pathak, J. Cory Benson, et al. 2021. “The Mitochondrial Ca2+ Uniporter Is a Central Regulator of Interorganellar Ca2+ Transfer and NFAT Activation.” *The Journal of Biological Chemistry* 297 (4): 101174. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101174.

Yu, Zhengying, Haipeng Wang, Wanyi Tang, Shaoyang Wang, Xiaoying Tian, Yujie Zhu, and Hao He. 2021. “Mitochondrial Ca2+ Oscillation Induces Mitophagy Initiation through the PINK1-Parkin Pathway.” *Cell Death & Disease* 12 (7): 1–7. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03913-3.

Yun, Jihye, Carlo Rago, Ian Cheong, Ray Pagliarini, Philipp Angenendt, Harith Rajagopalan, Kerstin Schmidt, et al. 2009. “Glucose Deprivation Contributes to the Development of KRAS Pathway Mutations in Tumor Cells.” *Science (New York, N.Y.)* 325 (5947): 1555–59. https://doi.org/10.1126/science.1174229.

Yung, Susan, Sing Leung Lui, Chris K.F. Ng, Andrew Yim, Maggie K.M. Ma, Kin Yee Lo, Chik Cheung Chow, et al. 2015. “Impact of a Low-Glucose Peritoneal Dialysis Regimen on Fibrosis and Inflammation Biomarkers.” *Peritoneal Dialysis International : Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis* 35 (2): 147–58. https://doi.org/10.3747/pdi.2014.00125.

Zang, Jie, Dongqing Zuo, Kristen L. Shogren, Carl T. Gustafson, Zifei Zhou, Michael A. Thompson, Ruiwei Guo, et al. 2019. “STIM1 Expression Is Associated with Osteosarcoma Cell Survival.” *Chinese Journal of Cancer Research = Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu* 31 (1): 203–11. https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2019.01.15.

Zauber, Ann G., Sidney J. Winawer, Michael J. O’Brien, Iris Lansdorp-Vogelaar, Marjolein van Ballegooijen, Benjamin F. Hankey, Weiji Shi, et al. 2012. “Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths.” *The New England Journal of Medicine* 366 (8): 687–96. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100370.

Zaytseva, Yekaterina Y., Piotr G. Rychahou, Pat Gulhati, Victoria A. Elliott, William C. Mustain, Kathleen O’Connor, Andrew J. Morris, et al. 2012. “Inhibition of Fatty Acid Synthase Attenuates CD44-Associated Signaling and Reduces Metastasis in Colorectal Cancer.” *Cancer Research* 72 (6): 1504–17. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4057.

Zeng, Fanxin, Xiao Chen, Weiyi Cui, Wei Wen, Fujian Lu, Xueting Sun, Dongwei Ma, et al. 2018. “RIPK1 Binds MCU to Mediate Induction of Mitochondrial Ca2+ Uptake and Promotes Colorectal Oncogenesis.” *Cancer Research* 78 (11): 2876–85. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3082.

Zhang, Jieping, Shaomin Zou, and Lekun Fang. 2023. “Metabolic Reprogramming in Colorectal Cancer: Regulatory Networks and Therapy.” *Cell & Bioscience* 13 (1): 25. https://doi.org/10.1186/s13578-023-00977-w.

Zhang, Li, Felicia Dietsche, Bruno Seitaj, Liliana Rojas-Charry, Nadina Latchman, Dhanendra Tomar, Rob CI Wüst, et al. 2022. “TMBIM5 Loss of Function Alters Mitochondrial Matrix Ion Homeostasis and Causes a Skeletal Myopathy.” *Life Science Alliance* 5 (10): e202201478. https://doi.org/10.26508/lsa.202201478.

Zhang, Z., X. Liu, B. Feng, N. Liu, Q. Wu, Y. Han, Y. Nie, K. Wu, Y. Shi, and D. Fan. 2015. “STIM1, a Direct Target of microRNA-185, Promotes Tumor Metastasis and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer.” *Oncogene* 34 (37): 4808–20. https://doi.org/10.1038/onc.2014.404.

Zhu, Jianjun, Wentao Zhang, Jingjia Chang, Jin Wu, Hao Wu, Xintong Zhang, Zhigao Ou, et al. 2023. “Identification and Validation of a Mitochondria Calcium Uptake-Related Gene Signature for

Predicting Prognosis in COAD." *Journal of Cancer* 14 (5): 741–58. https://doi.org/10.7150/jca.81811.

Zhuo, Wei, Heng Zhou, Runyu Guo, Jingbo Yi, Laixing Zhang, Lei Yu, Yinqiang Sui, Wenwen Zeng, Peiyi Wang, and Maojun Yang. 2021. "Structure of Intact Human MCU Supercomplex with the Auxiliary MICU Subunits." *Protein & Cell* 12 (3): 220–29. https://doi.org/10.1007/s13238-020-00776-w.

Zoccarato, F., and D. Nicholls. 1982. "The Role of Phosphate in the Regulation of the Independent Calcium-Efflux Pathway of Liver Mitochondria." *European Journal of Biochemistry* 127 (2): 333–38. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb06875.x.

Zorova, Ljubava D., Vasily A. Popkov, Egor Y. Plotnikov, Denis N. Silachev, Irina B. Pevzner, Stanislovas S. Jankauskas, Valentina A. Babenko, et al. 2018. "Mitochondrial Membrane Potential." *Analytical Biochemistry* 552 (July): 50–59. https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.07.009.

Annexes

Annexe I : L'échangeur ionique NCLX. Un rôle ambivalent dans la chronologie du cancer colorectal.

Annexe II : Curcumin and NCLX inhibitors share anti-tumoral mechanisms in microsatellite-instability-driven colorectal cancer.

Annexe III : Calcium signaling : A therapeutic target to overcome resistance to therapies in cancer.

L'échangeur ionique NCLX

Un rôle ambivalent dans la chronologie du cancer colorectal

Maxime Guéguinou[1], Trayambak Pathak[2], Alison Robert[1], Christophe Vandier[1], Mohamed Trebak[2], Thierry Lecomte[1,3], William Raoul[1]

[1]Université de Tours, Inserm UMR 1069, Nutrition, croissance et cancer (N2C), Faculté de médecine, 10 boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France.
[2]Département de physiologie cellulaire et moléculaire, Université de Pennsylvanie, Faculté de médecine, 500 University drive, Hershey, PA 17033, États-Unis.
[3]CHRU de Tours, Département d'hépato-gastroentérologie et d'oncologie digestive, avenue de la République, 37170 Chambray-lès-Tours, France.
william.raoul@inserm.fr

> L'ion calcium (Ca^{2+}) est impliqué dans différents processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la migration, ou encore la mort cellulaire par apoptose [1]. Il n'est donc pas surprenant qu'une dérégulation de l'homéostasie calcique favorise le développement du cancer [2]. La signalisation calcique implique presque toujours un influx de Ca^{2+} à travers des canaux ou échangeurs calciques membranaires. Ces derniers sont souvent exprimés de façon aberrante dans les cellules tumorales, dans lesquelles leur fonction semble détournée pour promouvoir la survie cellulaire ou la formation de métastases. Les mitochondries produisent l'adénosine triphosphate (ATP), principale source d'énergie pour la cellule, et participent activement à la signalisation calcique. Les mitochondries stockent les ions Ca^{2+} principalement sous la forme de précipités de $Ca_3(PO_4)_2$ dans la matrice mitochondriale. La formation de ces précipités est dépendante du pH, et réversible lors de l'effondrement du potentiel de membrane mitochondrial par les translocateurs de protons (protonophores), qui libèrent les ions Ca^{2+} du complexe $Ca_3(PO_4)_2$ [3], ce qui entraînera *in fine* l'efflux d'ions Ca^{2+} des mitochondries vers le cytosol par les acteurs moléculaires décrits ci-dessous.

Malgré la force électromotrice des ions Ca^{2+} favorisant leur entrée à travers la membrane mitochondriale interne, les mitochondries ont une très faible affinité pour le transport des ions Ca^{2+}. Il est proposé que le transfert des ions Ca^{2+} dans les mitochondries se situe dans des régions spécialisées de contacts étroits entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique : les « membranes associées aux mitochondries » (MAM). Au sein des MAM, la libération de Ca^{2+} entre les deux organites, consécutive à la fixation d'inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) sur les canaux récepteurs de l'IP3 du réticulum endoplasmique, entraîne une libération d'ions Ca^{2+}, dont la concentration est alors proche de 1 µM au voisinage des mitochondries. Pour atteindre la matrice mitochondriale, les ions Ca^{2+} doivent traverser les membranes mitochondriales externe puis interne. La membrane mitochondriale externe est perméable aux molécules de moins de 5 kDa, et les ions Ca^{2+} diffusent facilement à travers cette membrane. Cette perméabilité aux ions Ca^{2+} implique le canal anionique peu sélectif VDAC (*voltage-dependent anion channel*). La perméabilité aux ions de la membrane mitochondriale interne est en revanche beaucoup plus sélective. L'entrée des ions Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale à travers la membrane interne implique le canal calcique MCU (*mitochondrial calcium uniporter*) [4]. On sait maintenant que MCU fonctionne au sein d'un grand complexe moléculaire composé de MCU, de protéines d'absorption du Ca^{2+} mitochondriales (MICU1, MICU2 et MICU3) et d'une protéine régulatrice de 10 kDa appelée régulateur essentiel de MCU I (EMRE), ainsi que de plusieurs autres protéines comme MCUR1, SLC25A23 et MCUb [5]. L'extrusion mitochondriale des ions Ca^{2+}, quant à elle, implique l'échangeur ionique $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ ou NCLX (codé par le gène *SLC8B1*) de la membrane mitochondriale interne [6]. Des études réalisées dans les années 1960-1970 ont montré que l'absorption mitochondriale des ions Ca^{2+} dépendait d'un potentiel membranaire mitochondrial élevé ($\Delta\psi \cong -180$ mV) et était inhibée par le rouge de ruthénium [7]. La chaîne de transport mitochondrial des électrons transfère les protons à travers la membrane mitochondriale interne dans l'espace inter-membranaire, produisant ainsi un gradient électrochimique de protons qui orchestre la synthèse de l'ATP. Ce potentiel de membrane mitochondrial contribue également à la force motrice favorisant l'absorption des ions Ca^{2+} cytosoliques par les mitochondries [8]. Les variations de la concentration intra-mitochondriale des ions Ca^{2+} (de 0,1 µM au mM) sont essentielles pour la bioénergétique cellulaire. Trois enzymes déshydrogénases du cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) sont régulées par les ions Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale [9]. Ainsi, le signal Ca^{2+} cytosolique consécutif à l'activation des récepteurs (à activité tyrosine-kinase ou couplés à des protéines G) de la membrane plasmique se propage jusqu'aux mitochondries, améliorant ainsi la fonction respiratoire, l'extrusion des ions H^+ et la synthèse d'ATP. À l'échelle cellulaire, cette signalisation calcique permet donc un couplage efficace entre la stimulation de récepteurs dans la membrane plasmique et la production d'ATP.

https://doi.org/10.1051/medsci/2020274

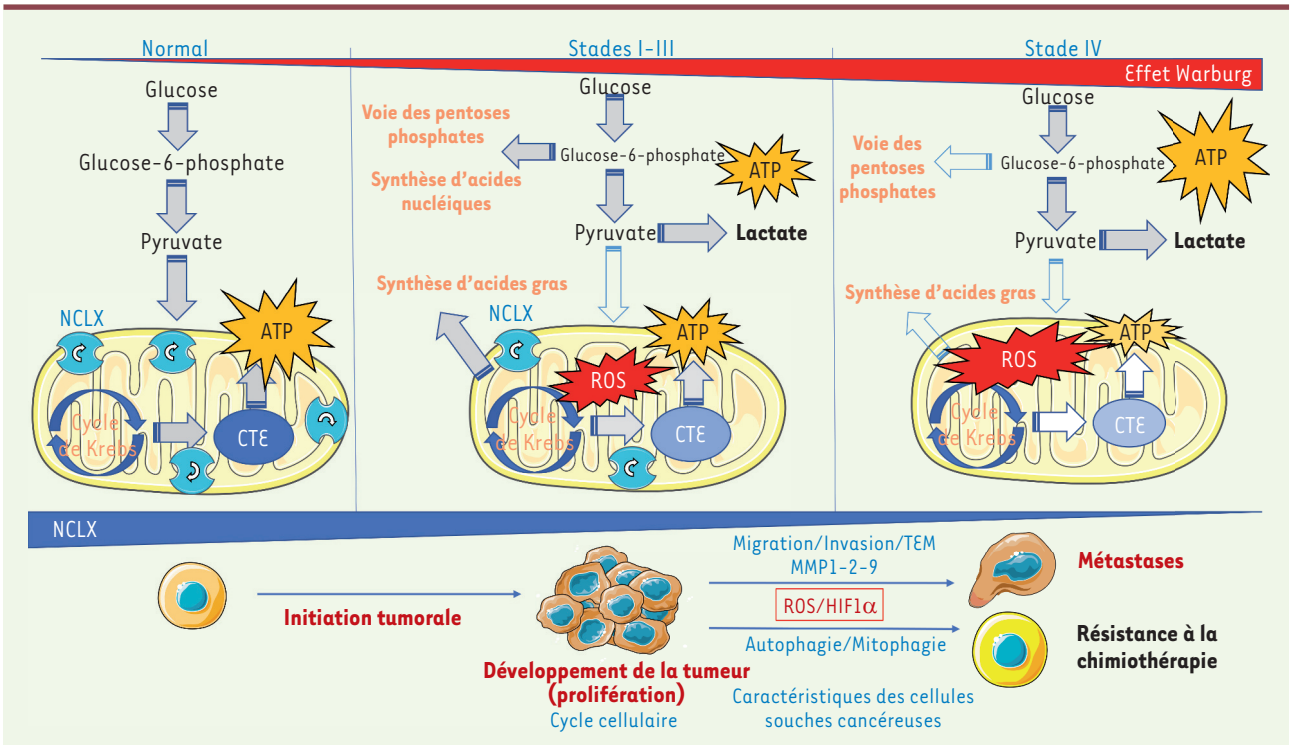


Figure 1. ***Processus pathogéniques et voies métaboliques liés à l'échangeur ionique NCLX au cours de l'initiation et du développement du cancer colorectal.*** ATP : adénosine tri-phosphate ; NCLX : échangeur ionique $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$; CTE : chaîne de transfert d'électrons ; TEM : transition épithélio-mésenchymateuse ; ROS (*reactive oxygen species*) : espèces réactives de l'oxygène ; HIF1α : facteur de transcription induit par l'hypoxie 1α ; MMP : métalloprotéinases matricielles.

Le rôle des mitochondries dans le développement du cancer est désormais établi [10], mais les mécanismes par lesquels le calcium mitochondrial est impliqué dans la tumorigenèse ne sont pas encore complètement élucidés. De nouveaux éléments d'explication proviennent des résultats de notre récente étude, qui a permis de mettre en évidence le rôle de l'échangeur NCLX dans le cancer colorectal grâce à des modèles *in vitro* et *in vivo* chez la souris, ainsi que chez les patients [11]. Dans un modèle de cancer colorectal induit par azoxyméthane et dextran sulfate de sodium, les souris invalidées (*knockout*, KO) pour NCLX présentent un nombre réduit de tumeurs et des volumes tumoraux plus faibles que les souris témoins de génotype « sauvage ». Cette réduction du volume tumoral est également observée dans un modèle murin de xénogreffe tumorale orthotopique, lorsque les cellules coliques cancéreuses humaines injectées à la souris sont dépourvues de NCLX. *In vitro*, la suppression de l'expression de NCLX par la stratégie CRISPR/Cas9, ou sa diminution en utilisant des petits ARN artificiels « en épingle à cheveux » (shARN), dans des cellules de lignées coliques cancéreuses entraîne 1) une surcharge mitochondriale en ions Ca^{2+}, 2) une dépolarisation mitochondriale, 3) une diminution de l'expression des gènes du cycle cellulaire réprimant la prolifération cellulaire, et 4) une augmentation de l'expression des gènes régulant l'apoptose. Nous avons également montré le rôle essentiel de NCLX dans le contrôle de certaines voies métaboliques associées à la prolifération tumorale, comme la voie des pentoses phosphates et les voies de synthèses des acides nucléiques et des acides gras [11].

Cependant, en dehors de ces résultats indiquant un intérêt potentiel d'inhiber NCLX pour traiter le cancer colorectal, la suppression ou la diminution de l'expression de NCLX dans les lignées de cellules cancéreuses coliques et dans les modèles *in vivo* a également révélé un rôle antitumoral de NCLX. En effet, la suppression ou la diminution de l'expression de NCLX favorise 1) l'apparition de métastases, observée dans un modèle murin de xénogreffe tumorale orthotopique, 2) la résistance au 5-fluorouracile (5-FU), une molécule utilisée en chimiothérapie anti-cancéreuse, 3) l'expression des transcrits impliqués dans les voies de signalisation liées à la transition épithélio-mésenchymateuse et à l'hypoxie (analyse d'enrichissement fonctionnel ou *gene set enrichment analysis, GSEA*), 4) l'expression des transcrits impliqués dans les voies caractéristiques des cellules souches tumorales (analyse GSEA), et 5) une activation de l'autophagie. La perte de NCLX entraîne une surcharge mitochondriale en ions Ca^{2+} liée à la production accrue de dérivés réactifs de

l'oxygène dans les mitochondries, ce qui active le facteur HIF1α (*hypoxia inducible factor 1α*) et la glycolyse. L'ensemble de ces phénomènes promeut à son tour le caractère métastatique des cellules tumorales déficientes pour NCLX. Chez les patients, la diminution de l'expression de NCLX mise en évidence dans les tumeurs colorectales est associée aux stades avancés de la maladie.

Ainsi, NCLX a un effet ambivalent dans le cancer colorectal selon une chronologie précise *(Figure 1)*. La diminution d'expression et de fonction de NCLX entraîne, d'une part, une réduction significative de la croissance tumorale, mais, d'autre part, participe ensuite à l'établissement d'un phénotype mésenchymateux qui conduit à l'apparition de métastases et favorise la résistance à la chimiothérapie. Cependant, l'ensemble des résultats *in vitro* que nous avons obtenus jusqu'à présent l'ont été sur des cellules qui se sont adaptées afin de survivre en l'absence de NCLX. Il est désormais nécessaire d'utiliser également des approches pharmacologiques ciblant NCLX pour tenter de savoir s'il est un ennemi ou au contraire un allié dans le traitement du cancer colorectal. ◊

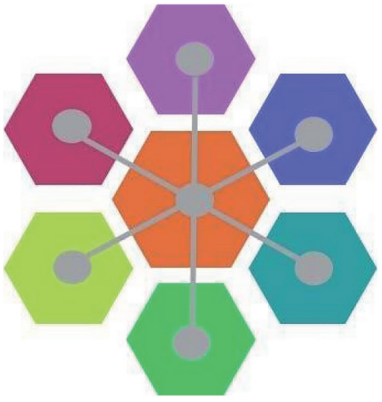
NCLX exchanger: An ambivalent role in colorectal cancer timeline

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 ; 4 : 517-29.
2. Potier-Cartereau M, Raoul W, Weber G, *et al*. Potassium and calcium channel complexes as novel targets for cancer research. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2020 ; doi: 10.1007/112_2020_24.
3. Zoccarato F, Nicholls D. The role of phosphate in the regulation of the independent calcium-efflux pathway of liver mitochondria. *Eur J Biochem* 1982 ; 127 : 333-8.
4. Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, *et al.* Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011 ; 476 : 341-5.
5. Pathak T, Trebak M. Mitochondrial Ca^{2+} signaling. *Pharmacol Ther* 2018 ; 192 : 112-23.
6. Palty R, Silverman WF, Hershfinkel M, *et al.* NCLX is an essential component of mitochondrial Na^{+}/Ca^{2+} exchange. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 436-41.
7. Moore CL. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{++} transport by ruthenium red. *Biochem Biophys Res Commun* 1971 ; 42 : 298-305.
8. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 ; 13 : 566-78.
9. McCormack JG, Halestrap AP, Denton RM. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 1990 ; 70 : 391-425.
10. Yang Y, Karakhanova S, Hartwig W, *et al.* Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy. *J Cell Physiol* 2016 ; 231 : 2570-81.
11. Pathak T, Gueguinou M, Walter V, *et al.* Dichotomous role of the human mitochondrial $Na^{+}/Ca^{2+}/Li^{+}$ exchanger NCLX in colorectal cancer growth and metastasis. *Elife* 2020 ; 9.



Global Registry for COL6-related dystrophies

Registre global des dystrophies liées au collagène de type VI

S'inscrire sur : www.collagen6.org

Ou contactez-nous par e-mail à l'adresse : collagen6registry@ncl.ac.uk

La traduction française sera bientôt disponible sur le site web.

Newcastle University · TREAT-NMD Neuromuscular Network · The John Walton Muscular Dystrophy Research Centre

Muscular Dystrophy UK Fighting muscle-wasting conditions · cureCMD a cure is among us · AFMTÉLÉTHON INNOVER POUR GUERIR · fsrmm fondation suisse de recherche sur les maladies musculaires

Cellular and Molecular Life Sciences (2022) 79:284
https://doi.org/10.1007/s00018-022-04311-4

ORIGINAL ARTICLE

Curcumin and NCLX inhibitors share anti-tumoral mechanisms in microsatellite-instability-driven colorectal cancer

Maxime Guéguinou[1,3] · Sajida Ibrahim[1] · Jérôme Bourgeais[2] · Alison Robert[3] · Trayambak Pathak[4] · Xuexin Zhang[4] · David Crottès[3] · Jacques Dupuy[5] · David Ternant[1,6] · Valérie Monbet[7] · Roseline Guibon[3] · Hector Flores-Romero[8,9,10] · Antoine Lefèvre[11] · Stéphanie Lerondel[12] · Alain Le Pape[12] · Jean-François Dumas[3] · Philippe G. Frank[3] · Alban Girault[13] · Romain Chautard[1] · Françoise Guéraud[5] · Ana J. García-Sáez[8,9,10] · Mehdi Ouaissi[6] · Patrick Emond[11] · Olivier Sire[14] · Olivier Hérault[2] · Gaëlle Fromont-Hankard[3] · Christophe Vandier[3] · David Tougeron[15] · Mohamed Trebak[4] · William Raoul[1,3] · Thierry Lecomte[1,3,16]

Received: 31 January 2022 / Revised: 5 April 2022 / Accepted: 15 April 2022 / Published online: 8 May 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2022

Abstract

Background and aims Recent evidences highlight a role of the mitochondria calcium homeostasis in the development of colorectal cancer (CRC). To overcome treatment resistance, we aimed to evaluate the role of the mitochondrial sodium-calcium–lithium exchanger (NCLX) and its targeting in CRC. We also identified curcumin as a new inhibitor of NCLX.

Methods We examined whether curcumin and pharmacological compounds induced the inhibition of NCLX-mediated mitochondrial calcium ($mtCa^{2+}$) extrusion, the role of redox metabolism in this process. We evaluated their anti-tumorigenic activity in vitro and in a xenograft mouse model. We analyzed NCLX expression and associations with survival in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset and in tissue microarrays from 381 patients with microsatellite instability (MSI)-driven CRC.

Results In vitro, curcumin exerted strong anti-tumoral activity through its action on NCLX with $mtCa^{2+}$ and reactive oxygen species overload associated with a mitochondrial membrane depolarization, leading to reduced ATP production and apoptosis. NCLX inhibition with pharmacological and molecular approaches reproduced the effects of curcumin. NCLX inhibitors decreased CRC tumor growth in vivo. Both transcriptomic analysis of TCGA dataset and immunohistochemical analysis of tissue microarrays demonstrated that higher NCLX expression was associated with MSI status, and for the first time, NCLX expression was significantly associated with recurrence-free survival.

Conclusions Our findings highlight a novel anti-tumoral mechanism of curcumin through its action on NCLX and mitochondria calcium overload that could benefit for therapeutic schedule of patients with MSI CRC.

Keywords Calcium signaling · Mitochondria · NCLX · Curcumin · Colorectal cancer

Introduction

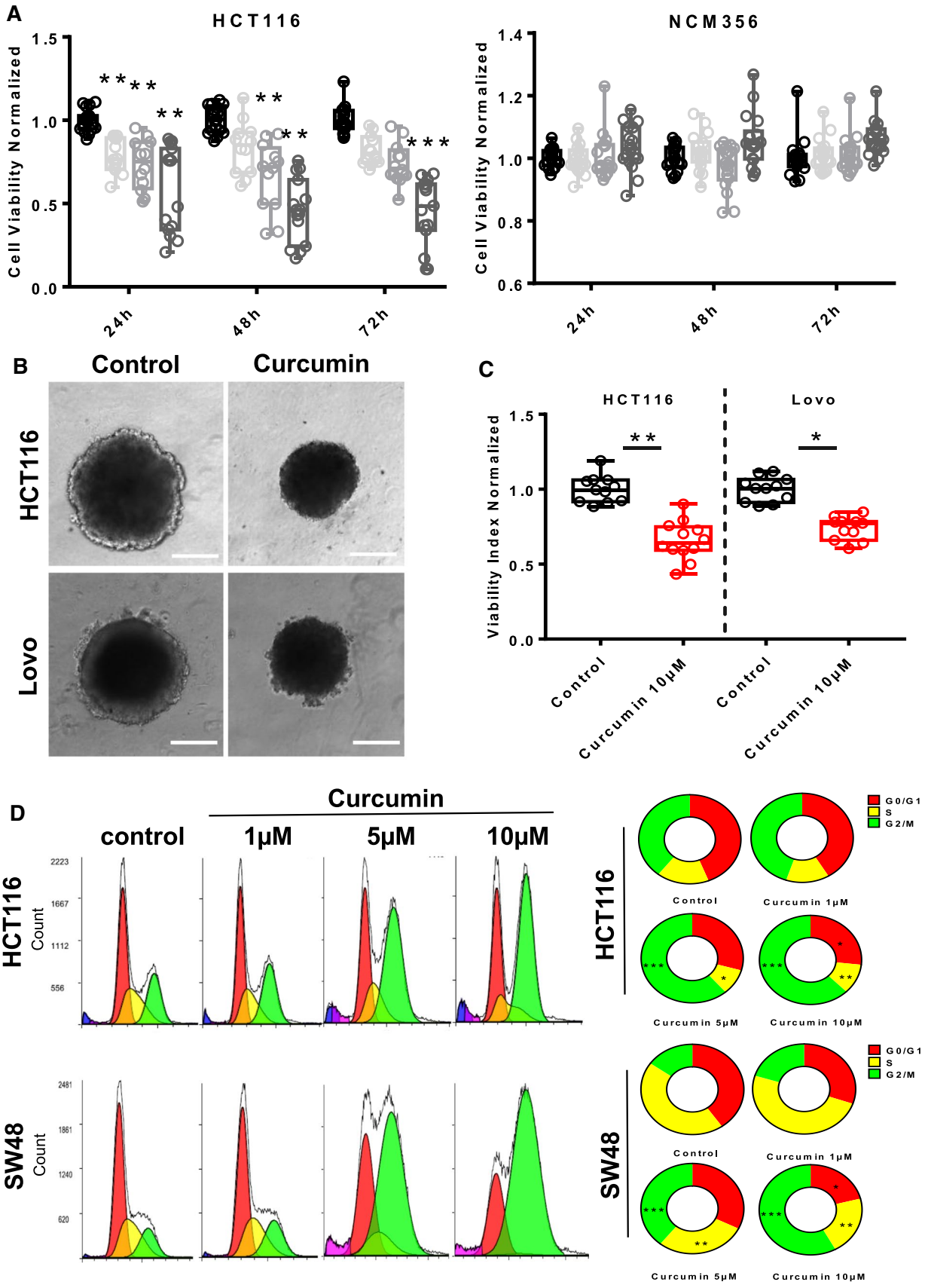
Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide and remains a major public health issue. CRC development is a multi-step process involving distinct stages: initiation, promotion and progression that ultimately generates phenotypically altered transformed malignant cells. Understanding the mechanisms that drive tumor hallmarks is critical for the prevention and treatment of CRC progression using drugs acting on these identified mechanisms. Based on the current state of knowledge, CRC develops mainly through a progressive accumulation of genetic alterations by three major mechanisms. The most common is chromosomal instability (CIN) in 75% of CRCs; the second most common is epigenetic modification of DNA methylation, also called the CpG island methylator phenotype (CIMP), in 20% of CRCs; the third most common is microsatellite instability (MSI) or deficiency of DNA-mismatch repair system (dMMR), which occurs in approximately 15% of CRCs

William Raoul and Thierry Lecomte (senior authors) have contributed equally to this work.

✉ Maxime Guéguinou
maxime.gueguinou@univ-tours.fr

✉ Thierry Lecomte
thierry.lecomte@univ-tours.fr

Extended author information available on the last page of the article


A
HCT116
NCM356
Cell Viability Normalized
24h
48h
72h
B
Control
Curcumin
HCT116
Lovo
C
HCT116
Lovo
Viability Index Normalized
Control
Curcumin 10µM
D
Curcumin
control
1µM
5µM
10µM
HCT116
SW48
Count
G0/G1
S
G2/M
Curcumin 1µM
Curcumin 5µM
Curcumin 10µM

◂**Fig. 1** Curcumin exerts anti-proliferative effects on human CRC cells by inducing G2/M cell cycle arrest. **A** NCM356 and HCT116 were incubated with various concentrations of curcumin (0–10 µM) for 24, 48 or 72 h, and cell viability was measured using the MTT or SRB cell viability assay (supplementary data Fig. 1). ($n=3$–5 independent experiments; ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons, $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$). **B** Lovo and HCT116 3D spheroids were exposed to 10 µM curcumin for 72 h. The area of spheroids after incubation with 10 µM curcumin (72 h) was measured using ImageJ software. **C** The cell viability index was evaluated by measuring resofulvin reduction in HCT116 and Lovo cells ($n=5$ independent experiments; Mann–Whitney test, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$). **D** Curcumin triggered G2/M cell cycle arrest in CRC cells ($n=5$ independent experiments; ANOVA followed by Tukey' post hoc multiple comparisons, $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$)

[1]. MSI CRC cell lines are more resistant to 5-fluorouracil (5-FU) compared with microsatellite stable (MSS) cell lines [2]. Indeed, determination of the dMMR/MSI status in CRC has prognostic and therapeutic implications [3]. In addition, MSI is associated with a better prognosis in early stage CRC but a worse prognosis at advanced stages [4].

Several preclinical studies support the anti-tumoral properties of curcumin against CRC [5, 6]. Curcumin, also known as turmeric or diferuloylmethane, is a natural yellow-pigmented polyphenol extracted from the plant *Curcuma longa*. This compound is a highly pleiotropic molecule with numerous targets and mechanisms of action and modulates several pathways [5]. Curcumin is viewed as a potential CRC chemopreventive agent because of its effect on multiple tumor progression pathways [7]. Chemoprevention is a promising strategy for reducing CRC incidence. In CRC, the MMR system strongly influences the sensitivity of cells to curcumin. Specifically, the MMR system modulates curcumin sensitivity through induction of DNA-strand breaks and activation of the G2/M checkpoint [8]. In tumor cells, curcumin participates in mitochondria-dependent apoptotic processes [9]. Curcumin affects mitochondria-associated proteins, such as Bax, Bcl-2, and Bcl-xL, and reactive oxygen species (ROS) production [10]. Curcumin increases rat liver mitochondrial membrane permeability, resulting in swelling, loss of membrane potential, and inhibition of adenosine triphosphate (ATP) synthesis [11]. Recently, intracellular distribution of curcumin has been correlated with mitochondrial staining [12]. Notably, Jelinek and colleagues demonstrated a preferred association of curcumin with cardiolipins, lipids mainly localized in the inner mitochondrial membrane [12]. Despite an abundant literature concerning curcumin and its effects, the molecular mechanisms of action remain poorly described, in particular the link between mitochondrial redox status and mitochondria-associated redox and calcium (Ca^{2+}) signaling mechanisms.

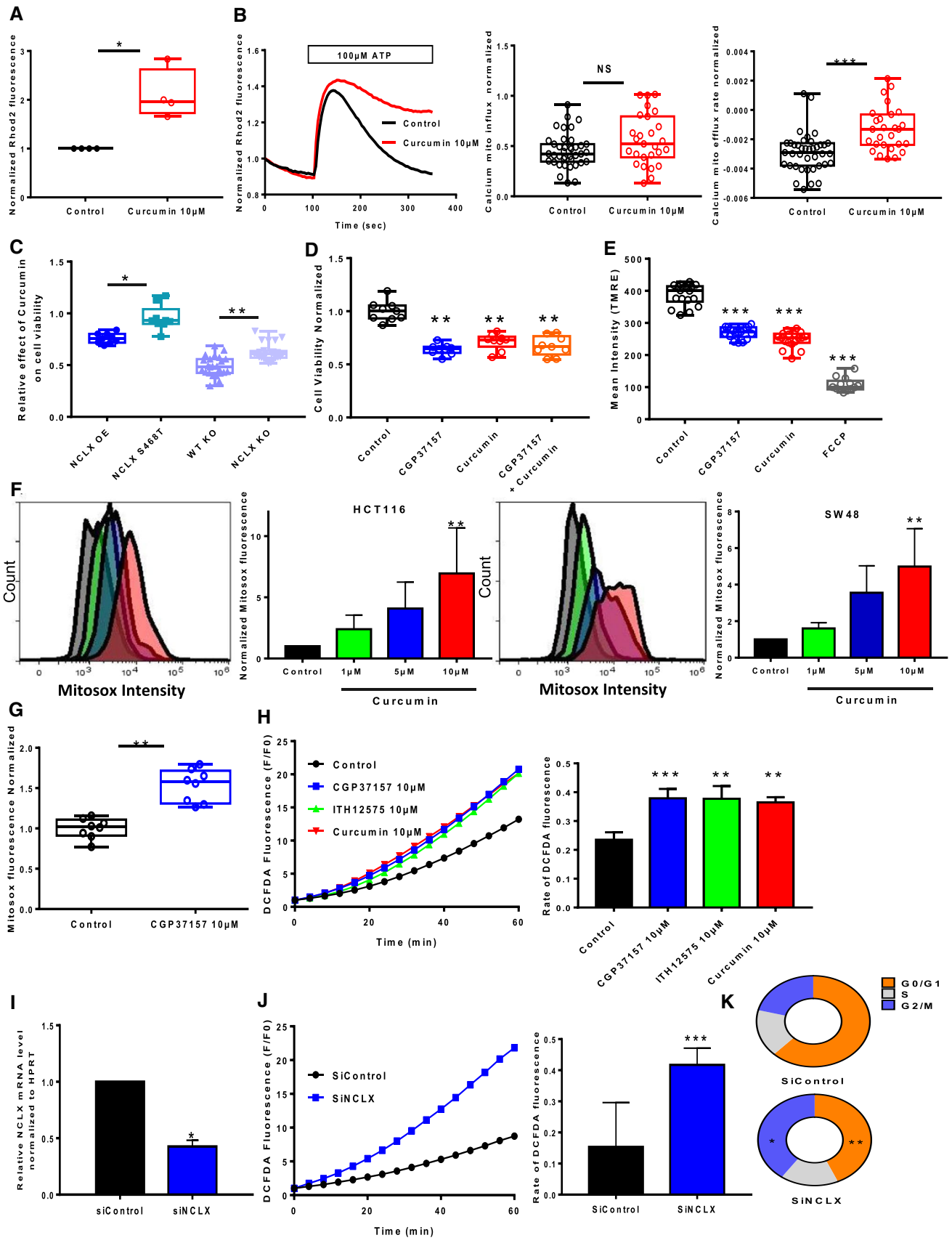
The interplay between Ca^{2+} and ROS signaling pathways is well established at several subcellular locations and has been implicated in many essential biological functions [13, 14]. Mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening is triggered by different pathological conditions such as Ca^{2+} overload and oxidative stress [15]. This opening leads to reduced ATP production and allows the release of pro-apoptotic mitochondrial components, namely apoptosis-inducing factor and cytochrome *c*. Another hallmark of mPTP-induced apoptosis is the loss of mitochondrial membrane potential. Several proteins participate in mitochondrial Ca^{2+} ($mtCa^{2+}$) uptake, the mitochondrial calcium uniporter (MCU) and its known regulators, which currently include MICU1, MICU2, EMRE, MCUR1, and MCUb. The mitochondrial $Na^{+}/Ca^{2+}/Li^{+}$ exchanger (NCLX) mostly mediates $mtCa^{2+}$ extrusion [16]. Of note, NCLX has been underexplored as a potential therapeutic target pushing cancer cells to apoptosis [17, 18]. In CRC, we have recently shown that downregulation of NCLX results in $mtCa^{2+}$ overload, increased mitochondrial ROS (mtROS), mitochondrial depolarisation and tumor shrinkage [19, 20]. The benzodiazepine-derived compound CGP37157, an inhibitor of NCLX, promotes mitochondrial damage and induces apoptosis [21].

In the present study, we examined whether curcumin induces a modification of $mtCa^{2+}$ flux in association with redox metabolism in MSI CRC. Our results indicated that curcumin has a strong anti-tumoral effect through inhibiting NCLX: inhibition of G2/M cell cycle progression, $mtCa^{2+}$ and ROS overload, mitochondrial membrane depolarization and activation of apoptosis by mPTP opening in MSI CRC cells. In a xenograft mouse model of CRC, NCLX inhibitors decreased CRC growth. In addition, mid-infrared (MIR) spectroscopy coupled with metabolomics gave useful metabolic signatures in terms of circulating biomarkers. Moreover, analysis of CRC in The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset showed that higher *NCLX* expression was associated with MSI status, and the expression of NCLX in tissue microarrays (TMA) of 302 samples was significantly associated with recurrence-free survival (RFS) in patients with MSI CRC.

Materials and methods

Study design, patient characteristics and survival analysis

From 2003 to 2015, all patients with MSI CRC classified by molecular testing from the cancer biology departments of Poitiers and Tours University Hospitals were included in the multi-center prospective COLOMIN cohort (*Cohorte nationale des cancers colorectaux avec instabilité microsatellitaire*). This study was designed in accordance with legal requirements and the Declaration of Helsinki, and was approved by the ethics committee of CHU Poitiers and CHRU Tours, France (Comité de


A
Normalized Rhod2 fluorescence
Control
Curcumin 10µM
B
100µM ATP
Normalized Rhod2 fluorescence
Time (sec)
Control
Curcumin 10µM
Calcium mito influx normalized
NS
Calcium mito efflux rate normalized
C
Relative effect of Curcumin on cell viability
NCLX OE
NCLX S468T
WT KO
NCLX KO
D
Cell Viability Normalized
Control
CGP37157
Curcumin
CGP37157 + Curcumin
E
Mean Intensity (TMRE)
Control
CGP37157
Curcumin
FCCP
F
Count
Mitosox Intensity
HCT116
Normalized Mitosox fluorescence
Control
1µM
5µM
10µM
Curcumin
SW48
G
Mitosox fluorescence Normalized
Control
CGP37157 10µM
H
DCFDA Fluorescence (F/F0)
Control
CGP37157 10µM
ITH12575 10µM
Curcumin 10µM
Time (min)
Rate of DCFDA fluorescence
I
Relative NCLX mRNA level normalized to HPRT
siControl
siNCLX
J
SiControl
SiNCLX
K
G0/G1
S
G2/M

◂**Fig. 2** $mtCa^{2+}$ efflux and ROS production are altered by treatment with curcumin and NCLX targeting in CRC cells. **A** Global $mtCa^{2+}$ was evaluated with Rhod2 fluorescence in HCT116 cells treated or not with curcumin ($n=4$ independent experiments; Mann–Whitney test, $^{*}P<0.05$). **B** $mtCa^{2+}$ responses following ATP stimulation (100 µM) were measured in HCT116 cells treated or not with curcumin. The average $mtCa^{2+}$ influx (peak) (left) and the rates of $mtCa^{2+}$ efflux (right) are shown ($n=5$ independent experiments with 27–39 measurements; Mann–Whitney test, $^{***}P<0.001$). **C** The knockdown of either NCLX function (through the over-expression of the S486T mutant, described a dominant-negative) or expression significantly reduced the effect of curcumin on cell viability ($n=4$ independent experiments of 9 measurements per group for overexpressed NCLX or NCLX S468T $^{*}P<0.05$, $n=5$ independent experiments of 24 measurements per group for WT KO or NCLX KO cells, $^{**}P<0.01$). **D** CGP37157 and curcumin had no additive effect on cell viability (MTT assay). The results are expressed as the mean ± SD of 3–5 independent experiments (ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$). **E** Mitochondrial membrane potential using the dye TMRE in HCT116 cells treated with 10 µM CGP37157 or 10 µM curcumin or 50 µM FCCP ($n=6$, Mann–Whitney test, $^{***}P<0.01$). **F** HCT116 and SW48 cells were pre-treated with curcumin (1, 5 or 10 µM) for 2 h. The cells were stained with MitoSOX for 40 min. The bar graph presents a quantitative analysis of mtROS. The data represent the mean ± SD ($n=4$ independent experiments, $^{**}P<0.01$, ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons). **G** Effect of CGP37157 pre-treatment on the mtROS level in HCT116. The data are shown as the mean ± SEM of at least three separate experiment with eight measurements each ($n=8$, Mann–Whitney test, $^{**}P<0.01$). **H** The effects of curcumin and NCLX blockers (CGP37157 or ITH12575) on cytosolic ROS responses in HCT116 cells were analyzed. DCFDA fluorescent traces are shown as the normalised (F/F0) mean. The histograms show the slope of cytosolic ROS production as a function of time (n = 5 independent experiments with 31–56 measurements per group $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$; ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons). **I** RT-qPCR data showing *SLC8B1* mRNA relative to *HPRT* in HCT116 cells transfected with siRNA against NCLX ($n=4$ independent experiments, Mann–Whitney test, $^{*}p<0.05$). **J** Effect of siRNA-mediated NCLX inhibition on cytosolic ROS production evaluated in HCT116 ($n=4$ independent experiments with 16–32 measurements per group, Mann–Whiney test, $^{**}P<0.01$). **K** Effect of siRNA against NCLX on cell cycle of HCT116. The results are representative of five independent experiments $n=5$ independent experiments; ANOVA followed by Tukey' post hoc multiple comparisons, $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$)

protection des personnes Ouest III, no. DC-2008-565 and no. 2018-039).

The main patient characteristics (gender and age) and tumor characteristics (tumor site, Tumor Node Metastasis [TNM] stage, VELIPI criteria [vascular emboli, lymphatic invasion, or perineural invasion], tumor grade, tumor perforation, and initial bowel obstruction) were collected. Whether a case was germline (Lynch syndrome) or sporadic dMMR/MSI was determined as described previously [4]. Information regarding disease recurrences and deaths were collected.

Tumor DNA was extracted from all tumors using the KAPA Express Extract Kit (Roche, Basel, Switzerland). The MSI phenotype was assessed by analyzing microsatellite loci comprising five mononucleotide markers: BAT-25, BAT-26, NR21, NR24 and NR27 (Pentaplex panel) (4). MSI was defined by the presence of instability affecting at least three of the five markers. In the case of one or two markers with instability, a comparative analysis of normal colon and tumor DNA was performed.

RFS was defined as the time from the date of primary tumor curative surgery until the date of recurrence. Patients without recurrence were censored at the last follow-up. Kaplan–Meier survival curves were generated and groups were compared using the log-rank test. $P<0.05$ was considered statistically significant. Survival analyses were performed in the Statview environment.

Tissue microarray and immunohistochemistry

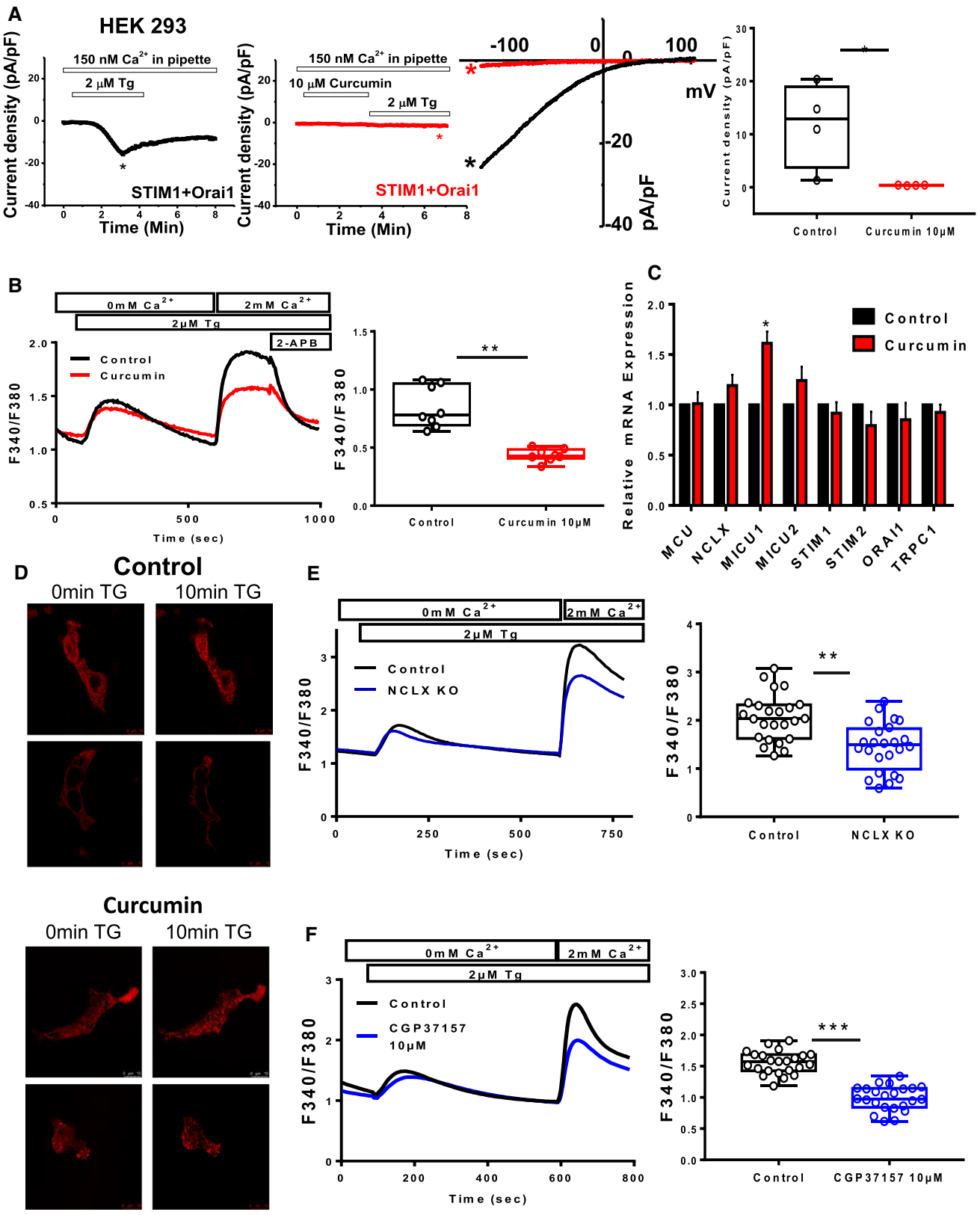
Tissue microarray (TMA) construction: TMAs were constructed using formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. For each case, nine cores of 0.6-mm diameter (three in the tumor center, three in the invasive front and three in non-tumor tissue) were transferred from the selected areas to the recipient block, using a TMA workstation (Manual Tissue Arrayer MTA Booster, Alphelys, France). Serial 3-µm sections of the TMA blocks were used for immunohistochemistry. Every tenth section was stained with haematoxylin and eosin to check that the cores adequately represented diagnostic areas.

Immunohistochemistry: Slides were deparaffinised, rehydrated and heated in citrate buffer (pH 6) for antigen retrieval. After blocking endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, the primary antibodies were incubated. After incubation with the primary antibody NCLX (HPA040668, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) diluted 1:50 overnight at 4 °C or Ki67 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) incubated 30 min at dilution 1:50, immunohistochemistry was performed using the streptavidin–biotin–peroxidase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Negative controls were obtained after omission of the primary antibody or incubation with an irrelevant antibody.

A semi-quantitative score was assigned based on the intensity of NCLX staining: 0 (no staining), + (moderate staining) and ++ (strong staining). Ki67-positive cells were expressed as a percentage of total cancer cells.

Cell culture and treatments

HCT116 (RRID:CVCL_0291), LoVo (RRID:CVCL_0399) and HT-29 (RRID:CVCL_0320) SW48 (RRID:CVCL_1724) cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured in McCoy's medium (Gibco, Thermo Fisher, Illkirch, France) supplemented with 10% fetal bovine



serum (FBS, Eurobio, Les Ulis, France), without antibiotics. NCM356 cells (Incell Corporation, LLC, San Antonio, TX, USA) were cultured in high-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS and antibiotics. The cell lines were cultivated at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO_2. The cell

◂**Fig. 3** NCLX inhibition and curcumin treatment decrease SOCE in CRC cells. **A** Electrophysiological recordings were performed on HEK293 ORAI1 KO cells transfected with ORAI1-CFP and STIM1-YFP. Representative time courses of whole-cell CRAC currents activated by dialysis of 20 mM BAPTA through the patch pipette and taken at −100 mV from control cells (black trace) or cells pre-treated with 10 µM curcumin (red trace) are shown. Representative I–V relationships are taken from traces in (**A**) which are indicated by color-coded asterisks. Statistical analysis of Ca2+ CRAC currents measured at −100 mV is shown ($n=4$ independent experiments; Mann–Whitney test, $*P<0.05$). **B** Representative traces of SOCE in HCT116 cells pre-treated with curcumin (10 µM for 1 h). The data show the effects of curcumin on SOCE in HCT116 ($n=5$ independent experiments; Mann–Whitney test, $**P<0.01$). **C** Relative mRNA levels of MCU, NCLX, MICU1, MICU2, STIM1, STIM2, ORAI1, and TRPC1 genes in HCT116 cells treated or not with 10 µM curcumin for 24 h ($n=5$ independent experiments; Mann–Whitney test, $*P<0.05$). D/ STIM1-dependent puncta formation a. Representative fluorescent images of HCT116 cells co-expressing STIM1 Cherry (red) showing puncta after treatment with TG (2 µM for 10 min) and pre-treated or not with curcumin for 30 min. **E** Representative cytosolic Ca2+ measurements in HCT116 WT and NCLX KO cells measured with Fura-2 AM in response to 2 µM TG applied first in nominally Ca2+-free external solution and subsequently with 2 mM external Ca2+. The summary data are presented as the mean ± SD ($n=5$ independent experiments, 24 cells for each group; Mann–Whitney test, $**P<0.01$). **F** SOCE was blocked after preincubation with CGP37157 (10 µM for 1 h) (right graph). Ca2+ influx in control and CGP37157-treated cells is shown. The summary data are presented as the mean ± SEM ($n=4$ independent experiments, 23 cells for each group; Mann–Whitney test, $***P<0.001$)

lines were maintained and *Mycoplasma* absence was tested regularly using the PlasmoTest kit (HEK blue, Invivogen, Toulouse, France). HCT116 NCLX KO cells are the same cells described in Pathak et al., 2020 [19]. NCLX KO cells were generated using a guide RNA (g1) which resulted in a single cut at nucleotide 150 in exon one causing a frameshift mutation and introduction of a stop codon at position 180 in the NCLX open reading frame.

Transcriptomic analysis

The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset of patients with CRC was downloaded from cbioportal[47] and analyzed as described previously [48, 49]. Briefly, clinical and transcriptomic data were acquired and processed using, respectively, the *TCGABiolinks* and *edgeR* packages in the R environment. Previously published classifications of the TCGA dataset of patients with CRC were obtained from Guinney et al. [28] and Liu et al. [29].

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was performed on patients with MSI-h CRC from the TCGA transcriptomic dataset using the GSEA JAVA application from the Broad Institute with default parameters (http://software.broadinstitute.org/gsea).

Compounds

Curcumin (10 µM) was purchased from TOCRIS (Bristol, UK); CGP37157 (10 µM) was purchased from Sigma-Aldrich (Merck, Darmstadt, Germany); ITH12575 (10 µM) was purchased from Sigma-Aldrich.

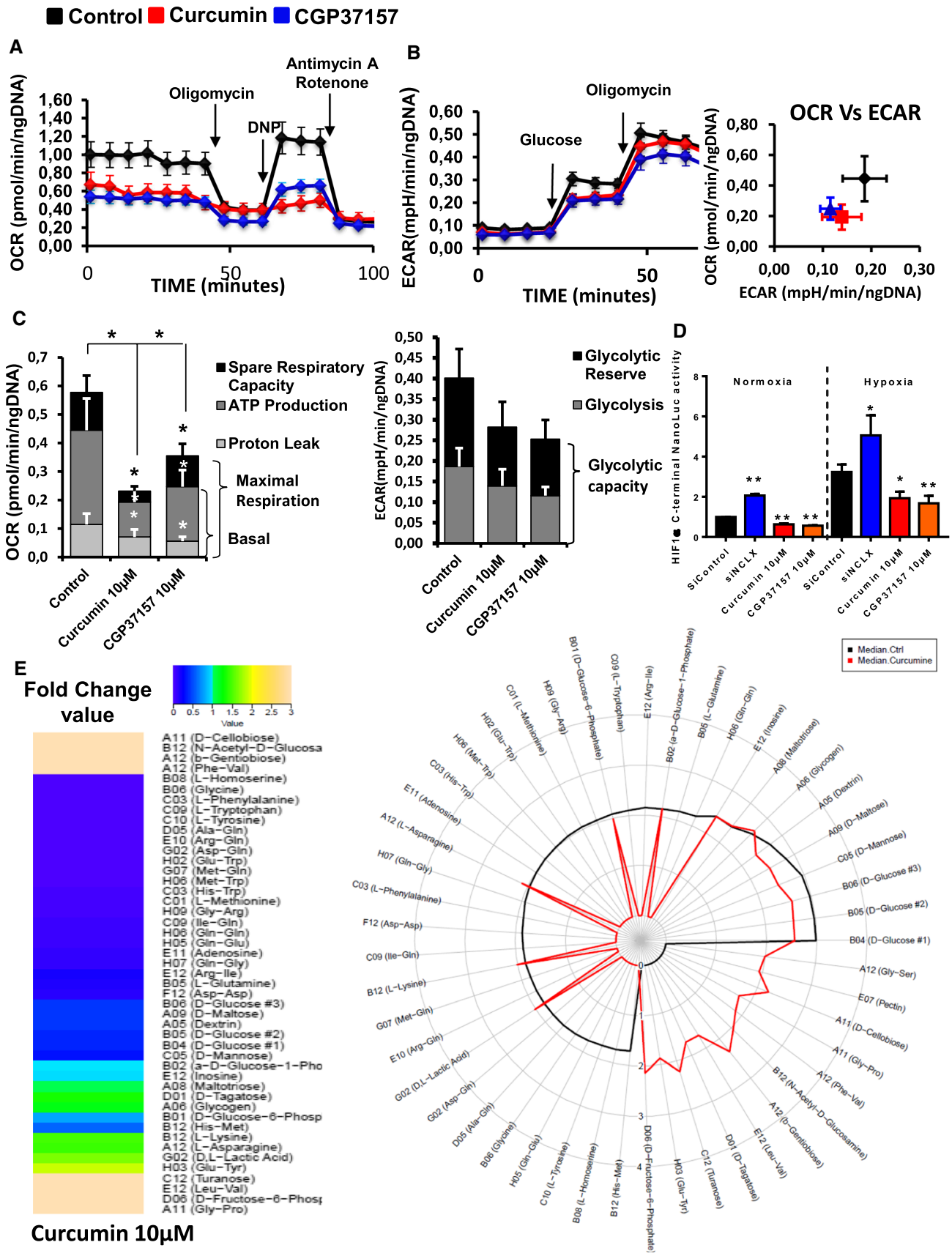
Transfection

Briefly, 2.5×10^5 cells/well were plated in 6-well plates in McCoy's medium supplemented with 10% FBS without antibiotics. The cells were incubated with a mix of small interfering RNA (siRNA) and lipofectamine in medium without serum for 6 h. After incubation, an equal volume of medium with serum was added to each well. The siRNA sequences directed against NCLX were purchased from Dharmacon (L-007332-00-0005) (La Fayette, CO, USA). Measurement of NCLX WT and NCLX S468T on cell viability in HCT116 cells was achieved by transient over-expression of NCLX WT and NCLX S468T [50] as previously described [50]. Briefly, 1×10^6 cells were incubated with a solution containing 1.5 µg of NCLX WT or NCLX S468Tand 3 µl Lipofectamine 2000 for 3 h. One day later, transfected cells were transferred and treated with 10 µM curcumin for 24 h in 24-well plates.

Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

Total RNA was collected using the Nucleospin RNA Kit (Macherey–Nagel, Hoerdt, France) and transcribed into complementary DNA (cDNA) with the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). cDNA was then amplified with the SYBR Green Master kit (Roche, Mannheim, Germany) using a Light Cycler 480 apparatus. PCR was performed in 40 cycles of 15 s at 95 °C and 45 s at 60 °C. The average ΔCt value was calculated for each cell line with respect to the housekeeping gene *HPRT1*. The primers sequences used are:

- HPRT1: forward 5′ CAT-TAT-GCT-GAG-GAT-TTG-GAA-AGG 3′ reverse 5′ CTT-GAG-CAC-ACA-GAG-GGC-TAC-A 3′;
- NCLX: forward 5′ GCC-AGC-ATT-TGT-GTC-CAT-TT 3′, reverse 5′AAT-TCG-TCT-CGG-CCA-CTT-AC 3′;
- MCU: forward 5′ CGC-CAG-GAA-TAT-GTT-TAT-CCA 3′, reverse 5′ CTT-GTA-ATG-GGT-CTC-TCA-GTC-TGT-T 3′;
- MICU1: forward 5′GAG-GCA-GCT-CAA-GAA-GCA-CT 3′, reverse 5′ CAA-ACA-CCA-CAT-CAC-ACA-CG 3′;
- MICU2: forward 5′ GGC-AGT-TTT-ACA-GTC-TCC-GC 3′, reverse 5′ AAG-AGG-AAG-TCT-CGT-GGT-GTC 3′;


Control
Curcumin
CGP37157
A
Oligomycin
Antimycin A
Rotenone
DNP
OCR (pmol/min/ngDNA)
TIME (minutes)
B
Oligomycin
Glucose
ECAR(mpH/min/ngDNA)
TIME (minutes)
OCR Vs ECAR
OCR (pmol/min/ngDNA)
ECAR (mpH/min/ngDNA)
C
Spare Respiratory Capacity
ATP Production
Proton Leak
Maximal Respiration
Basal
OCR (pmol/min/ngDNA)
Control
Curcumin 10µM
CGP37157 10µM
Glycolytic Reserve
Glycolysis
Glycolytic capacity
ECAR(mpH/min/ngDNA)
D
Normoxia
Hypoxia
HIF1α C-terminal NanoLuc activity
SiControl
siNCLX
Curcumin 10µM
CGP37157 10µM
E
Fold Change value
Value
A11 (D-Cellobiose)
B12 (N-Acetyl-D-Glucosa
A12 (b-Gentiobiose)
A12 (Phe-Val)
B08 (L-Homoserine)
B06 (Glycine)
C03 (L-Phenylalanine)
C09 (L-Tryptophan)
C10 (L-Tyrosine)
D05 (Ala-Gln)
E10 (Arg-Gln)
G02 (Asp-Gln)
H02 (Glu-Trp)
G07 (Met-Gln)
H06 (Met-Trp)
C03 (His-Trp)
C01 (L-Methionine)
H09 (Gly-Arg)
C09 (Ile-Gln)
H06 (Gln-Gln)
H05 (Gln-Glu)
E11 (Adenosine)
H07 (Gln-Gly)
E12 (Arg-Ile)
B05 (L-Glutamine)
F12 (Asp-Asp)
B06 (D-Glucose #3)
A09 (D-Maltose)
A05 (Dextrin)
B05 (D-Glucose #2)
B04 (D-Glucose #1)
C05 (D-Mannose)
B02 (a-D-Glucose-1-Pho
E12 (Inosine)
A08 (Maltotriose)
D01 (D-Tagatose)
A06 (Glycogen)
B01 (D-Glucose-6-Phosp
B12 (His-Met)
B12 (L-Lysine)
A12 (L-Asparagine)
G02 (D,L-Lactic Acid)
H03 (Glu-Tyr)
C12 (Turanose)
E12 (Leu-Val)
D06 (D-Fructose-6-Phosp
A11 (Gly-Pro)
Curcumin 10µM
Median.Ctrl
Median.Curcumine

◂**Fig. 4** Targeting NCLX-dependent signaling elicits rapid and dynamic changes in CRC cell metabolism. **A** Energy metabolism in HCT116 cells pre-treated with curcumin and NCLX blocker (CGP37157). After four measurements of baseline OCR, glucose, oligomycin, DNP, and the mixture of antimycin A and rotenone were injected sequentially, with measurements of OCR recorded after each injection. ATP-linked OCR and OCR due to proton leak can be calculated using basal and oligomycin-sensitive rates. Injection of DNP is used to determine the maximal respiratory capacity. Injection of antimycin A and rotenone allows for the measurement of OCR independent of complex IV. **B** Cellular aerobic glycolysis was evaluated by measures of the ECAR from HCT116 cells treated with curcumin or CGP37157 (10 µM) following sequential injection (arrow) of glucose (10 mM) and then oligomycin (1 µmol/L) ($n=5$ independent experiments; Mann–Whitney test, $***P<0.001$). **C** The spare respiratory capacity (mitochondrial reserve capacity) was calculated by subtracting the basal from the maximal respiration. The bio-energetic profiles of HCT116 with or without 10 µM curcumin or 10 µM CGP37157 were measured using sequential injection of glucose, oligomycin (1 µmol/L), DNP (100 µmol/L) and the mixture of antimycin A (0.5 µmol/L) and rotenone (0.5 µmol/L). The mitochondrial reserve capacity of untreated control and curcumin- or CGP37157-treated HCT116 cells are shown. The results are presented as the mean ± SD of 5 independent experiments of 3–5 measurements (Mann–Whitney test, $*P<0.05$, $***P<0.001$). **D** HCT116 HIF1α-C-terminal Luc cells incubated under normoxic or hypoxic conditions for 48 h. Four hours before the end of incubation, the cells were treated with CGP37157 or curcumin. The values represent the mean ± SD of 3–6 independent experiments (ANOVA followed by Tukey's post hoc multiple comparisons, $*P<0.05$ $**P<0.01$). **E** The effect of curcumin on the ability of HCT116 cells to metabolise 367 substrates was measured using the OmniLog® Analyzer. The heatmap shows the AUC fold-change data induced by curcumin treatment. The radial plot shows the AUC of metabolized substrates (49 substrates with positives kinetic curves with AUC > 50 in at least one condition) on a logarithmic scale

- STIM1: forward 5′ GCC-CTC-AAC-ATA-GAC-CCC-AG 3′, reverse 5′ TCC-ATG-TCA-TCC-ACG-TCG-TCA 3′;
- STIM2 forward 5′ TTG-GAC-CCT-TGA-AGA-CAC-TCT 3′, reverse 5′ CCA-GTT-ATG-AGG-TGG-GCG-TG 3′;
- Orai1 5′ AGG-TGA-TGA-GCC-TCA-ACG-AG 3′, reverse 5′ CTG-ATC-ATG-AGC-GCA-AAC-AG 3′;
- TRPC1 5′ TTA-CTT-GCA-CAA-GCC-CGG-AA 3′, reverse 5′ CTG-CTG-GCA-GTT-AGA-CTG-GG 3′.

Semi-quantitative real-time polymerase chain reaction analyses (redox profiling)

Semi-quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) analyses were performed as described previously by Kouzi et al. [51]. Briefly, HCT116 cell line was treated for 24 h with 10 µM curcumin, and RNA was isolated using the Maxwell® 16 IVD system and the Maxwell Simply RNA Tissue Kit according to the manufacturer's instructions (Promega). RNA was reverse transcribed using the SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and RT-qPCR was performed using the Universal Probe Library System (Roche, Penzberg, Germany). cDNA, primers, probes and TaqMan master mix were mixed, and PCR was run in a LightCycler® 480 (Roche). The mean cycle threshold (Ct) of the human *ACTB* and *RPL13A* genes were used as endogenous controls to normalize the expression of target genes. Each reaction was performed in triplicate. Relative quantification (RQ) gene expression was evaluated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [52]. The list of primers is provided in Supplementary Table S1.

Flow cytometry analysis

Cell cycle

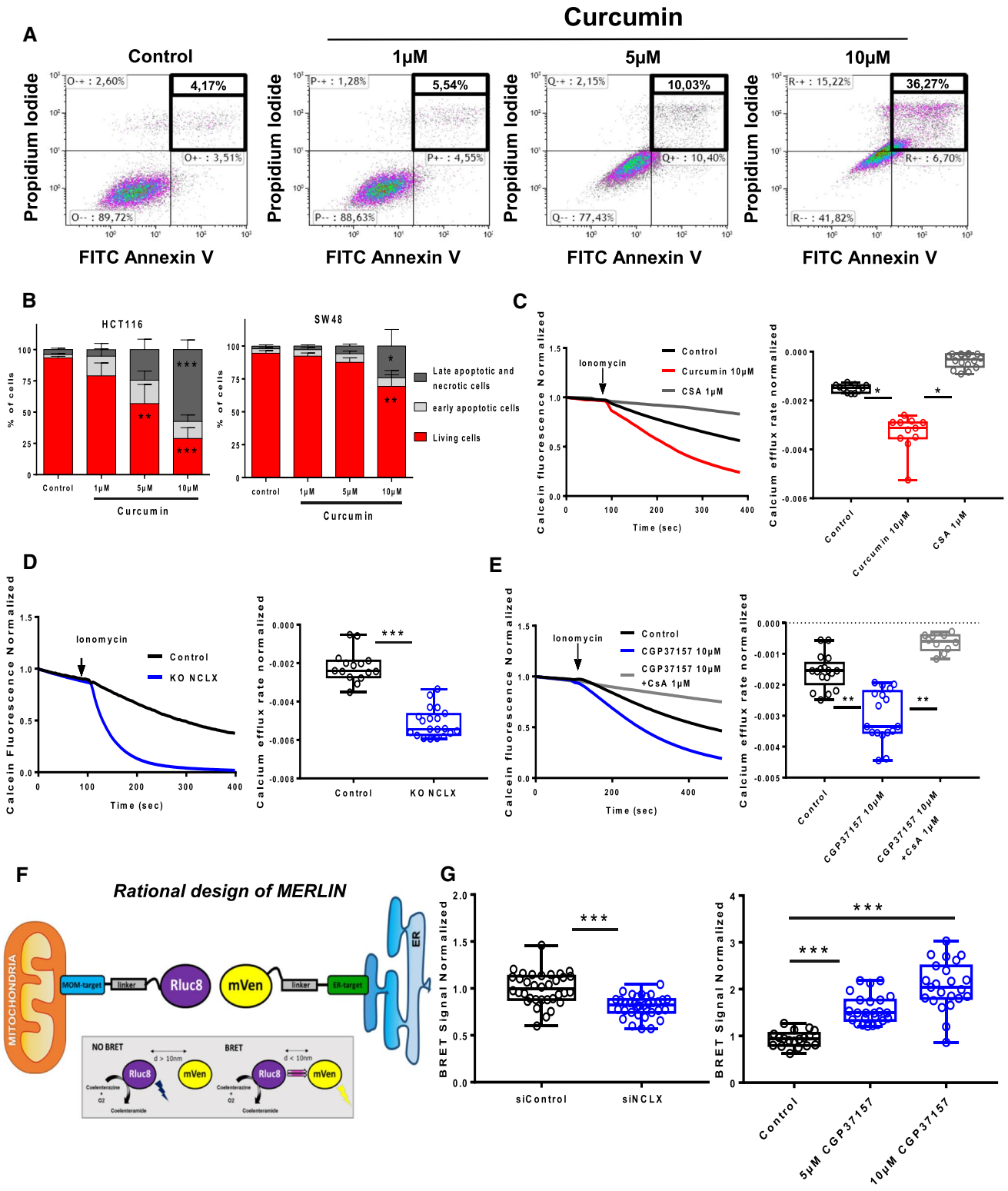
Cells were harvested using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) 24 h after treatments, washed in 1X phosphate-buffered saline (PBS), fixed in cold 70% ethanol and incubated at − 20 °C for at least 2 h. Subsequently, the samples were resuspended in PBS with RNase and stained with 0.025 mg/mL propidium iodide (PI) for 30 min in the dark at room temperature. The DNA content of stained cells was analyzed using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). For each sample, a minimum of 5×10^4 cells were evaluated. Analyses were done using the Kaluza 1.3 software (Beckman Coulter).

Apoptosis

Cells were harvested by Accutase (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA), washed with 1X PBS and then resuspended in annexin-binding buffer following the manufacturer's instructions (Annexin-PI kit, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and analyzed by flow cytometry as described above.

Spheroid cell viability test

The spheroid cell viability test was performed according to the manufacturer's conditions (Cultrex proliferation—cell viability 3510096K, Bio-Techne, Abingdon, UK). The cells were cultured in extracellular matrix supplemented with Epidermal Growth Factor (EGF) in 96-well plates with round bottoms for 48 h and then treated with 10 µM curcumin for 72 h. To capture the entire spheroid, image fields starting at the center of the well were collected using a 20× objective lens (Nikon, Champigny-sur-Marne, France).



3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Cells were cultured and treated with 1–10 µM curcumin for 24, 48 or 72 h. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/ml) was added to each well prior to incubation. The cells were incubated at 37 °C for 45 min. Afterward, the supernatant was removed and dimethyl sulphoxide (DMSO) was added to dissolve formazan

◂**Fig. 5** Treatment with curcumin or NCLX inhibitors induces Ca^{2+}-dependent apoptosis by sensitizing mPTP activation. **A** HCT116 and SW48 were treated with 0–10 µM curcumin for 24 h. The dots indicate the number of Annexin V-/PI- cells (bottom left field, indicates live cells), Annexin V+/PI– cells (bottom right field, indicates early apoptotic cells), Annexin V+/PI+ cells (top right field, indicates late apoptotic cells), and Annexin V−/PI+ cells (top left field, indicates necrotic cells). **B** The early stage apoptotic cells are shown in grey and the late-stage apoptotic and necrotic cells are shown in black. The results are presented as the mean ± SD of 4–5 independent experiments (*$P<0.05$, **$P<0.01$ and ***$P<0.005$ compared with their respective control; ns: non-significant). **C** For the mPTP opening experiment, HCT116 cells were loaded with calcein-AM and $CoCl_2$. mPTP opening was monitored by the decrease in calcein fluorescence induced by 5 µM ionomycin in HCT116 cells pre-treated for 1 h with DMSO (black line), 10 µM curcumin (red line) or 1 µM CsA (gray line). mPTP opening occurs after the addition of 5 µM ionomycin (4–5 independent experiments; One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test, *$P<0.05$, **$P<0.01$ versus DMSO). **D** Depletion of NCLX expression increased mPTP opening activation in HCT116 cells. Measurement of calcein fluorescence in HCT116 WT and NCLX KO cells after activation of mPTP opening induced by 5 µM ionomycin. The kinetics of mPTP opening was increased when the expression of NCLX was downregulated (5 independent experiments Mann–Whitney test, *$P<0.05$). **E** The CsA pre-treatment prevented the mPTP sensitization induced by CGP37157 treatment. Changes in mitochondrial calcein fluorescence intensities induced by 5 µM ionomycin were measured in HCT116 cells pre-treated for 1 h with 10 µM CGP37157 or = 10 µM CGP37157 and 1 µM CsA (one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test, *$P<0.05$, **$P<0.01$ and ***$P<0.001$ versus DMSO). **F** Schematic representation of MERLIN based on BRET. The BRET donor was MOM-targeted Rluc8 and the BRET acceptor was mVenus in the ER. In both BRET partners, the linker region is an alpha helix formed by the $A(EAAAK)_4A$ motif. BRET occurs upon MOM-Rluc8 stimulation by coelenterazine h and BRET to ER-mVenus. **G** Targeting NCLX modified the contacts between the ER and mitochondria. Changes in BRET signals in HCT116 cells co-expressing the BRET pair MERLIN, sCal-L1-RLuc, and mVen-L1-B33C after knockdown of NCLX, siRNA control transfection or treatment with CGP37157. The results are based on 3–4 replicates with 18–22 measurements per group. The error bars indicate SD (***$P<0.001$, Mann–Whitney test or one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test)

crystals and absorbance was read at 570 nm using a Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold, Bad Wildbad, Germany).

Sulforhodamine B (SRB) assay

Cells were cultured and treated with 1–10 µM curcumin for 24, 48, or 72 h.

Cell viability, survival in HBSS and short-term toxicity were evaluated using standard sulforhodamine B (SRB) method after 72 h, 48 h and 24 h treatments, respectively. Briefly, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C and stained for 15 min with 0.4% SRB solution. Cells were washed 3 times with 1% acetic acid and dye was dissolved with 10 mM trisbase solution over 10 min. Absorbance at 540 nm was read using BioTek Spectrophotometer.

NanoLuc activity assay

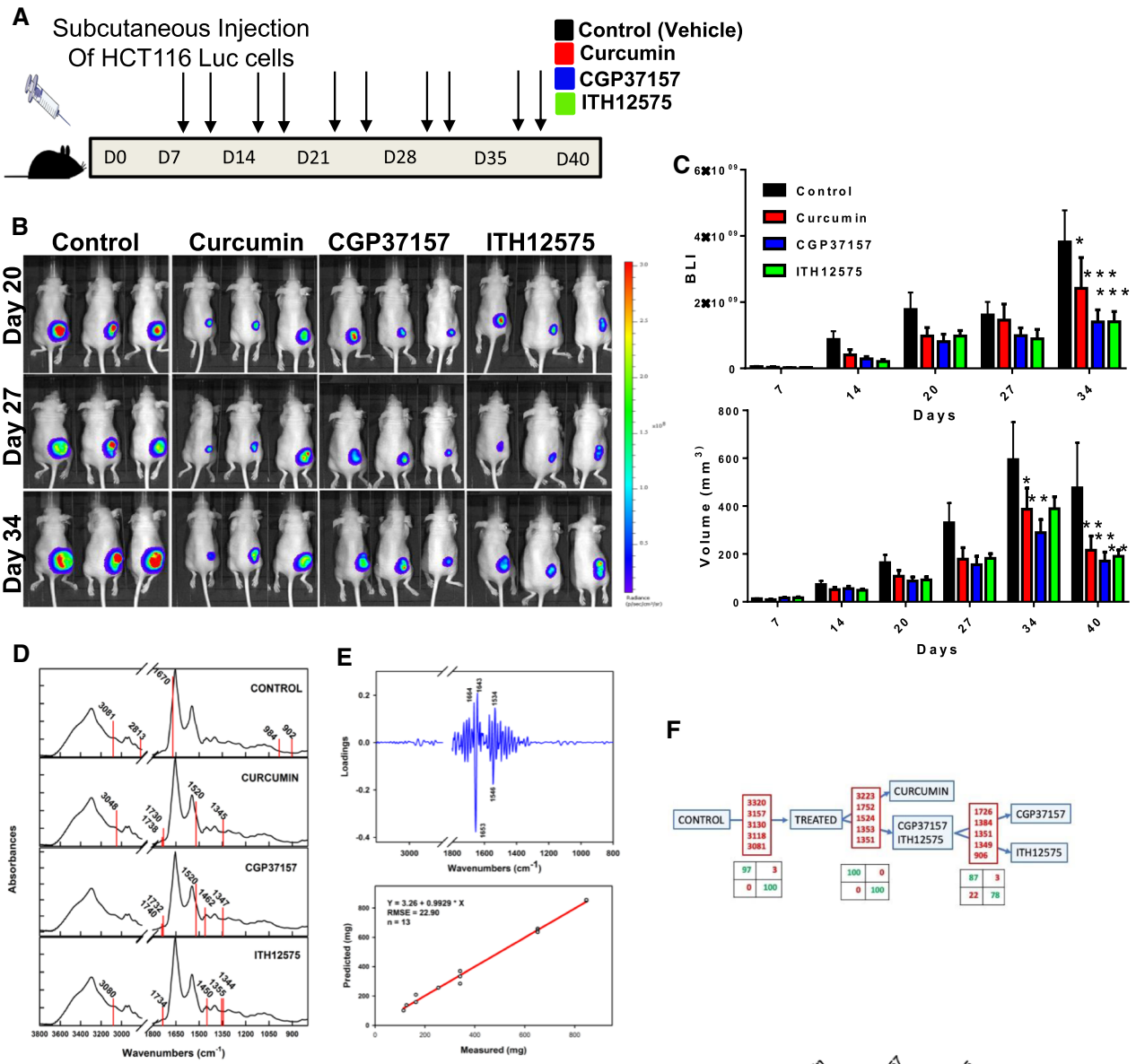
The HIF1α NanoLuc protein-reporter HCT116 and HCT116 NFE2L2-C-terminal Luciferase cell lines were purchased from Horizon Discovery (Cambridge, UK) [53]. Cells were seeded in 96-well plates at 3×10^4 cells/well and incubated for 24 h in normoxic or hypoxic conditions (1% O_2) with or without 10 µM curcumin or 10 µM CGP37157. Luciferase activity was measured using the Nano-Glo® Reagent (Nano-Glo® Luciferase Assay, Promega) following the supplier's instruction. Luminescence intensity values were measured by FlexStation-3 (Molecular Devices, San José, CA, USA).

Store-operated calcium-entry measurement by Fura-2 AM

Intracellular Ca^{2+} imaging was performed as previously described [22, 23]. Cells were plated in 96-well plates at 2×10^4 cells/well 24 h before the experiment. Adherent cells were for loaded with the ratiometric dye Fura2-acetoxymethyl ester (AM; 5 µM) for 45 min at 37 °C and then washed with PBS supplemented with Ca^{2+}. During the experiment, the cells were incubated with Ca^{2+}-free physiologic saline solution (PSS) solution and treated with 2 µM thapsigargin (TG, T7458, Life Technologies, Thermo Fisher) to deplete intracellular store of Ca^{2+}. Ca^{2+} entry was stimulated by injection of 2 mM of $CaCl_2$. Fluorescence emission was measured at 510 nm using the FlexStation-3 (Molecular Devices) with excitation at 340 and 380 nm. The maximum fluorescence (peak of Ca^{2+} influx [F340/F380]) was measured and compared with the normal condition. NCLX was inhibited by 10 µM CGP37157 or 10 µM curcumin.

Mitochondrial Ca^{2+} measurements

Intracellular mitochondria Ca^{2+} imaging was performed as previously described [19]. To measure $mtCa^{2+}$ using the Rhod-2 AM dye (543 nm/580–650 nm), the cells were cultured at 60–80% confluency in 96-well plates. The cells were washed with medium without FBS and antibiotic–antimycotic agents. Then, the cells were incubated in medium containing 3 µM Rhod-2 AM (without FBS and antibiotic–antimycotic agents) at 37 °C for 45 min. The cells were washed and kept in PBS (HEPES-buffered saline solution, 140 mM NaCl, 1.13 mM $MgCl_2$, 4.7 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM D-glucose, and 10 mM HEPES, adjusted to pH 7.4 with NaOH) containing 2 mM $CaCl_2$ for imaging. The cells were stimulated with 100 µM adenosine triphosphate (ATP) or 10 µM histamine in PBS containing 2 mM $CaCl_2$. The timelapse images were acquired using the FlexStation-3 (Molecular Devices). To measure $mtCa^{2+}$ using the mt-Cepia, cultured cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1,5 µg pCMV CEPIA3mt



	Biochemical pathways p < 0.05 / FDR < 0.05			
	Control	Curcumin	CGP37157	ITH12575
Pyrimidine metabolism	x	x	x	x
Pantothenate and CoA biosynthesis	x		x	x
beta-Alanine metabolism	x		x	
Glycine, serine and threonine metabolism	x			
Neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis		x		
Arginine and proline metabolism			x	
Arginine biosynthesis			x	
Biosynthesis of unsaturated fatty acids				x

◂**Fig. 6** Curcumin and NCLX blockers reduced colorectal tumor growth in vivo. *A* HCT116-Luc cells were implanted subcutaneously into nude mice: control, curcumin-treated, CGP37157-treated, and ITH12575-treated groups (n = 8–9/group). **B** Representative bioluminescent images of CRC tumors in control, curcumin, CGP37157 and ITH12575 groups at day 20–27 and 34. **C** BLI value of tumors (expressed in c.p.m) as a function of time recorded in the whole body of mice. Volume of tumors (expressed in mm3) as a function of time recorded in the whole body of mice (Mean ± sem, two-way ANOVA with multiple comparisons test, $*P<0.05$, $**P<0.01$ and $***P<0.001$ versus control group). **D** Spectral wavelengths allowing discrimination among the groups superimposed with the mean group spectrum. **E** Tumor size prediction based on partial least square (PLS) regression showing the loadings (i.e., the correlated spectral variables and the regression model). **F** The dichotomous model to identify groups from plasma serum with, for each step, the relevant discriminant variables and the consequent confusion matrixes. **G** Metabolic pathways associated with metabolite sets that were modified between D0 and D40 for each group based on analysis of whole blood samples. **H** Heatmap analysis of metabolite levels identified at D40 showing the difference between the treated groups and the control group

2 days before imaging. 24 h before the experiments, transfected cells were plated in 96-well plates. The cells were stimulated with 100 µM adenosine triphosphate (ATP) in PBS containing 2 mM $CaCl_2$. The timelapse images were acquired using the FlexStation-3 (Molecular Devices). *N*-methyl-d-glucamine (NMDG) was purchased from Sigma-Aldrich. PCMV CEPIA3mt was a gift from Masamitsu Lino (Addgene plasmid # 58219; http://n2t.net/addgene:58219; RRID:Addgene_58219).

Calcium Green-5N (Invitrogen) on permeabilized cells beforehand with digitonin was used to measure mitochondrial Ca^{2+} uptake and release experiments.

HCT116 permeabilized cells suspended in intracellular Na^+-free buffer (130 mM KCl, 10 mM Tris-MOPS (pH 7.4), 10 µM EGTA-Tris, 1 mM KPi, 5 mM malate, 5 mM glutamic acid, 1 µM Ca^{2+} green-5N). At the starting point, Curcumin or CGP37157 was added following by one pulse of 10 µM Ca^{2+} at 2 min. Next, 0.5 µM Rutenium Red (RR), an inhibitor of MCU, was added at 6 min to block Ca^{2+} uptake. Next, the Na^+-induced Ca^{2+} release was initiated by the addition of a Na^+ pulse (10 mM at 7 min). Ca^{2+} uptake/release measurements were performed at 25 °C on a F2710 spectrofluorometer (Hitachi) with the following parameters, $\lambda_{ex} = 505$ nm, $\lambda_{em} = 535$ nm, slit width: 2.5 nm.

Mitochondrial and cytoplasmic reactive oxygen species measurements

Cells were cultured in 6-well plates at 70–90% confluency. To measure mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), 1×10^6 cells were stained with 5 µM MitoSOX (Molecular Probes, Thermo Fisher) in PBS at 37 °C for 40 min [19]. The intensity of staining was measured using a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed with the FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Cytoplasmic ROS production was measured using the 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) assay according to the manufacturer's protocol (Molecular Probes, Thermo Fisher). Cells were seeded at 2×10^3 cells/well of 96-well plates 24 h before the experiment. The cells were washed with PSS containing 2 mM Ca^{2+} and then treated with PSS containing 2 mM Ca^{2+} and 10 µM DCFDA with or without curcumin or CGP37157. The fluorescence emission was measured at 520 nm using the FlexStation-3 (excitation: 500 nm). The fluorescence rate is reported as relative fluorescence units (RFU) normalised to time 0.

Measurement of mitochondrial permeability transition pore opening

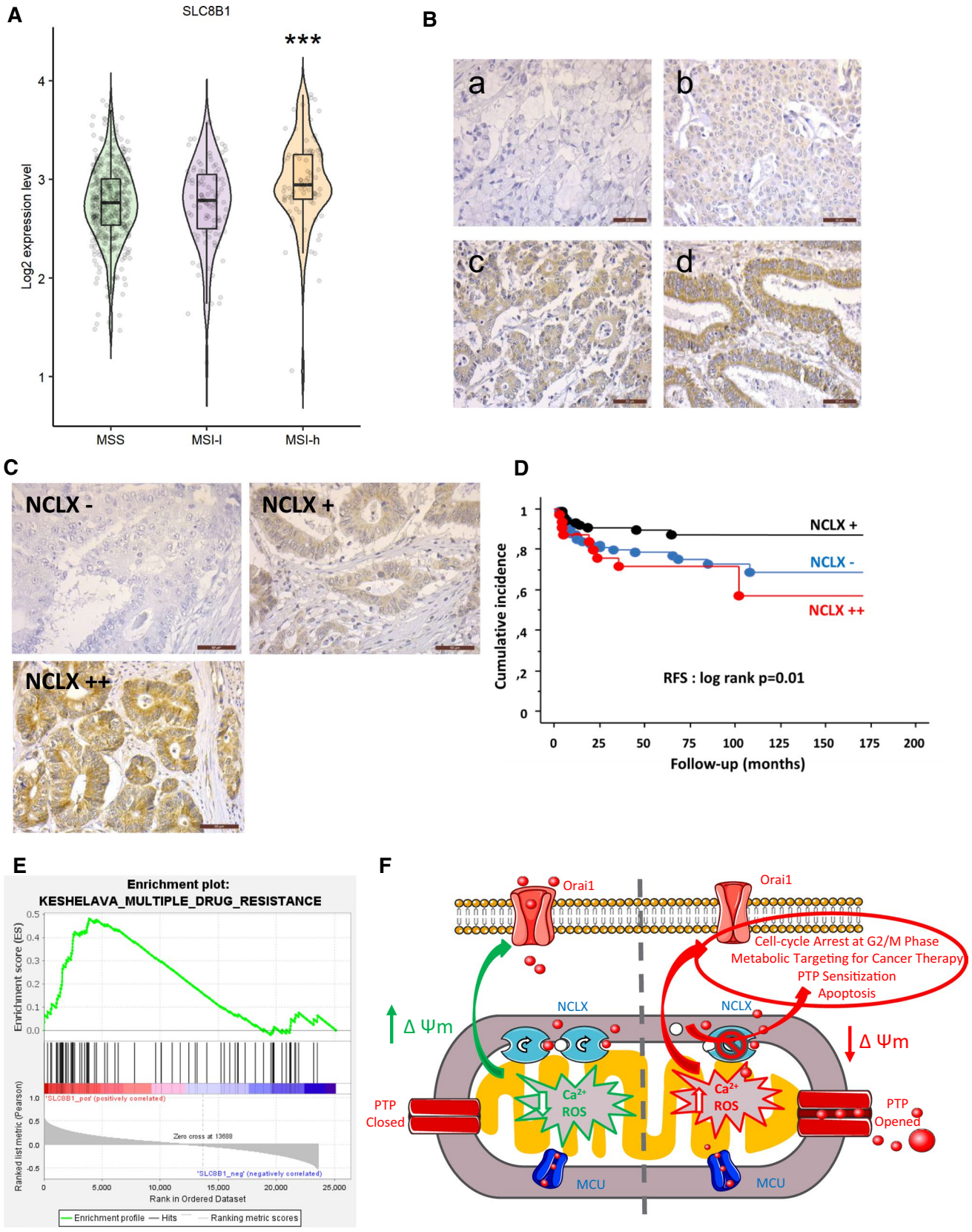
Direct assessment of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening in HCT116 cells was performed by loading cells with calcein-AM (Sigma-Aldrich) and $CoCl_2$, resulting in mitochondrial localisation of calcein fluorescence [54]. Specifically, the cells were loaded with 1 µM calcein-AM for 30 min at 37 °C in 1 mL (PSS 2 mM Ca^{2+}, pH 7.4) with 1 mM $CoCl_2$. Subsequently, they were incubated with medium free of calcein-AM and $CoCl_2$ and then incubated in reoxygenation medium. mPTP opening was determined from the reduction in mitochondrial calcein signal (slope value) after injection of ionomycin (5 µM). Fluorescence emission was measured at 515 nm using the FlexStation-3. Calcium Green-5 N (Invitrogen) on permeabilized cells beforehand with digitonin was used to measure the Ca^{2+} retention capacity that reflects mitochondrial function. Ca^{2+} uptake was followed by measuring extra-mitochondrial Calcium Green-5 N until mPTP opening was achieved [55]. Fluorescence emission was measured at 530 nm.

Measurement of mitochondrial potential

Cells were cultured in 96-well plates at 50–60% confluency. The next day, cells were loaded with Tetramethyl rhodamine (TMRE) dye. The cells were stained with 100 nM TMRE dye in complete growth media and kept at 37 °C in 5% CO_2 for 20–30 min. CCCP (50 µM) was used as a positive control [56]. The intensity of staining was measured and analyzed on FlexStation-3 (Molecular Devices).

Patch clamp recording

Traditional patch-clamp electrophysiological recordings were carried out using an Axopatch 200B and Digidata 1440A (Molecular Devices, San José, CA, USA) as previously published [23]. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries (World Precision Instruments, Sarasota,


A
SLC8B1
***
Log2 expression level
MSS
MSI-I
MSI-h
B
a
b
c
d
C
NCLX -
NCLX +
NCLX ++
D
Cumulative incidence
NCLX +
NCLX -
NCLX ++
RFS : log rank p=0.01
Follow-up (months)
E
Enrichment plot:
KESHELAVA_MULTIPLE_DRUG_RESISTANCE
Enrichment score (ES)
Ranked list metric (Pearson)
Zero cross at 13688
Rank in Ordered Dataset
Enrichment profile
Hits
Ranking metric scores
F
Orai1
Orai1
Cell-cycle Arrest at G2/M Phase
Metabolic Targeting for Cancer Therapy
PTP Sensitization
Apoptosis
NCLX
NCLX
Δ Ψm
Δ Ψm
PTP
Closed
PTP
Opened
Ca2+
ROS
Ca2+
ROS
MCU
MCU

◂**Fig. 7** NCLX expression and clinical parameters of a cohort of patients with MSI CRC. **A** Boxplots showing the mRNA expression profile of NCLX in primary CRC tissues from the TCGA dataset according to their MSI/MSS status (MSS, $n=423$; MSI-Low [MSI-L], $n=100$; MSI-High [MSI-H], $n=81$). B/ Representative NCLX expression during the differentiation of the colonic epithelium (COLOMIN cohort). **C** Representative NCLX immunostainings of three groups of patients with CRC classified according to their NCLX expression level (COLOMIN cohort). **D** Kaplan–Meier plots (cumulative incidence in function of follow-up of patients with CRC) showing RFS of the COLOMIN cohort ($P=0.01$ by the log-rank test). **E** GSEA of the KESHELAVA multiple drug resistance signature in primary MSI CRC tissues from the TCGA dataset. **F** Schematic diagram of the main findings of the study

FL,USA) with a P-1000 Flaming/Brown micropipette puller (Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) and polished using DMF1000 (World Precision Instruments). The resistance of filled pipettes was 2–4 MΩ. Under the whole-cell configuration, only cells with < 8 MΩ series resistance and tight seals (> 16 GΩ) were chosen for recordings. The cells were maintained at a + 30 mV holding potential during experiments. The Clampfit 10.1 software was used for data analysis. The solutions used for this procedure were:

- *Bath solution*: 115 mM sodium methanesulfonate, 10 mM CsCl, 1.2 mM $MgSO_4$, 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 20 mM $CaCl_2$ and 10 mM glucose (pH adjusted to 7.4 with NaOH);
- *Pipette solution*: 115 mM caesium methanesulfonate, 10 mM caesium BAPTA (Tetrasodium 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N*,*N*,*N*′,*N*′-tetraacetate), 5 mM $CaCl_2$, 8 mM $MgCl_2$ and 10 mM HEPES (pH adjusted to 7.2 with CsOH). Based on the Maxchelator software (http://maxchelator.stanford.edu/), the calculated free Ca^{2+} was 150 nM.

Calcium release-activated channel (CRAC) currents were recorded in the ORAI1 knockout (KO) HEK293 cells expressing 4 µg EYFP-STIM1 along with 1 µg Orai1-CFP. The transfected cells were incubated with or without 10 µM curcumin for 20 min before patch-clamp recording.

Identifying mitochondria–endoplasmic reticulum contact sites using bioluminescence resonance energy transfer

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays were carried out as described previously [26]. Briefly, $5–10\times10^3$ HCT116 cells containing the BRET-based biosensor named MERLIN (Mitochondria-ER Length Indicative Nanosensor) were seeded into a white 96-well plate (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) for 48 h. Next, cells were incubated with CGDP for 3 h or transfected with control/NCLX small interfering RNA (siRNA) (30–50 nM) for 48 h. Then, cells were incubated with 5 µM coelenterazine h (Promega, Madison, WI, USA) in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min in the dark. Subsequently, BRET1 measurements were carried out in an INFINITE M PLEX plate reader (Tecan, Switzerland) at room temperature, measuring *Renilla* luciferase 8 (Rluc8) and mVenus emissions. In every experiment, Rluc8-L1-B33C (donor of the BRET pair) alone was transfected in HCT-116 cells 16 h prior to BRET measurement. The BRET signal was calculated as the acceptor emission relative to the donor emission and corrected by subtracting the background acceptor/donor ratio value detected when RLuc8-L1-B33C is expressed alone.

SeaHorse analysis

The cellular oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) data were obtained using a Seahorse™ XF96 Flux Analyzer from Seahorse Bioscience (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) as we described previously [57]. The experiments were performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, HCT116 cells were seeded in XF96 cell culture plates at 2×10^4 cells/well, and then, cells were treated with 10 µM curcumin or CPG37157 for 12 h. On the day of analysis, the culture medium was replaced with XF Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) supplemented with 2 mM glutamine and lacking bicarbonate (pH 7.4). The cells were then incubated at 37 °C in a non-CO_2 incubator for 1 h and measurements were performed as described in the relevant figure legends. Sequential injection of 10 mM glucose, 1 µM oligomycin, 100 µM dinitrophenol (DNP) and 0.5 µM rotenone/antimycin A permitted the determination of the main respiratory and glycolytic parameters. Finally, the data were normalised to the amount of DNA present in the cells and assayed using Cyquant® Cell Proliferation Assay kit (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The data were acquired with the Seahorse Wave Controller and analyzed with the Seahorse Wave Desktop Software.

OmniLog analysis

Metabolic profiling was studied using the OmniLog® Phenotype Microarray™ system (Biolog, Hayward, CA, USA) to evaluate the cell's ability to metabolise 367 different carbon and energy substrates [51]. According to the manufacturer's instructions, HCT116 cells were cultured at 2×10^4 cells/well for 24 h in the presence of 10 µM curcumin in PM-M1, PM-M2, PM-M3 and PM-M4 plates (Biolog) in a phenol red-free RPMI-1640-based medium depleted of carbon energy sources (IFM1 medium, Biolog) supplemented

with 0.3 mM glutamine, 5% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Following the incubation, 10 µL Redox Dye Mix MB (Biolog, Hayward, CA, USA) was added. Kinetically, tetrazolium reduction was measured at 37 °C over 6 h with the OmniLog® automated incubator-reader. Data are acquired with the Data Collection 2.4 software and analyzed with the PM-M Kinetic and PM-M Parametric software programs. The area under the curve (AUC) of each metabolite consumption was determined using the *opm* package in the R environment after correction of the background signal with the negative control wells.

Subcutaneous colorectal cancer xenograft

CRC xenografts were established by injecting 5×10^6 tumor cells per mouse. Swiss nude mice were randomized regarding their tumoral volume into treatment groups ($n = 8$–9/group) after the mean tumor volume reached ~200 mm^3. Mice were given saline with vehicle (DMSO/EtOH) MWF, curcumin at 150 mg/kg per dose (MWF) or CGP37157 at 150 mg/kg (2 times a week). Curcumin, ITH12575 and CGP37157 solutions were prepared at 10 mM in a DMSO/ethanol mixture (60/40). A dilution in a saline solution was carried out to obtain the final desired concentration. All treatments were administered intraperitoneally (IP). Tumors were measured twice each week with calipers and tumor volumes were calculated using the formula (4/3*π*(length/2)*((width/2)*(width/2)). All mice were assessed weekly using whole-body bioluminescent (BLI) imaging to quantify relative amounts of tumor burden. Each mouse was given 150 mg/kg body-weight of D-luciferin potassium salt (Interchim) and anesthetized with ketamine/xylazine. BLI images were acquired 3–5 min after injection and collected in real time until a saturation plateau was reached in the lateral, ventral and dorsal positions. Photons count emitted by the tumor was performed by a photon imager system. Regions of interest were drawn around the tumor and metastases. Tumor burden was quantified as the relative amount of photons produced from the luciferase activity in cells and expressed in cpm using Photovision + software (version 1.3; Biospace Lab). Authorisation (Apafis 19933) was given by the regional ethical committee CEEA—003 (Campus CNRS, Orléans) and MESRI (French Ministry of Higher Education, Research and Innovation).

Mathematical models of tumor growth

The change in tumor volume over time was described using a generalized logistic model as previously published [58]. This model included three parameters: first-order growth rate constant (k_{growth}), maximum tumor volume (Vmax) and the power coefficient (γ). These parameters were estimated using nonlinear mixed-effects modeling. This approach aims at quantifying the inter-subject distribution of each model parameter in the population, by estimating their mean and inter-subject standard deviation, as well as quantifying the association of factors of variability (referred to as covariates) and the inter-subject distribution of model parameters. We tested the influence of compounds (CGP37157, ITH12575 and curcumin) as covariates of Vmax, because its inter-subject standard deviation was the only one that could be estimated. This influence was tested using the likelihood ratio test (LRT). This analysis was performed using MonolixSuite2019 (Lixoft®, Antony, France).

Mid-infrared spectroscopy

Total blood collected from the xenograft mouse model was analyzed at D0 (as the beginning of the experiment) and D40 (as 40 days after treatment began) by MIR spectroscopy using a Lumos microspectrophotometer (Bruker, Billerica, MA, USA). Acquisitions were made in transmission mode on a ZnSe multi-plate. Spectrum pre-treatments with smoothed second derivatives and vector normalization were operated. Statistical treatments were performed in the R environment. Statistical models were built with two goals in mind. The first objective was to estimate a decision rule that takes a spectrum as input and returns the probability that the sample belongs to a given group. The second objective was to return a signature of the treatment: a set of wavelengths that characterize the difference between the two compared groups.

The Lasso penalized logistic regression was used, because it allows one to deal with both of the aforementioned goals at once; in particular, it is a powerful method for variable selection [59]. This method is implemented in the *glmnet* package in the R environment. A k-fold cross-validation function was run to select the penalisation constant that controls the sparsity of the estimator.

Successively, the day and the treatment variable were entered as the dependent variable, Y, in the logistic regression model and coded as 1 for the target group and 0 for the others.

To assess predictive performance, the dataset is randomly divided into a training set and a validation set. If the total effect is large enough, Monte Carlo cross-validation is used with 30 repetitions to obtain 30 sets of misclassification errors [60]. When the total number of samples was smaller than 20, the leave-one-out approaches performed and leads to one estimated error per observation [61].

We fitted the logistic LASSO regression using the training dataset only and predicted the groups of the test data using the fitted models. Then, classification errors were computed for the test dataset. The cut-off value of the probability

for classification, which was needed for calculating the test misclassification errors, was set at 0.5.

The MIR spectral variable assignment (cm^{-1}) was as follows: 3320, λ_{CH} stretching in lipids; 3220, λ_{OH} carboxyl groups; 3100–3050, amide B band of proteins; 2813, lipid band tail (aliphatic chains $\lambda_{CH2/CH3}$); 1750, $\lambda_{C=O}$ esterified lipids (cholesterol, triglycerides and phospholipids); 1600–1680, amide I band of proteins (sensitive to secondary structure); 1520–1580, amide II band of proteins; 1450, fat deformation λ_{CH}; 1380, lipid λ_{CH3} bending; 1350, fat deformation CH_3; 980, alcohol function CO; and 900, aromatic rings.

Metabolomic analysis

Liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry (LC–HRMS) was performed after an extraction with 400 µL of methanol from 25 µL of plasma. An Ultimate WPS-3000 UPLC system (Dionex, Germany) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and operated in positive and negative electrospray ionization modes (ESI + and ESI-, respectively; separate analysis for each ionization mode) was used for this analysis. Liquid chromatography was performed using a Phenomenex Kinetex 1.7 µm XB—C18 column (150 mm × 2.10 mm) maintained at 55 °C. Two mobile phase gradients were used. The gradient was maintained at a flow rate of 0.4 mL/min over a runtime of 20 min. Two different columns were used to increase the metabolic coverage. Accordingly, a hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) column (150 mm × 2.10 mm, 100 Å) was also used. During the full-scan acquisition, which ranged from 58 to 870 m/*z*, the instrument operated at 70,000 resolution ($m/z = 200$).

As required for all biological analyses, the pre-analytical and analytical steps of the experiment were validated based on the findings of quality control (QC) samples (mix of all the samples analyzed). Coefficients of variation (CV% = [standard deviation/mean] × 100) were calculated from all metabolite data. If a metabolite had a CV > 30% in QC samples, it was excluded from the final dataset. QC samples were analyzed at the beginning of the run, every 13 samples and at the end of the run.

The samples were subjected to a targeted analysis, based on a library of standard compounds (Mass Spectroscopy Metabolite Library [MSML®] of standards, IROA Technologies, Ann Arbor, MI, USA). The following criteria were followed to identify the metabolites: (1) retention time of the detected metabolite within ± 20 s of the standard reference; (2) exact measured molecular mass of the metabolite within a range of 10 ppm around the known molecular mass of the reference compound; and (3) correspondence between isotopic ratios of the metabolite and the standard reference [62, 63]. The signal value was calculated using the Xcalibur® software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) by integrating the chromatographic peak area corresponding to the selected metabolite.

Univariate analysis

The univariate analysis of metabolite levels between groups was realized using the non-parametric Mann–Whitney test in the XLSTAT software (Addinsoft, Paris, France). $P < 0.05$ was considered significant.

Multivariate analysis

Multivariate analyses were performed as described previously [62, 63] using the SIMCA P + 13.0 software (Umetrics, Umea, Sweden), which included a principal component analysis (PCA) and an orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA). The data analysis was preceded by unit variance scaling. The quality of the model was described by the cumulative modeled variation in the X matrix R2 X, the cumulative modeled variation in the Y matrix R2 Y and the cross-validated predictive ability Q2 values.

To evaluate the significance of the created model, cross-validation analysis of variance (CV-ANOVA) was applied. The discriminant metabolites named variable importance in projection (VIP) obtained from OPLS-DA were all considered as responsible for the differences between samples.

Pathway analysis

Metabolites of VIP obtained from the final OPLS-DA model were introduced in the pathway analysis module in the MetaboAnalyst platform.

Quantification and statistical analysis

The data are presented as the mean ± standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) and were analyzed using GraphPad 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). In the box plot, the box represents the 25th–75th interquartile range, the midline in the box represents the median and the solid square box represents the mean. To test single variables between two groups, a paired Student's *t* test or Mann–Whitney test was performed. One-way ANOVA followed by post hoc Tukey's test was used for multiple comparisons. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Curcumin inhibited proliferation and induced cell cycle arrest of colorectal cancer cells

We investigated the role of curcumin in regulating the biology of CRC cells. Curcumin (0–10 µM) dose-dependently reduced the viability of these cells based on the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2*H*-tetrazolium bromide (MTT) assay (Fig. 1A) and the Sulforhodamine B (SRB) assay (Supplementary Fig. 1A). Moreover, 10 µM curcumin decreased the proliferation of HCT116 cells, a CRC cell line, for up to 72 h (Fig. 1A, left). This pattern was identical in two other MSI cell lines, Lovo and SW48 cells (Supplementary Fig. 1B). Interestingly, curcumin had no effect on the proliferation of a non-tumorigenic epithelial colorectal cell line, NCM356 (Fig. 1A right). We next examined whether curcumin affected the proliferation of CRC cells by using the spheroid three-dimensional (3D) assay. There was a significant reduction in HCT116 and Lovo multicellular spheroid volume with respect to the control group after administration of 10 µM curcumin for 48 h (Fig. 1B) confirmed by the measure of the cell viability index (Fig. 1C). Cell-cycle analysis revealed that curcumin induced a large, dose-dependent increase in the percentage of HCT116 and SW48 cells in the G2/M phase (Fig. 1D), suggesting that curcumin can reduce cell proliferation by preventing mitosis.

Curcumin inhibited mitochondrial Ca^{2+} extrusion and induced reactive oxygen species production with mitochondrial membrane potential depolarization

Cell proliferation is controlled by intracellular Ca^{2+} and ROS, with mitochondria acting as a Ca^{2+} buffer and ROS generators [14]. We measured $mtCa^{2+}$ in HCT116 and SW48 cells by loading the cells with Rhod-2AM, an $mtCa^{2+}$-sensitive dye. Curcumin treatment for 1 h induced a sharp increase in the $mtCa^{2+}$ concentration under basal conditions (Fig. 2A, Supplementary Fig. 2A). Cells were then stimulated with ATP, a purinergic G protein-coupled receptor (P2Y) agonist that is coupled to phospholipase Cβ activation and subsequent inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) production. IP3 binds to IP3 receptors (IP3R) and then mediates Ca^{2+} transfer from the endoplasmic reticulum (ER) to the mitochondria. Curcumin had no effect or moderate effect on $mtCa^{2+}$ uptake, but inhibited $mtCa^{2+}$ efflux after stimulation with 100 µM ATP on HCT116 cells or with 10 µM histamine on SW48 (Fig. 2B, Supplementary Fig. 2B). Recently, we have shown that NCLX is the most important actor of $mtCa^{2+}$ extrusion in CRC cells and that inhibiting NCLX (*SLC8B1*) expression and function prevents $mtCa^{2+}$ extrusion without affecting $mtCa^{2+}$ uptake (Supplementary Fig. 2C, D)[19]. To confirm these effects on NCLX, we performed $mtCa^{2+}$ uptake and release experiments Na^{+} dependent on permeabilized HCT116 cells (Supplementary Fig. 2E, F). Permeabilized HCT116 cells suspended in intracellular Na^{+}-free buffer. As expected, a slow Ca^{2+} extrusion was observed after Na^{+} injection in CGP37157 and curcumin-treated cells without additive effect. The knockdown of either NCLX function (through the over-expression of the S486T mutant, described as a dominant-negative) or expression significantly reduced the effect of curcumin on cell viability (Fig. 2C). Interestingly, the pharmacological inhibition of NCLX, using CGP37157, in addition to curcumin during 24 h did not reduce the cell viability when compared to either curcumin or CGP37157 alone, suggesting that both compounds are acting on the same mechanisms or the same target (Fig. 2D). Altogether, these suggest that curcumin effect on cell viability is mediated by an effect on the NCLX-dependent $mtCa^{2+}$ efflux. Through the modulation of Na^{+} influx and Ca^{2+} efflux, NCLX directly acts on the mitochondrial potential [19]. Here, we observed that both curcumin and CGP37157 induce a depolarization in HCT116 as visualized through the measure of the fluorescence of the mitochondrial potential reporter dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRE). Interestingly, the addition of curcumin and CGP37157 during 1 h does not produce additional depolarization, arguing that both drugs modulate mitochondrial potential through NCLX (Fig. 2E with TMRE).

A further consequence of $mtCa^{2+}$ overload is the generation of mtROS. Using mitoSOX dye to monitor the generation of mtROS, we observed that curcumin induces a dose-dependent increase of mtROS in HCT-116 and SW48 cell lines (Fig. 2F and Supplementary Fig. 2C). 5-FU treatment and pharmacological inhibition of NCLX with CGP37157 also increased mtROS in a same range as curcumin (Fig. 2F and Supplementary Fig. 3A).

All treatments for 1 h including curcumin, pharmacological inhibitors of NCLX (CGP37157 or ITH12575) and downregulation of NCLX with siRNA not only increased mtROS but also enhanced cytosolic ROS demonstrated by the measure of DCFDA (Fig. 2G–J). Here, we observed that the silencing of NCLX expression can also impair cell cycle similarly to curcumin (Fig. 2K). Overall, our results indicate that curcumin may regulate $mtCa^{2+}$ efflux and ROS production through the inhibition of NCLX.

Curcumin and NCLX inhibition decreased store-operated calcium entry

In non-excitable cells, the intracellular Ca^{2+} concentration is controlled by store-operated calcium entry (SOCE) through

CRAC, which are encoded by Orai proteins located at the plasma membrane of CRC cells. This influx is important for several cellular processes, including proliferation, migration and invasion [22]. NCLX inhibition through siRNA knockdown in CRC cells and in HEK293 cells leads to the inhibition of plasma membrane Orai1 channels and reduces SOCE [19, 23]. Here, using the whole-cell patch-clamp technique, we observed that curcumin abolished the Orai1-mediated I_{CRAC} currents induced by Thapsigargin (Tg) in an heterologous expression system co-expressing STIM1 and Orai-1 (Fig. 3A). In addition, curcumin pre-treatment for 1 h reduced SOCE in HCT116 cells (Fig. 3B). To identify the mechanism involved in regulation of SOCE, the messenger RNA (mRNA) levels of the Ca^{2+} handling proteins *MCU*, *NCLX*, *MICU1*, *MICU2*, *STIM1*, *STIM2*, *Orai1,* and *TRPC1,* only *MICU1* was significantly increased after 24 h treatment with curcumin, suggesting that its effect is not mediated by transcriptional mechanisms (Fig. 3C). To determine whether curcumin-dependent changes in SOCE and CRAC are mediated by a change in STIM1 oligomerisation, we monitored the formation of STIM1-RFP puncta in HCT116 cells after Tg-induced ER Ca^{2+} depletion. Indeed, oligomerisation of STIM1 coupled with ER Ca^{2+} depletion is necessary for CRAC activation. Numerous puncta were formed following Tg stimulation and curcumin had no significant effect (Fig. 3D). Interestingly, this reduced Ca^{2+} influx induced by curcumin was also observed in NCLX KO cells (Fig. 3E) or after CGP37157 treatment (Fig. 3F). As expected, molecular silencing and pharmacological inhibition of NCLX reduced Ca^{2+} influx in a similar manner than curcumin.

Curcumin and NCLX inhibition altered colorectal cancer metabolism

Cancer cell proliferation and mitosis are highly dependent of the cellular energy produced by mitochondria through mitochondrial oxidative phosphorylation [24]. $mtCa^{2+}$ and mtROS are key players in the control of mitochondrial metabolism and ATP production. Because $mtCa^{2+}$ regulates three TCA cycle dehydrogenases, we hypothesized that by targeting NCLX, curcumin or CGP37157 affects mtROS and $mtCa^{2+}$ to limit cellular bioenergetics. To test this hypothesis, we determined the effects of these compounds on mitochondrial respiration (OXPHOS) and aerobic glycolysis (Fig. 4A–C). Both curcumin and CGP37157 treatment reduced the intact cellular oxygen consumption rate (OCR) in HCT116 cells; this change was associated with a reduction in basal respiration, maximal respiration, proton leak and ATP production (Fig. 4C, left). By contrast, curcumin and CGP37157 had no significant effects on glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve (Fig. 4C, right). Hypoxia significantly increased the expression of HIF1α compared with normoxia. Under both conditions, NCLX inhibition by curcumin or CGP37157 significantly reduced the activity of HIF1α (Fig. 4D). Surprisingly, we found an opposite effect in cells transfected with siRNA against NCLX. In this condition, the reduction in NCLX increased HIF1α in both normoxic and hypoxic conditions (Fig. 4D). Pathak et al. [19] showed that inhibition of NCLX expression with either short hairpin (shRNA) or CRISPR/Cas9 knockout enhances HIF1a activation and increases the ECAR of HCT116 cells with an increase in glycolysis. Altogether, these data suggest that curcumin may affect cancer cell viability by its action on NCLX and impairing mitochondrial respiration.

Previous transcriptomic analysis showed that glycolysis-related genes are upregulated in HCT116 NCLX KO cells [19]. To measure the impact of curcumin on the remodeling of the metabolism, we performed real-time quantitative PCR on a set of 76 genes associated with metabolism. Confirming the bio-energetic results, curcumin treatment had a moderate effect on glycolysis-related genes or antioxidant genes (Supplementary Fig. 4). In terms of energy metabolism, there was a significant decrease in the expression of Glut1 (SLC2A1) and Glut4 (SLC2A4) transporters, as well as hexokinase 2, associated with an increase in glucokinase regulator (GCKR) expression and a decrease in PFKFB1 and B4 (glycolysis activator) expression. These changes favor an overall decrease in carbohydrate metabolism. We also observed a decrease in MCT2 (lactate import) and lactate dehydrogenase A transcripts. Transcript quantification showed an increase in MCT4 (lactate export) and lactate dehydrogenase C associated with the decrease in PDHB (pyruvate dehydrogenase E1 complex or PDC-E1) and a drop in PDP1 (PDC activator) as well as PDC inhibitors (Supplementary Fig. 4). Taken together, these results strongly suggest that curcumin decreases the use of pyruvate for oxidative phosphorylation and increases the lactate efflux. However, in the context of complexes such as PDC, we cannot make assumptions about enzymatic activities. With regard to oxidative metabolism, curcumin induced a decrease in GLRX5 and PRDX3 expression and an increase in the GPX family of enzymes (Supplementary Fig. 4). However, these genes were poorly expressed, suggesting that they would have a moderate effect on ROS levels. Finally, curcumin increased the expression of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (NRF2) target genes (Supplementary Fig. 4). This phenomenon could explain the presence of oxidative stress. NRF2 expression was enhanced following curcumin treatment in normoxic conditions and following curcumin or siNCLX treatment in hypoxic conditions (Supplementary Fig. 3B). However, these treatments did not affect the activity of NRF2 induced by its nuclear translocation (Supplementary Fig. 3C).

To better characterize the metabolic effects of curcumin, we used the OmniLog® Phenotype MicroArray, which allows to generate a map of the metabolism phenotype of

cancer cells. Treating HCT116 cells with curcumin blocked the metabolism of L-glutamine, L-tryptophan, L-methionine, adenosine, L-phenylalanine, glycine, L-tyrosine, L-homoserine and different dipeptides (Fig. 4E). By contrast, b-gentiobiose, D-cellobiose, turanose, D-tagatose, D-fructose-6-phosphate, *N*-acetyl-D-glucosamine pectin and different dipeptides were only used by HCT116 cells treated with curcumin (Fig. 4E). In addition, 14 substrates were found in both curcumin-treated and non-treated HCT116 cells. Finally, curcumin induced a decrease in the use of major substrates, both in terms of biological importance and level of use, such as D-glucose (−60%), D-mannose (−69%), D-maltose (−58%), dextrin (−55%) and D-glucose-6-phosphate (−20%), whereas there was an increase in the consumption of substrates such as glycogen (+21%), L-asparagine (+46%), L-lysine (+48%) and D- and L-lactic acid (+68%).

Taken together, these results suggest that NCLX inhibition with curcumin suppressed mitochondrial respiration, amino acid metabolism and HIF1α-dependent reduction in glycolytic substrate consumption.

NCLX inhibitors induced apoptosis via mitochondrial permeability transition pore sensitization and modification of endoplasmic reticulum–mitochondria contact sites

High ROS and Ca^{2+} levels in mitochondria with mitochondria membrane depolarization can trigger cell death following the opening of mPTP [14]. Apoptosis evaluated by flow cytometry indicated that curcumin dose-dependently increased apoptosis in HCT116 and SW48 cells (Fig. 5A and B). To determine whether NCLX plays a role in Ca^{2+}-induced mPTP opening, HCT116 cells were loaded with calcein-AM and cobalt was added to quench the cytosolic fluorescence of calcein. HCT116 cells were pre-treated for 1 h with either 10 µM of curcumin or 1 µM of cyclosporine A (CsA), an mPTP blocker, and exposed to ionomycin to increase $mtCa^{2+}$ (Fig. 5C). Remarkably, ionomycin induced more notable calcein fluorescence quenching in HCT116 cells pre-treated with curcumin or CGP37157 for 1 h compared to control (DMSO) (Fig. 5C, E). In addition, ionomycin induced greater quenching of calcein fluorescence in HCT116 NCLX KO cells compared with HCT116 WT cells (Fig. 5D). These effects were fully reversed by pre-treatment with CsA, indicating that they are mediated by mPTP (Fig. 5E). Using Calcium Green-5N, we showed that there was greater mPTP activation in siNCLX-transfected HCT116 cells (Supplementary Fig. 3D). Taken together, either NCLX inhibition or curcumin can sensitise CRC cells to mPTP opening and consequently promote cancer cell death.

It has increasingly been recognized that the ER and mitochondria communicate at specific membrane contact sites called mitochondria-associated ER membranes (MAM) [25]. Perturbation of MAM function and/or structure elevates oxidative stress, irreparably damages mitochondria and reduces mitochondrial respiration. These effects have an impact on mitochondrial ATP production and apoptosis. Thus, we investigated the role of NCLX on ER–mitochondria contact sites using MERLIN, a newly developed BRET-based proximity biosensor, expressed in HCT116 cells (Fig. 5F) [26]. The MERLIN biosensor allows the detection of changes in distance in the nanometre range between the ER and mitochondria, by measuring the energy transfer between the mitochondrial outer membrane (MOM)-targeted Rluc8 (BRET donor) and the ER-targeted mVenus (BRET acceptor). Silencing NCLX substantially decreased the BRET signal (Fig. 5G), indicating a decrease in contact points between the ER and mitochondria (Fig. 5G, left). However, pharmacological inhibition of NCLX after 3 h pre-treatment strongly increased the BRET signal in a dose-dependent manner, suggesting more intimate contact between the ER and mitochondria under these conditions (Fig. 5G, right). This apparent discrepancy could be explained by temporal differences and/or modes of action between the siRNA approach and CGP37157 treatment. Increased interaction between the mitochondrial network and ER during early ER stress conditions has already been described [27] Taken together, these data suggest that inhibition of NCLX can contribute to apoptosis with complete sensitization of mPTP and to modified architecture and spatiotemporal regulation of ER–mitochondria contact sites.

NCLX inhibitors decreased colorectal cancer growth in vivo

The effects of curcumin, CGP37157 and ITH12575 were tested in a CRC-xenografted Swiss nude mouse model (schematic diagram, Fig. 6A). As shown in Fig. 6B (left panel), CRC xenografts that were treated with vehicle (DMSO, Control Group), curcumin, CGP37157 or ITH12575 showed a significant decrease of primary tumor growth at day 40 (tumoral volume or tumoral bioluminescence) compared with control mice. Based on mathematical modeling of tumor growth (Supplementary Fig. 5A, right), the estimated mean (inter-subject standard deviation) model parameters were $k_{growth} = 0.46\ day^{-1}$ (–), $V_{max} = 336\ mm^3$ (0.69) and $\gamma = 0.34$. More precisely, tumor volume doubled in 1.5 days and reached a maximum average value of 336 mm^3 in the control group. Vmax was significantly decreased by twofold in the presence of either CGP37157 ($P = 0.033$) or curcumin ($P = 0.040$). In the presence of ITH12575, there was a non-significant trend for decreased Vmax ($P = 0.081$). At the end of the study, the impact of treatments on the proliferation

of HCT116 tumor xenografts was detected through Ki67 staining (Supplementary Fig. 5B). The results revealed that Ki67-positive cells were significantly decreased in curcumin, CGP37157 and ITH12575 groups (Supplementary Fig. 5B). Moreover, the expression of NCLX in all groups was analyzed by immunohistochemistry. Surprisingly and interestingly, it appears that repeated treatments during 40 days reduced NCLX expression in the tumors and more significantly in ITH12575 group (Supplementary Fig. 5C).

Metabolic mid-infrared signatures predicted tumor size and were specific for each NCLX blocker

Because we found that curcumin and NCLX inhibitors are regulators of cancer cell metabolism, we aimed to identify some circulating biomarkers of these effects. Using MIR spectroscopy of dried plasma and serum from mice that had been xenografted with CRC cells, we looked for a specific tumor metabolic signature related to NCLX inhibitors and curcumin to gain insights into the similarities between the mechanisms of action of curcumin, CGP37157 and ITH12575 on NCLX.

The analysis was performed in control, curcumin-treated, CGP37157-treated or ITH12575-treated mice. Supplementary Fig. 5D presents spectral signatures between D0 and D40. The five most discriminating variables between the two groups or two subsets were identified as shown in Fig. 6D: control, 3081, 2813, 1670, 984 and 902 cm^{-1}; curcumin, 3048, 1738, 1730, 1520 and 1345 cm^{-1}; CGP37157: 1740, 1732, 1520, 1462 and 1347 cm^{-1}; and ITH12575, 3080, 1734, 1450, 1355 and 1344 cm^{-1}. The signature was mainly linked to protein absorption bands at 1664, 1653, 1643, 1546 and 1534 cm^{-1}. These bands are assigned to the amide vibrations of proteins, suggesting drastic changes in plasma/serum proteins. Interestingly, this signature was correlated with tumor size in the control group and was lost in the treated groups, therefore confirming a 'treatment' effect on tumor size (Fig. 6E). To investigate whether curcumin treatment or NCLX blockers yield similar MIR signatures, we performed sequential predictive tests to determine the spectral signatures of mice at D40 according to a dichotomous decision tree (Fig. 6F). Matrices easily discriminated the control group from the treated groups. Moreover, this method allowed us to discriminate the curcumin-treated group from the two other treatments (CGP37157 or ITH12575). The analysis between the CGP37157-treated and ITH12575-treated groups was trickier, which was not surprising given that ITH12575 is a derivative of CGP37157.

In summary, the identified MIR signatures support major metabolic alterations in the mechanisms that underlie the anti-tumoral efficacy of curcumin and other NCLX inhibitors.

High-resolution mass spectrometry full-scan analysis revealed a role for NCLX in the control of protein and amino acid synthesis

To focus on the metabolites that are modified following NCLX inhibition during tumor growth, we used LC-HRMS full-scan analysis of serum extracts from our experimental mouse model and compared metabolomic modulation of each group (between D0 and D40) (Fig. 6G). The variable importance in projection (VIP) list and biochemical pathways allowed us to link or to discriminate each group with a panel of particular metabolites and pathways. For all groups, we observed a change in the metabolism of pyrimidines. Pantothenate and CoA biosynthesis pathways are affected for the control/CGP37157-treated and ITH12575-treated groups. Beta alanine metabolism is also modified under control and CGP37157 conditions. There are also specific modifications such as glycine–serine–threonine metabolism for the control group or arginine metabolism for the CGP37157-treated group. Finally, the biosynthetic pathway of unsaturated fatty acids for the ITH12575-treated group is modified. Taken together, these results suggest an important role of pyrimidine metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis, beta alanine metabolism and glycine–serine–threonine metabolism in tumor development and that NCLX inhibitors limit the activation of these pathways. These data suggest metabolic differences over time in each group prior to implantation of tumor cells and during tumor development (Fig. 6G).

To further characterize the metabolic modifications linked to NCLX through the three treatments, we compared the metabolites analyzed in the treated groups to the metabolites in the control group. We found a common base of metabolite modification in our three treated group: choline, guanine, lumichrome, lyxose were upregulated (red color) and methylcytosine was downregulated (blue color) (Fig. 6H). These results suggest a possible anti-tumoral effect by these pathways. We also found metabolites modification such as methionine, nepsilon, succinate or alpha glucose 1-phophate, glycerate, retinoate, deoxycytidine, and trimethylamine that were only present in two groups: CGP/curcumin or CGP/ITH12575 (Fig. 6H). We also found some metabolites found in only one group (Fig. 6H). The combination of these results suggests an important role for NCLX in the control of protein and amino acid synthesis and methylation through the regulation of choline and possibly methionine metabolism (variation common to all 3 groups of inhibitors).

Transcriptomic and tissue microarray analysis highlighted the association between NCLX expression and the MSI status and survival of patients with colorectal cancer

Analysis of patients with CRC in TCGA dataset showed that higher *SLC8B1* (NCLX) mRNA expression was associated with MSI status (Fig. 7A). In all tumor stages, *SLC8B1* expression tended to be higher in CRC tumors with high MSI (MSI-H) compared to tumors with MSS and low MSI (MSI-L). The difference observed was significant for stage II (Supplementary Fig. 6A). Previous investigations have proposed different classifications of patients with CRC [28, 29]. In the classification proposed by Guinney et al. [28], *SLC8B1* expression was higher in CMS1 molecular subtype defined by a worst relapse survival and an MSI status [28] (Supplementary Fig. 6B). In the classification of gastrointestinal cancers proposed by Liu et al. 2018 [29], *SLC8B1* mRNA expression was significantly higher in MSI and genome stable (GS) molecular subtypes (Supplementary Fig. 6C). Altogether, these data indicate that *SLC8B1* expression is strongly associated to the MSI status of patients with CRC.

NCLX protein expression was next analyzed on TMA-based collection of 302 patients with MSI CRC (COLOMIN cohort). We evaluated the NCLX expression with regard to tumor stages. Most patients at advanced stages had lower NCLX protein expression. Of note, loss of NCLX expression was associated with tumor grade in poorly differentiated cancers (Fig. 7B, a–d; $P < 0.0001$). Subsequent analysis revealed that the NCLX expression level was inversely associated with perineural invasion ($P < 0.0001$) and vascular emboli ($P < 0.02$), suggesting a protective role of this exchanger in CRC. We found that NCLX was expressed in 237 of 261 normal tissue samples (91%), with granular cytoplasmic staining (Fig. 7C). In the cancerous tissues analyzed with TMA, NCLX remained expressed in 183 of 321 samples (57%), with either moderate-intensity (Fig. 7C, panel NCLX+) or high-intensity (Fig. 7C, panel NCLX++) staining; in 138 cancer tissue samples, NCLX expression was lost (Fig. 7C, panel NCLX−).

Based on Cox univariate analysis, NCLX expression was associated with RFS (Fig. 7D). Tumors with loss of NCLX expression (Fig. 7C, panel NCLX-) recurred more than those that retained NCLX expression (Fig. 7C, panel NCLX+). Surprisingly, tumors with increased NCLX expression (Fig. 7C, panel NCLX++) had an even worse prognosis than the patients with retained or lost NCLX expression. This finding suggests that NCLX is normally expressed normally in non-cancerous epithelial cells and its loss of expression is associated with an aggressive progression of epithelial tumors. At the same time, however, over-expression of this exchanger can lead to a worsened evolution of the disease. In line with these data, GSEA of the transcriptomic CRC dataset from TCGA revealed a positive correlation between *NCLX* expression and the multiple drug resistance signature in patients with MSI (Fig. 7E). Our main results are summarized in a schematic diagram (Fig. 7F).

Discussion

Understanding the mechanisms of curcumin-mediated apoptosis and subsequent cell cycle arrest has important implications for anti-cancer therapy [30]. Over the last few years, the mechanisms of Ca^{2+} signaling have been greatly improved, especially how its alterations in cancer participate in modifying key processes such as proliferation, metabolism and sensitivity to cell death [18]. Recent evidences highlighted that $mtCa^{2+}$ is closely associated with the hallmarks of cancer, and MCU and NCLX play key roles in CRC carcinogenesis [19, 31]. The main results of the present study are the demonstration of the $mtCa^{2+}$-dependent effects of curcumin on NCLX and the potential anti-tumoral effect of NCLX blockers in CRC. Ca^{2+} homeostasis directly regulates the expression and activation of cell cycle protein complexes [32]. NCLX silencing or curcumin treatment led to an accumulation of cells at the G2/M checkpoint.

Curcumin induced a high $mtCa^{2+}$ level by blocking $mtCa^{2+}$ efflux through NCLX. Our data showed that pharmacological inhibition of NCLX in CRC cells caused $mtCa^{2+}$ overload and an increase in mitochondrial and cytosolic ROS production associated with a mitochondrial membrane depolarization. Kostic et al. demonstrated that mild fluctuations in $\Delta\Psi m$, which do not affect Ca2+ influx, are sufficient to strongly regulate NCLX [33]. Furthermore, complete mitochondrial depolarization and de-energization lead to reversal of NCLX activity preceding toxic $mtCa^{2+}$ accumulation [34]. Our results do not allow us to show whether curcumin directly blocks NCLX or whether the action is governed by an effect on the mitochondria membrane potential. However, the study from Mustapha et al. showed that the increase of mitochondrial calcium is nearly occurring in parallel with curcumin accumulation, and precedes ROS production and the $\Delta\Psi m$ decreasing, suggesting a direct impact of curcumin on NCLX in the first instance [35, 36].

Intrinsic apoptosis involves $mtCa^{2+}$ and mtROS overload and mitochondria membrane depolarization leading to mPTP opening and release of cytochrome *c* [15]. Curcumin treatment induced apoptosis in a dose-dependent manner. We found that curcumin treatment can lead to a sustain increase of the rate of mPTP activation in CRC cells. Consistently, NCLX KO cells and cells treated with CGP37157 had greater mPTP activation. These effects were reversed by pre-treatment with a PTP inhibitor (CsA). In the same vein as our findings, curcumin induced $mtCa^{2+}$ overload selectively in malignant breast cancer cells. Of note, the authors

found that CGP-37157 and bortezomib co-treatment activates paraptotic signals in cancer cells, similar to curcumin [36]. In addition, it was reported that blockade of MCU by ruthenium red (RR) or Ru360 prevents the increase of $mtCa^{2+}$ by curcumin, and inhibits the apoptosis induced by curcumin in breast cancer and leukemia cells [36, 37].

In non-excitable cells, including most cancer cells, store-operated Ca2+ entry (SOCE) represents the major and calcium-entry pathways.

Mitochondria control SOCE entry through NCLX and redox signals. Silencing of NCLX induced Orai1 inactivation through oxidation of a critical cysteine (Cys195) in the third transmembrane helix of Orai1 [23]. In agreement with this finding, the replacement of the reactive cysteine residue with serine at a specific Orai1 (C195S) site significantly altered the sensitivity of I_{CRAC} to curcumin, suggesting that the Cys195 is the target residue for the inhibitory action of this compound through ROS signaling [38]. As we previously showed in CRC cell lines with NCLX KO [19], the pharmacological blockade of NCLX by curcumin or CGP37157 decreases SOCE in CRC cells. We also confirmed the effect of curcumin treatment on Orai1-dependent CRAC current.

The fine regulation of Ca^{2+} in MAM is paramount for the management of metabolism and cell death [39]. Cancer cells need a constitutive transfer of Ca^{2+} from the ER to mitochondria for their survival [40, 41]. Our data showed that NCLX targeting disrupted MAM contacts. Remodeling of cancer cell metabolism according to nutrient availabilities is a hallmark of cancer [39]. $mtCa^{2+}$ uptake plays an essential role in the control of aerobic metabolism. In physiological condition, mitochondrial matrix Ca^{2+} regulates the activity of TCA cycle dehydrogenases [42]. The inhibition of $mtCa^{2+}$ uptake induced a bio-energetic crisis and metabolic reprogramming. However, the effect of $mtCa^{2+}$ efflux has been poorly described. Recently, Assali et al. highlighted a key pathway through which $mtCa^{2+}$ efflux permits a robust activation of respiration in response to profound mitochondrial respiratory uncoupling, while preventing the activation of cell death pathways [43].

In our previous study, we reported that NCLX loss in CRC cells leads to reduced oxygen consumption, increased glycolysis and increased transcription of major glycolytic enzymes and transporters (19). This increased transcription of glycolytic enzymes is under the control of HIF1α. This transcriptional factor is upregulated in response to increased mtROS resulting from loss of NCLX and subsequent increase in $mtCa^{2+}$. In the present study, we demonstrated that curcumin and NCLX inhibition suppressed mitochondrial respiration and amino acid metabolism without increasing the glycolysis process. This latter finding is in contrast to the effect observed by Pathak et al., suggesting either an adaptation (metabolic reprogramming) of siNCLX-treated cells and NCLX KO cells, or an off-target effect of curcumin or CGP37157. At the molecular level, the differential effect of NCLX KO and NCLX inhibitors on glycolysis can be explained by the expression of HIF1a. We showed that unlike NCLX KO cells, NCLX inhibitors reduced HIF1a expression which is a strong regulator of glycolysis-related genes. Additional experiments should be carried out to refine the understanding of the mechanism of action of NCLX blockers.

In vivo, we demonstrated that NCLX inhibitors reduced the tumor size of NMRI nude mice grafted with HCT116 cells. The effect of curcumin on tumor growth may be explained by its effect on cell proliferation or by induction of apoptosis (see Fig. 1) and by its anti-angiogenic potency as observed in Supplementary Fig. 7 (showing a completely inhibited endothelial tube formation). We thus reasoned that cancer cells with or without NCLX blockers could affect the global metabolism of mice. Interestingly, using MIR spectroscopy on whole blood from xenografted mice, we found a five-element signature in the control group that correlated with tumor size. This correlation was lost in the treated groups, suggesting the possibility to follow and to model tumor growth with minimally invasive peripheral biomarkers. Moreover, spectral analysis at D40 allowed us to isolate a five-element signature specific for each group, thereby allowing discrimination of the experimental groups. Intriguingly, CGP37157 and curcumin caused identical spectral modifications at 1730–1740, 1520 and 1345–1347 cm^{-1}, suggesting a similar global effect in these particular subgroups. To further support our findings, we used metabolomics to identify shared pathways and metabolites among treatments compared with the control group; this analysis produced a similar pattern as seen with MIR spectroscopy. In all groups, we observed a change in pyrimidine metabolism. It is well known that cancer cells alter their metabolism to increase the flux of de novo pyrimidine synthesis to support a high proliferative phenotype [44]. Interestingly, NCLX inhibitors appeared to limit the function of pyrimidine metabolism. More specifically, metabolites of methylcytosine, choline and guanine were particularly affected by the blockade of NCLX. These results provide evidence that NCLX is a key 'crossroad' factor in the control of protein and amino acid synthesis and methylation. Choline modulates epigenetic marking of genes, and choline deficiency is correlated with the silencing of several tumor suppressor genes responsible for DNA repair (hMLH1) and cell cycle regulation (p15 and p16) [45].

In the future, we aim to distinguish unique metabolic profiles or easy-to-implement signatures that would be useful as minimally invasive biomarkers of tumoral NCLX expression in a clinical context.

In the first randomized controlled trial using curcumin in combination with FOLFOX chemotherapy for patients with

metastatic CRC, researchers showed that this combination is a safe and tolerable treatment that could benefit patients with longer overall survival, but the number of patients was too low to make definitive conclusion [46]. Our TCGA analysis showed that *SLC8B1* mRNA levels are significantly higher in CRC tumors with high MSI (MSI-H) compared to tumors with MSS and low MSI (MSI-L). In the classification proposed by Guinney et al. [28], *SLC8B1* expression is higher in CMS1 molecular subtype and associated with a worst relapse survival and a MSI status suggesting that mtCa2+ extrusion through NCLX function has a critical role in MSI CRC. In our cohort of patients with MSI CRC, NCLX expression decreased in the advanced CRC stages. NCLX expression was associated with poor tumor differentiation but lower perineural sheathing and/or vascular emboli. Loss of NCLX expression was associated with worse RFS in Cox univariate analysis. Interestingly, we found a subgroup of patients with MSI CRC (13–15%) with increased NCLX expression; they had an even worse prognosis than patients who had maintained or lost NCLX expression. Additional investigations will be necessary to understand the origin of these different subgroups with increased or lost NCLX expression. Moreover, CGP37157 has been reported to prevent neurotoxicity in response to the chemotherapeutic agent salinomycin. This protective effect was not observed when head and neck squamous cell carcinoma cells were co-treated with salinomycin and CGP37157 [47]. Prospective trials need to evaluate the combination of chemotherapy plus curcumin in patients with NCLX-expressing MSI CRC to improve the efficacy and decrease the adverse events of standard treatment.

In summary, our findings provide very strong evidence that curcumin and NCLX blockers inhibit CRC cell growth by enhancing cellular oxidative stress and $mtCa^{2+}$ overload associated with a mitochondria membrane depolarization, thereby leading to mPTP-dependent cell apoptosis. Our works also show that reducing mitochondrial respiration, HIF1α and MAM perturbations contribute to these mechanisms. These findings support a novel anti-tumoral mechanism for NCLX, particularly in patients with MSI CRC, a clinical finding that has never been described before to our knowledge.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00018-022-04311-4.

Acknowledgements We thank Dr Virginie André, Julien Sobilo, and Isabelle Domingo for technical assistance. Inserm UMR 1069 is leader of Cancéropole Grand-Ouest 3MC network (Marine Molecules, Metabolism and Cancer), member of Région Centre—Val de Loire thematic research consortium RTR MOTIVHEALTH (Molecular and Technological Innovation for Health) and member of CNRS research group APPICOM (Integrative Approach for a multiscale functional analysis of membrane proteins). We acknowledge Inserm, Université de Tours and Région Centre-Val de Loire for their financial supports.

Author contributions Study concept and design: MG, WR, and TL. Acquisition of data: MG, SI, JB, AR, TP, XZ, JD, DT, RG, HFR, AL, SL, RC, MO, OS, OH, GFH, DTo, and TL. Analysis and interpretation of data: MG, SI, JB, AR, TP, XZ, DC, JD, DT, VM, HFR, AL, SL, ALP, JFD, PGF, AG, RC, FG, AJGS, PE, OS, OH, GFH, CV, DTo, MT, WR, and TL. Drafting of the manuscript: MG, SI, JB, PE, OS, CV, DTo, MT, WR, and TL. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: All. Statistical analysis: MG, SI, JB, VM, PE, DTo, WR, and TL. Obtained funding: MG, AG, DTo, WR, and TL. Study supervision: MG, WR, and TL.

Funding This project was partly supported by grants on behalf of the following french department committees of Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest: 16 (Charente), 37 (Indre-et-Loire), 49 (Maine-et-Loire), 72 (Sarthe) and 85 (Vendée). Maxime Guéguinou is a recipient of a 3-years postdoctoral grant from Région Centre—Val de Loire (Opticoregumine project). Sajida Ibrahim was partly funded by ARFMAD (Association Recherche et Formation dans les Maladies de l'Appareil Digestif). Alison Robert is a recipient of a 3-years doctoral grant from Inserm/ Région Centre – Val de Loire. David Crottès is a recipient of SMART LOIRE VALLEY fellowship from LE STUDIUM Loire Valley Institute for Advanced Studies. COLOMIN cohort was supported in part by a grant from the association "Sport et Collection" and "Ligue Contre le Cancer, Comités départementaux de la Vienne, Charente et Charente-Maritime" (David Tougeron).

Availability of data and materials Data will be made available on reasonable request.

Declarations

Conflict of interest No competing interests were disclosed by authors.

Ethics approval and consent to participate COLOMIN study was designed in accordance with legal requirements and the Declaration of Helsinki, and was approved by the ethics committee of CHU Poitiers and CHRU Tours, France (Comité de protection des personnes Ouest III, no. DC-2008-565 and no. 2018-039).

References

1. Evrard C, Tachon G, Randrian V, Karayan-Tapon L, Tougeron D (2019) Microsatellite instability: diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer. Cancers (Basel) 11(10):1567
2. Jo W-S, Carethers JM (2006) Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. Cancer Biomark 2(1–2):51–60
3. Tougeron D et al (2015) Predictors of disease-free survival in colorectal cancer with microsatellite instability: an AGEO multicentre study. Eur J Cancer 51(8):925–934
4. Tougeron D et al (2020) Prognosis and chemosensitivity of deficient MMR phenotype in patients with metastatic colorectal cancer: an AGEO retrospective multicenter study. Int J Cancer 147(1):285–296
5. Allegra A, Innao V, Russo S, Gerace D, Alonci A, Musolino C (2017) Anticancer activity of curcumin and its analogues: preclinical and clinical studies. Cancer Invest 35(1):1–22
6. Ruiz de Porras V, Layos L, Martínez-Balibrea E (2020) Curcumin: a therapeutic strategy for colorectal cancer? Semin Cancer Biol 73:321–330

7. Katona BW, Weiss JM (2020) Chemoprevention of colorectal cancer. Gastroenterology 158(2):368–388
8. Jiang Z, Jin S, Yalowich JC, Brown KD, Rajasekaran B (2010) The mismatch repair system modulates curcumin sensitivity through induction of DNA strand breaks and activation of G 2 M checkpoint. Mol Cancer Ther 9(3):558–568
9. Giordano A, Tommonaro G (2019) Curcumin and cancer. Nutrients 11(10):2376
10. Yao Q et al (2015) Curcumin induces the apoptosis of A549 cells via oxidative stress and MAPK signaling pathways. Int J Mol Med 36(4):1118–1126
11. Morin D, Barthélémy S, Zini R, Labidalle S, Tillement J-P (2001) Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. FEBS Lett 495(1–2):131–136
12. Ben-Zichri S et al (2019) Cardiolipin mediates curcumin interactions with mitochondrial membranes. Biochim Biophys Acta Biomembr 1861(1):75–82
13. Hempel N, Trebak M (2017) Crosstalk between calcium and reactive oxygen species signaling in cancer. Cell Calcium 63:70–96
14. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O (2015) Calcium and ROS: a mutual interplay. Redox Biol 6:260–271
15. Rasola A, Bernardi P (2015) Reprint of 'The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells.' Cell Calcium 58(1):18–26
16. Pathak T, Trebak M (2018) Mitochondrial Ca2+ signaling. Pharmacol Ther 192:112–123
17. Romero-Garcia S, Prado-Garcia H (2019) Mitochondrial calcium: transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer. Int J Oncol 54(4):1155–1167 (**Review**)
18. Marchi S, Giorgi C, Galluzzi L, Pinton P (2020) Ca2+ fluxes and cancer. Mol Cell 78(6):1055–1069
19. Pathak T et al (2020) Dichotomous role of the human mitochondrial Na+/Ca2+/Li+ exchanger NCLX in colorectal cancer growth and metastasis. Elife 9:e59686
20. Guéguinou M et al (2021) L'échangeur ionique NCLX—un rôle ambivalent dans la chronologie du cancer colorectal. Med Sci 37(2):124–126
21. Montero M et al (2000) Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca2+ transients that modulate secretion. Nat Cell Biol 2(2):57–61
22. Guéguinou M et al (2016) SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline. Oncotarget 7(24):36168
23. Ben-Kasus Nissim T et al (2017) Mitochondria control store-operated Ca2+ entry through Na+ and redox signals. EMBO J
24. Grasso D, Zampieri LX, Capelôa T, Van De Velde JA, Sonveaux P (2020) Mitochondria in cancer. Cell Stress 4(6):114–146
25. Missiroli S et al (2018) Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. Cell Death Dis 9(3):329
26. Hertlein V et al (2020) MERLIN: a novel BRET-based proximity biosensor for studying mitochondria–ER contact sites. Life Sci. Alliance 3(1):e201900600
27. Bravo R et al (2011) Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. J Cell Sci 124(Pt 13):2143–2152
28. Guinney J et al (2015) The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med 21(11):1350–1356
29. Liu Y et al (2018) Comparative molecular analysis of gastrointestinal adenocarcinomas. Cancer Cell 33(4):721-735.e8
30. Weng W, Goel A (2020) Curcumin and colorectal cancer: an update and current perspective on this natural medicine. Semin Cancer Biol
31. Vultur A, Gibhardt CS, Stanisz H, Bogeski I (2018) The role of the mitochondrial calcium uniporter (MCU) complex in cancer. Pflügers Arch - Eur J Physiol 470(8):1149–1163
32. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2018) Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies? Physiol Rev 98(2):559–621
33. Kostic M, Katoshevski T, Sekler I (2018) Allosteric regulation of NCLX by mitochondrial membrane potential links the metabolic state and Ca2+ signaling in mitochondria. Cell Rep 25(12):3465-3475.e4
34. Samanta K, Mirams GR, Parekh AB (2018) Sequential forward and reverse transport of the Na+ Ca2+ exchanger generates Ca2+ oscillations within mitochondria. Nat Commun 9(1):156
35. Moustapha A et al (2015) Curcumin induces crosstalk between autophagy and apoptosis mediated by calcium release from the endoplasmic reticulum, lysosomal destabilization and mitochondrial events. Cell Death Discov 1(1):15017
36. Yoon MJ, Kim EH, Kwon TK, Park SA, Choi KS (2012) Simultaneous mitochondrial Ca2+ overload and proteasomal inhibition are responsible for the induction of paraptosis in malignant breast cancer cells. Cancer Lett 324(2):197–209
37. Bae JH, Park J-W, Kwon TK (2003) Ruthenium red, inhibitor of mitochondrial Ca2+ uniporter, inhibits curcumin-induced apoptosis via the prevention of intracellular Ca2+ depletion and cytochrome c release. Biochem Biophys Res Commun 303(4):1073–1079
38. Shin DH, Nam JH, Lee ES, Zhang Y, Kim SJ (2012) Inhibition of Ca2+ release-activated Ca2+ channel (CRAC) by curcumin and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) via electrophilic addition to a cysteine residue of Orai1. Biochem Biophys Res Commun 428(1):56–61
39. Pavlova NN, Thompson CB (2016) The emerging hallmarks of cancer metabolism. Cell Metab 23(1):27–47
40. Ivanova H, Kerkhofs M, La Rovere RM, Bultynck G (2017) Endoplasmic reticulum-mitochondrial Ca2+ fluxes underlying cancer cell survival. Front Oncol 7:70
41. Cárdenas C et al (2016) Selective vulnerability of cancer cells by inhibition of Ca(2+) transfer from endoplasmic reticulum to mitochondria. Cell Rep 14(10):2313–2324
42. Gherardi G, Monticelli H, Rizzuto R, Mammucari C (2020) The mitochondrial Ca(2+) uptake and the fine-tuning of aerobic metabolism. Front Physiol 11:554904
43. Assali EA et al (2020) NCLX prevents cell death during adrenergic activation of the brown adipose tissue. Nat Commun 11(1):3347
44. Wang W, Cui J, Ma H, Lu W, Huang J (2021) Targeting pyrimidine metabolism in the era of precision cancer medicine. Front Oncol 11
45. Zeisel SH (2012) Dietary choline deficiency causes DNA strand breaks and alters epigenetic marks on DNA and histones. Mutat Res 733(1–2):34–38
46. Howells LM et al (2019) Curcumin combined with FOLFOX chemotherapy is safe and tolerable in patients with metastatic colorectal cancer in a randomized phase IIa trial. J Nutr 149(7):1133–1139
47. Scherzed A et al (2015) Effects of salinomycin and CGP37157 on head and neck squamous cell carcinoma cell lines in vitro. Mol Med Rep 12(3):4455–4461
48. Grossman RL et al (2016) Toward a shared vision for cancer genomic data. N Engl J Med 375(12):1109–1112
49. Ibrahim S et al (2019) Expression profiling of calcium channels and calcium-activated potassium channels in colorectal cancer. Cancers (Basel) 11(4):561

50. Palty R et al (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na+/Ca2+ exchange. Proc Natl Acad Sci U S A 107(1):436–441
51. Kouzi F et al (2020) Disruption of gap junctions attenuates acute myeloid leukemia chemoresistance induced by bone marrow mesenchymal stromal cells. Oncogene 39(6):1198–1212
52. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(−Delta Delta C(T)) method. Methods 25(4):402–408
53. Khuc T, Hsu C-WA, Sakamuru S, Xia M (2016) Using β-lactamase and NanoLuc luciferase reporter gene assays to identify inhibitors of the HIF-1 signaling pathway. Methods Mol Biol 1473:23–31
54. Nemani N et al (2018) MIRO-1 Determines mitochondrial shape transition upon GPCR activation and Ca2+ stress. Cell Rep 23(4):1005–1019
55. Pan X et al (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. Nat Cell Biol 15(12):1464–1472
56. Jones E et al (2017) A threshold of transmembrane potential is required for mitochondrial dynamic balance mediated by DRP1 and OMA1. Cell Mol Life Sci 74(7):1347–1363
57. Picou F et al (2018) *n*-3 Polyunsaturated fatty acids induce acute myeloid leukemia cell death associated with mitochondrial glycolytic switch and Nrf2 pathway activation. Pharmacol Res 136:45–55
58. Guéguinou M et al (2021) Synthetic alkyl-ether-lipid promotes TRPV2 channel trafficking trough PI3K/Akt-girdin axis in cancer cells and increases mammary tumour volume. Cell Calcium 97:102435
59. Kim SM, Kim Y, Jeong K, Jeong H, Kim J (2018) Logistic LASSO regression for the diagnosis of breast cancer using clinical demographic data and the BI-RADS lexicon for ultrasonography. Ultrasonography (Seoul, Korea) 37(1):36–42
60. Xu Q-S, Liang Y-Z, Du Y-P (2004) Monte Carlo cross-validation for selecting a model and estimating the prediction error in multivariate calibration. J Chemom 18(2):112–120
61. Molinaro AM, Simon R, Pfeiffer RM (2005) Prediction error estimation: a comparison of resampling methods. Bioinformatics 21(15):3301–3307
62. Diémé B et al (2015) Metabolomics study of urine in autism spectrum disorders using a multiplatform analytical methodology. J Proteome Res 14(12):5273–5282
63. Mavel S et al (2013) 1H–13C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. Talanta 114:95–102

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Authors and Affiliations

Maxime Guéguinou[1,3] · Sajida Ibrahim[1] · Jérôme Bourgeais[2] · Alison Robert[3] · Trayambak Pathak[4] · Xuexin Zhang[4] · David Crottès[3] · Jacques Dupuy[5] · David Ternant[1,6] · Valérie Monbet[7] · Roseline Guibon[3] · Hector Flores-Romero[8,9,10] · Antoine Lefèvre[11] · Stéphanie Lerondel[12] · Alain Le Pape[12] · Jean-François Dumas[3] · Philippe G. Frank[3] · Alban Girault[13] · Romain Chautard[1] · Françoise Guéraud[5] · Ana J. García-Sáez[8,9,10] · Mehdi Ouaissi[6] · Patrick Emond[11] · Olivier Sire[14] · Olivier Hérault[2] · Gaëlle Fromont-Hankard[3] · Christophe Vandier[3] · David Tougeron[15] · Mohamed Trebak[4] · William Raoul[1,3] · Thierry Lecomte[1,3,16]

1 EA 7501 GICC, Université de Tours, Tours, France

2 CNRS ERL 7001 LNOx, Tours, France

3 N2C, Nutrition Growth and Cancer, Faculté de Médecine, Université de Tours, Inserm, UMR 1069, Tours, France

4 Department of Cellular and Molecular Physiology, College of Medicine, The Pennsylvania State University, 500 University Dr, Hershey, PA 17033, USA

5 TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology)-Team E9-PPCA, Université de Toulouse, UMR 1331 INRAE, ENVT, INP-Purpan, UPS, Toulouse, France

6 EA4245 Transplant Immunology and Inflammation, Université de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France

7 IRMAR Mathematics Research Institute of Rennes, UMR-CNRS 6625, Rennes, France

8 Institute for Genetics, University of Cologne, Cologne, Germany

9 Cologne Excellence Cluster On Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, Cologne, Germany

10 Interfaculty Institute of Biochemistry, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Germany

11 UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 37000 Tours, France

12 CNRS UPS44, CIPA, PHENOMIN-TAAM, Orléans, France

13 Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, UR UPJV 4667, University of Picardie Jules Verne, Amiens, France

14 IRDL Institut de Recherche Dupuy de Lôme, UMR-CNRS, 06027 Vannes, France

15 Hepato-Gastroenterology Department, Poitiers University Hospital and Faculty of Medicine of Poitiers, 86000 Poitiers, France

16 Department of Hepato-Gastroenterology and Digestive Oncology, CHRU de Tours, Tours, France

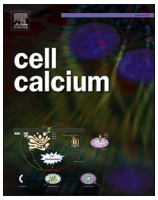
Cell Calcium 108 (2022) 102673



Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca





Calcium signaling: A therapeutic target to overcome resistance to therapies in cancer

Olivier Romito [a], Maxime Guéguinou [a], William Raoul [a], Ophélie Champion [a], Alison Robert [a], Mohamed Trebak [c], Caroline Goupille [a,b,1], Marie Potier-Cartereau [a,*,1]

[a] Inserm UMR 1069, Nutrition Croissance Cancer, Faculté de Médecine, Université de Tours, F-37032, France, Réseau 3MC « Molécules Marines, Métabolisme et Cancer » and Réseau CASTOR «Cancers des Tissus Hormono-Dépendants » Cancéropôle Grand Ouest, France
[b] CHRU de Tours, hôpital Bretonneau, Tours, France
[c] Vascular Medicine Institute, Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA, USA

ARTICLE INFO

Keywords:
Calcium signaling
Chemoresistance
Calcium channels
Cancer
Potassium channels

ABSTRACT

Innate and acquired resistances to therapeutic agents are responsible for the failure of cancer treatments. Due to the multifactorial nature of resistance, the identification of new therapeutic targets is required to improve cancer treatment.

Calcium is a universal second messenger that regulates many cellular functions such as proliferation, migration, and survival. Calcium channels, pumps and exchangers tightly regulate the duration, location and magnitude of calcium signals. Many studies have implicated dysregulation of calcium signaling in several pathologies, including cancer. Abnormal calcium fluxes due to altered channel expression or activation contribute to carcinogenesis and promote tumor development. However, there is limited information on the role of calcium signaling in cancer resistance to therapeutic drugs. This review discusses the role of calcium signaling as a mediator of cancer resistance, and assesses the potential value of combining anticancer therapy with calcium signaling modulators to improve the effectiveness of current treatments.

1. Introduction

Standard chemotherapy uses a class of cytotoxic drugs formulated to fight against the proliferation, invasion and metastasis of cancer cells. The interaction of chemotherapeutic drugs with either DNA or proteins alters or halts cellular functions and induces cell death, mainly by apoptosis [1]. Cytotoxic agents, like alkylating agents (nitrogen mustards, ethylenamine and methylenamine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes or platinum-containing antineoplastic agents), stabilizers of DNA cuts (topoisomerase inhibitors, including anthracycline) or antimetabolites (5-fluorouracil) interfere with DNA or its synthesis to prevent proliferation. Mitotic spindle poisons (vinca alkaloids or taxane) act on the cytoskeleton, particularly tubulin. Hormonal therapy, signal transduction inhibitors, proteasome inhibitors (bortezomib, carfilzomib) or differentiation agents act on cell proliferation, cell survival or cell differentiation. Antibodies used in immunotherapy, like rituximab (anti-CD20), target specific proteins of cancer cells to inhibit their signaling pathways. Combining chemotherapeutic agents increases treatment response efficacy, but many cancer cells develop chemoresistance [2]. Decreased treatment effectiveness is the consequence of two distinct mechanisms: the intrinsic resistance of cells to therapeutic agents, which precedes exposure to the drugs, and drug resistance acquisition, which requires prior exposure to drugs.

Several studies have documented the role of mutations in tumor suppressor genes or proto-oncogenes as drivers of chemoresistance. In addition, DNA damage repair and alteration of mitochondrial-controlled survival or cell death are critical for chemoresistance [2].

Calcium (Ca^{2+}) is a ubiquitous intracellular second messenger that controls a variety of cellular functions such as cell differentiation, migration, proliferation, exocytosis, contraction, metabolism and gene expression [3–6]. At the plasma membrane, Ca^{2+}signals are modulated by voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCC), Ca^{2+}release-activated Ca^{2+}

* Corresponding author at: Inserm UMR 1069, Nutrition Croissance Cancer, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé 37032 TOURS cedex 1, France.
E-mail addresses: olivier.romito@etu.univ-tours.fr (O. Romito), maxime.gueguinou@univ-tours.fr (M. Guéguinou), william.raoul@univ-tours.fr (W. Raoul), ophelie.champion@etu.univ-tours.fr (O. Champion), alison.robert@etu.univ-tours.fr (A. Robert), trebakm@pitt.edu (M. Trebak), caroline.goupille@univ-tours.fr (C. Goupille), marie.potier-cartereau@univ-tours.fr (M. Potier-Cartereau).
[1] Contributed equally

https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102673
Received 11 October 2022; Received in revised form 8 November 2022; Accepted 9 November 2022
Available online 12 November 2022
0143-4160/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

channels (CRAC), transient receptor potential channels (TRP) and Ca^{2+}pumps and exchangers. VGCC are mostly found in excitable cells (neurons and muscle cells), and are responsible for Ca^{2+}entry activated by plasma membrane depolarization [7]. In non-excitable cells, Ca^{2+}entry is typically triggered by activation of G protein coupled receptors (GPCR) or receptor tyrosine kinases (RTKs). Stimulation of these receptors, which couple to isoforms of phospholipase C (PLC), results in the production of Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) and diacylglycerol (DAG). IP_3 triggers Ca^{2+}release from the endoplasmic reticulum (ER) through IP_3 receptors (IP_3R) and consequently depletes ER Ca^{2+}stores. This store depletion activates store-operated Ca^{2+}entry (SOCE) mediated by CRAC channels [8]. In some instances, DAG activates store-independent Ca^{2+}entry channels (SICE) encoded by canonical TRP (TRPC) channels [9]. DAG can also be enzymatically converted into arachidonic acid, wich activates the store-independaent arachidonate-regulated Ca^{2+}(ARC) channels. The plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) and the sodium-Ca^{2+} exchanger (NCX) are responsible for discontinuation of Ca^{2+}signals by extruding Ca^{2+} from the cytosol to the external space [10,11].

Intracellular organelles, including the ER and mitochondria, are major intracellular reservoirs of Ca^{2+}. In addition to IP_3R, ryanodine receptors (RYR) are involved in Ca^{2+}release from ER, while ER Ca^{2+}uptake is mediated by the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) [12]. The voltage-dependent anion channel (VDAC) on the outer mitochondrial membrane and the mitochondrial Ca^{2+}uniporter (MCU) on the inner mitochondrial membrane are responsible for Ca^{2+}uptake into the mitochondria, while the mitochondrial Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCLX) and the mitochondrial H^+/Ca^{2+} antiporter (LETM1) mediate mitochondrial Ca^{2+} extrusion [12,13]. Over the last decade, it has become evident that Ca^{2+} channels and transporters act as novel regulators of specific steps in tumor progression.

Ca^{2+} signaling is a critical regulator of many cancer hallmarks, such as angiogenesis, invasiveness and migration [14]. Several studies have documented the role of VGCC-dependent entry, SOCE, SICE and Ca^{2+} exchangers in cancer cell proliferation, migration and invasion [15–26]. Ca^{2+}transfer between the ER and mitochondria is also involved in cancer aggressiveness [27]. In the ER, IP_3R, RYR and SERCA expression are altered in cancer cells [28–35]. MCU complex and its regulators, the mitochondrial Ca^{2+} uptake 1 and 2 (MICU1 and MICU2) and EMRE, a metazoan specific subunit, are dysregulated in hepatocellular carcinoma, breast, pancreatic and colorectal cancers [36–40]. NCLX, the major extrusion mediator of mitochondrial matrix Ca^{2+}, has recently been shown to be involved in colorectal cancer [11]. While evidence indicates that Ca^{2+} channels and Ca^{2+} signaling in general play a vital role in cancer [41], their role in chemoresistance is less understood. In this review, we aim to provide an overview of the literature on the involvement of Ca^{2+}channels in cancer chemoresistance.

2. Plasma membrane Ca^{2+} fluxes

2.1. Voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCC)

VGCC, also known as Ca_v, are implicated in Ca^{2+} influx controlled by plasma membrane depolarization. The diverse Ca_v1, Ca_v2 and Ca_v3 subunits are related to six Ca^{2+}current signatures (L-, N-, P-, Q-, R- and T-type Ca^{2+}channels) and are largely active in excitable cells [7]. Nevertheless, VGCC have also been detected in normal and malignant non-excitable cells [42]. In 2015, a meta-analysis described VGCC channel mRNAs expression in different types of cancer compared to normal tissue. The results indicated that VGCC mRNA are up-regulated in cancer samples compared to normal tissues [43]. In addition, it would appear that the α2δ1 subunit of VGCC is a marker of cancer stem cells, and likely contributes to chemoresistance [44].

The T-type (Ca_v3) and L-type Ca^{2+} (Ca_v1) channels are the two main kinds of VGCC aberrantly expressed in different cancers and involved in chemoresistance process [43]. A significant inverse correlation was observed between L-type $Ca_v1.2$ expression and multidrug resistance in two independent diffuse large B-cell lymphoma (DLBLC) cohorts. In DLBLC rituximab-resistant patients, a decrease of mRNA and protein expression of $Ca_v1.2$ is associated with a lower CD20 stability compared with rituximab-sensitive patients [45]. Zhang et *al.* demonstrated that $Ca_v1.2$ expression is directly regulated by miR-363, whose high expression is associated with worse prognosis in DLBCL. VGCC agonists and antagonists support the participation of these channels in cancer cell lines viability [46–48]. The combined use of rituximab and an agonist of the L-type Ca^{2+} channel, Bay K8644, significantly increases apoptosis processes in DLBCL cell lines and markedly reduces tumor volume in vivo [45]. Administration of mibefradil or silencing of T-type Ca^{2+} channels reduces glioblastoma cell growth (U251, U87 and T98G), and increases apoptosis by decreasing surviving expression and AKT phosphorylation [49]. $Ca_v3.1$ is associated with increasing autophagy and viability in vemurafenib-resistant melanoma cells with a BRAF V600E mutation. The T-type Ca^{2+} channel blocker mibefradil reduces autophagy as well as cell viability, migration and invasion [50]. Interestingly, this information confirms results from Mickisch et *al.* (1990), which demonstrated that the treatment of multidrug-resistant nephrotic patients' tumors with chemotherapy and Ca^{2+} channel blockers (verapamil, diltiazem, flunarizine, nifedipine, and its derivatives nimodipine and nitrendipine) reduced tumor viability compared to samples that had been exposed to chemotherapy alone [51] (Fig. 1). We will discuss further the therapeutic potential of VGCC inhibitors in the fight against cancer cell chemoresistance.

2.2. Ca^{2+} release activated channels (CRAC)

In non-excitable cells, encompassing most cancer cells, store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) is the major and most studied Ca^{2+}-entry pathway. SOCE is activated in response to depletion of ER-ca^{2+} store following the stimulation of GPCR that couple to PIP2 hydrolysis and IP_3 production. ER Ca^{2+}store depletion is detected by ER luminal Ca^{2+}sensors, stromal interaction molecules 1 and 2 (STIM1 and STIM2), which gain and extended conformation, translocate to highly specialized ER-plasma membrane junctions near to active CRAC channels encoded by three Orai proteins (Orai1–3) [52,53].

SOCE is associated with the pro-migration and pro-invasion activity of cancer cells. High expression of SOCE proteins is correlated with poor survival prognosis in different tumor types [54]. Some evidence suggests that increased SOCE has a role in chemoresistance (Fig. 2). Orai1 and STIM1 overexpression are associated with SOCE increase in cisplatin-resistant A2780 ovarian cancer cells. It seems that AKT-dependent pathway activation is responsible for SOCE increase. 2-Aminoethoxydiphenylborane (2-APB), a non-selective SOCE blocker, and SH6, an AKT selective inhibitor, increase A2780cis sensitivity to cisplatin, and SH6 normalizes SOCE magnitude to the level of sensitive cells [55]. In addition, ovarian cancer cell IGROV1, resistant to cisplatin and to *Solanum incanum* extract, show increased SOCE compared to the parental cell lines. STIM1, STIM2 and Orai3 protein expression decrease in drug resistant cell lines while TRPC1, Orai1 and Orai2 increase in those models. Inhibition of SOCE by pharmacological tools such as SKF-96365, YM-58483 or 2-APB sensitizes chemoresistant IGROV1 cells to chemotherapeutic agents. However, the signaling pathways involved in this sensitization are not clear [56]. Orai3 overexpression in breast cancer correlates to chemoresistance in patients and cell lines. Orai3 acts through a PI3K/SgK1 pathway and inhibits paclitaxel, cisplatin and 5-FU induced apoptosis. These studies did not characterize the exact Ca^{2+}flux pathway to wich Orai3 contribute [57]. Sun and collaborators have observed a SOCE increase in human osteosarcoma MG63 cisplatin-resistant cells compared to sensitive cells due to STIM1 protein overexpression. A 24-hour cisplatin treatment decreases STIM protein expression and SOCE in sensitive cells, but not in drug-resistant cells. The survival of resistant cells seems to be linked to the cisplatin-induced

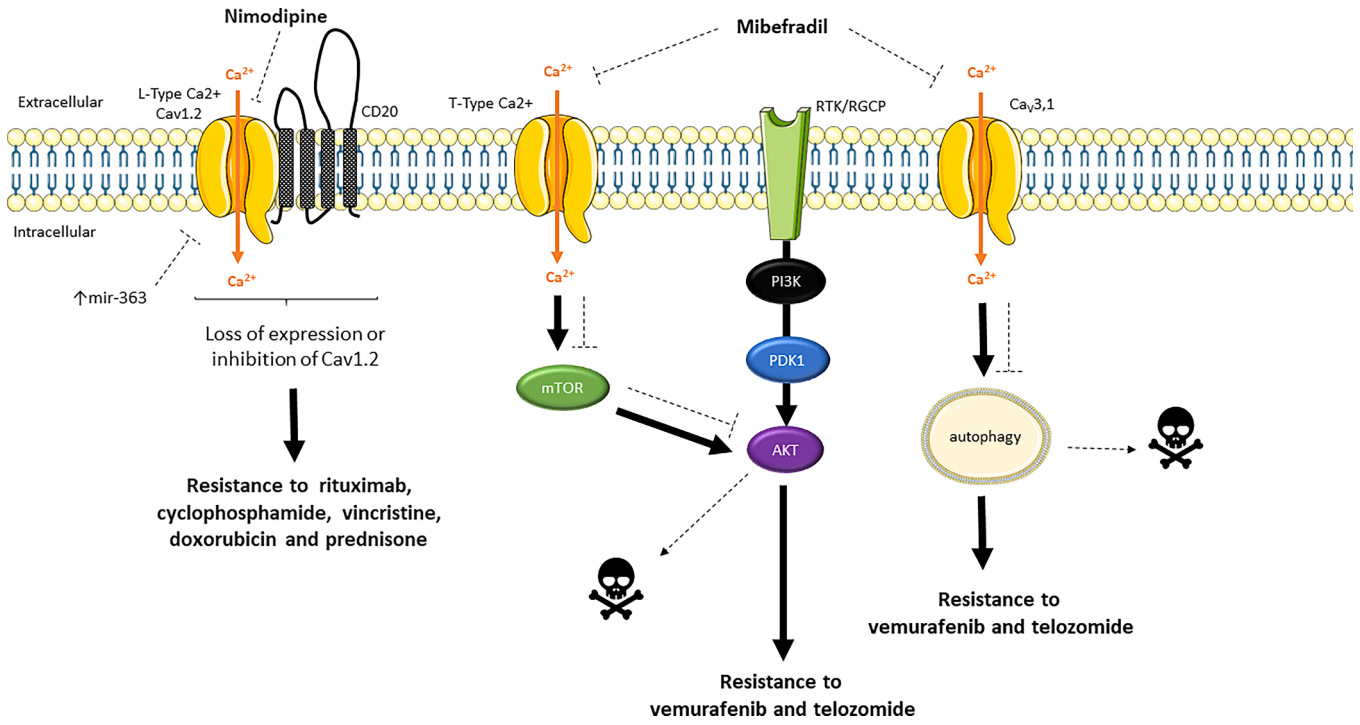


Fig. 1. Voltage-Gated-Ca^{2+}channels are associated to survival of chemoresistant cells T-Type Ca^{2+} channel ($Ca_v1.2$) downregulation by mir-363 contributes to drug resistance in diffuse large B-cell lymphoma. In glioblastoma cells, mibefradil inhibits T-Type Ca^{2+}channels and induces cell death in an AKT/mTOR-dependent pathway. In vemurafenib-resistant melanoma cells with a BRAF mutation, T-Type Ca^{2+}channel blocker mibefradil reduces autophagy as well as cell viability in a $Ca_v3.1$-dependent pathway.

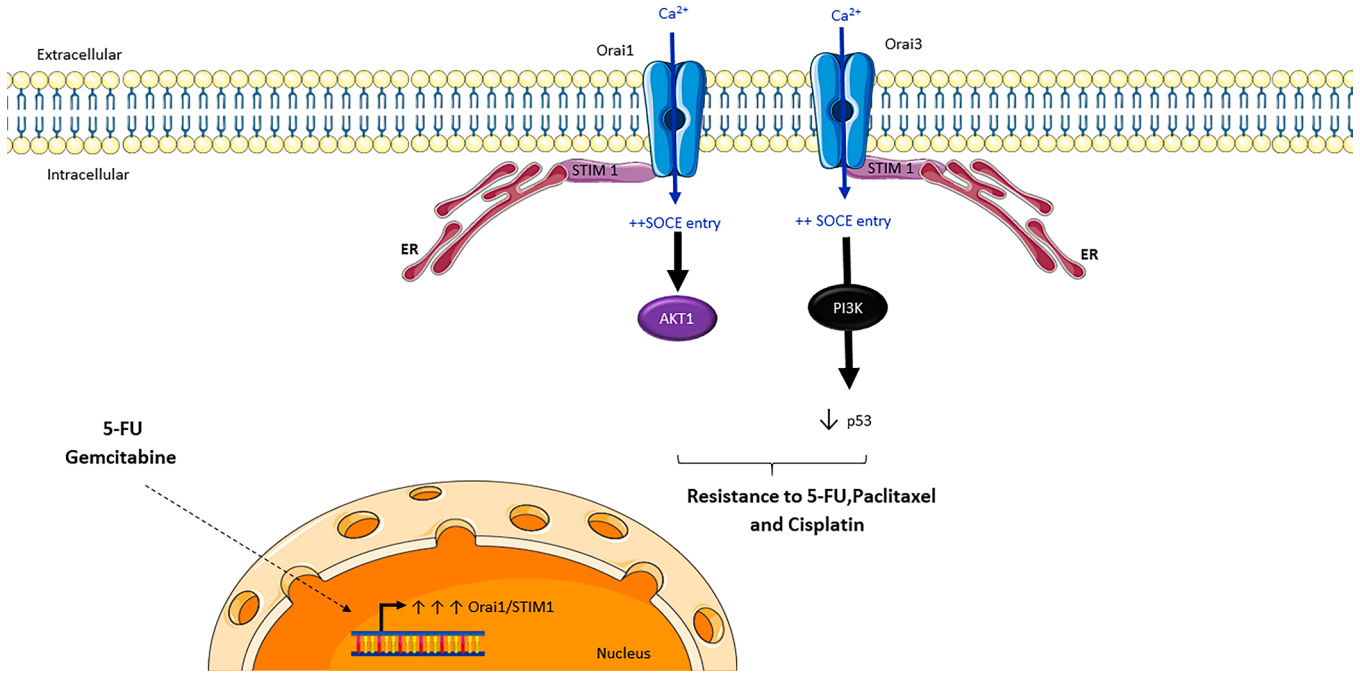


Fig. 2. Store Operated Ca^{2+}Channel (SOCE) involvement in chemoresistance. Increased SOCE is associated with cisplatin, 5-Fluorouracil (5-FU), paclitaxel or gemcitabine-resistance in several cancer models. Active AKT signaling or exposition to 5-FU or gemcitabine increases Orai1 and/or Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) expression.

ER stress inhibition by STIM1. In fact, STIM1 inhibition sensitizes cells to cisplatin, while its overexpression promotes cell survival [58]. A common overexpression of STIM1 and the Ribonucleoside diphosphate reductase 1 (RRM1) has been observed in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. The high expression of STIM1 is associated with increased SOCE and impaired ER stress, leading to increased nuclear factor of activated T-cells (NFAT) activity and epigenetic reprogramming. However, RRM1 (but not STIM1) is required to induce chemoresistance [59]. Orai1/STIM1-mediated SOCE is involved in 5-FU or gemcitabine resistance in hepatocellular carcinoma cells and

pancreatic adenocarcinoma [60,61]. These findings suggest that Orai1 expression is a predictor of 5-FU sensitivity for hepatocarcinoma and pancreatic adenocarcinoma treatment.

2.3. Transient receptor potential channels (TRP)

TRP channels are non-selective cation Ca^{2+} permeable channels. They are grouped in seven families: canonical TRP (TRPC), vanilloid TRP (TRPV), melastatin TRP (TRPM), ankyrin TRP (TRPA), mucolipin TRP (TRPML), polycistin TRP (TRPP) and no mechanoreceptor potential C TRP (TRPN). TRP channels are activated downstream receptor tyrosine kinase receptors and G protein-coupled receptor by diverse mechanism.

Several studies suggest that TRP channel expression is altered in cancers [18,62–64] but there is little information available about the role of TRP channels in chemoresistance. Though there are 28 members of the TRP channel family, few channels have been described to be involved in cancer chemoresistance and these are: TRPC5, TRPC6, TRPC1 TRPM2, TRPM8 and TRPA1 (Figs. 3 and 4).

In a study on multi-drug resistant hepatocellular carcinoma, Wen and colleagues demonstrated the pivotal role of Ca^{2+}entry through TRPC6 channels, wich were overexpressed in these cells and identified STAT3 activation as a downstream signaling pathway. In vitro, knockdown or blockade of TRPC6 by either siRNA or SKF-96365 attenuated multi-drug resistance in hepatocellular carcinoma cell lines, while targeting TRPC6 in vivo showed a synergistic antitumor effect combined with doxorubicin [65]. The role of TRPC5 in chemoresistance has been described in several models. In adriamycin-resistant breast cancer cells MCF-7/ADM, adriamycin treatment increases TRPC5 expression. Knockdown of TRPC5 by siRNA reduces autophagy and chemoresistance by downregulating of a CaMKIIβ/AMPKAα/mTOR pathway [66]. Silencing of TRPC5 by siRNA or with a blocking antibody reduces P-glycoprotein expression in adriamycin-resistant MCF-7 cells, which leads to nuclear drug localization and cell death [67]. TRPC5 and transcription factor NFATC3 overexpression in adriamycin, paclitaxel and 5-FU resistant cells are associated to a decrease of mir-320a expression due to DNA methylation alteration in MCF-7 and HCT-8 cell lines, as well as in breast- and colorectal-cancer-resistant cells [68]. In 5-FU-resistant HCT-8 and LoVo colon cancer cell lines, common TRPC5 and GLUT1 overexpression has been identified compared to 5-FU-sensitive cells. The TRPC5-dependent activity increases cytosolic Ca^{2+} concentration, and is associated with high glycolytic activity, promoting survival of resistant cells. Inhibition of glycolysis leads to decreased ATP production and induces mitochondrial Ca^{2+}overload, which in turn triggers the sensitization of resistant cells [69]. A common increase in TRPC5 and ABCB1 mRNA, a well-known pump required for drug efflux, has been identified in colorectal cancer cell lines. Activation of TRPC5-dependent Ca^{2+} signaling ensures nuclear translocation of β-catenin, leading to the expression of ABCB1. TRPC5 also mediates resistance to 5-FU [70]. On the contrary, in ovarian cancer, downregulation of TRPC1 contributes to drug resistance. TRPC1 expression is significantly decreased in cisplatin-resistant (A2780 and SKOV3) and carboplatin-resistant (A2780) ovarian cancer cell lines. Further, a study has shown that 8 microRNAs that target TRPC1 are associated with drug resistance in ovarian cancer [63].

In 2018, Takahashi and colleagues showed that TRPA1 promotes resistance to ROS-producing chemotherapies. Notably, TRPA1 inhibition decreased live cell number and increased cell death in response to carboplatin, doxorubicin and paclitaxel. In an HCC1569 xenograft model, TRPA1 knockdown decreased tumor growth and sensitized tumors to carboplatin treatment, which was associated with increased apoptosis [71].

The second member of the melastatin subfamily, TRPM2, is now considered as a potential therapeutic target in several types of cancer [72]. In gastric cancer cell lines, TRPM2 regulates autophagy in a JNK-dependent pathway. It also plays a role in the maintenance of

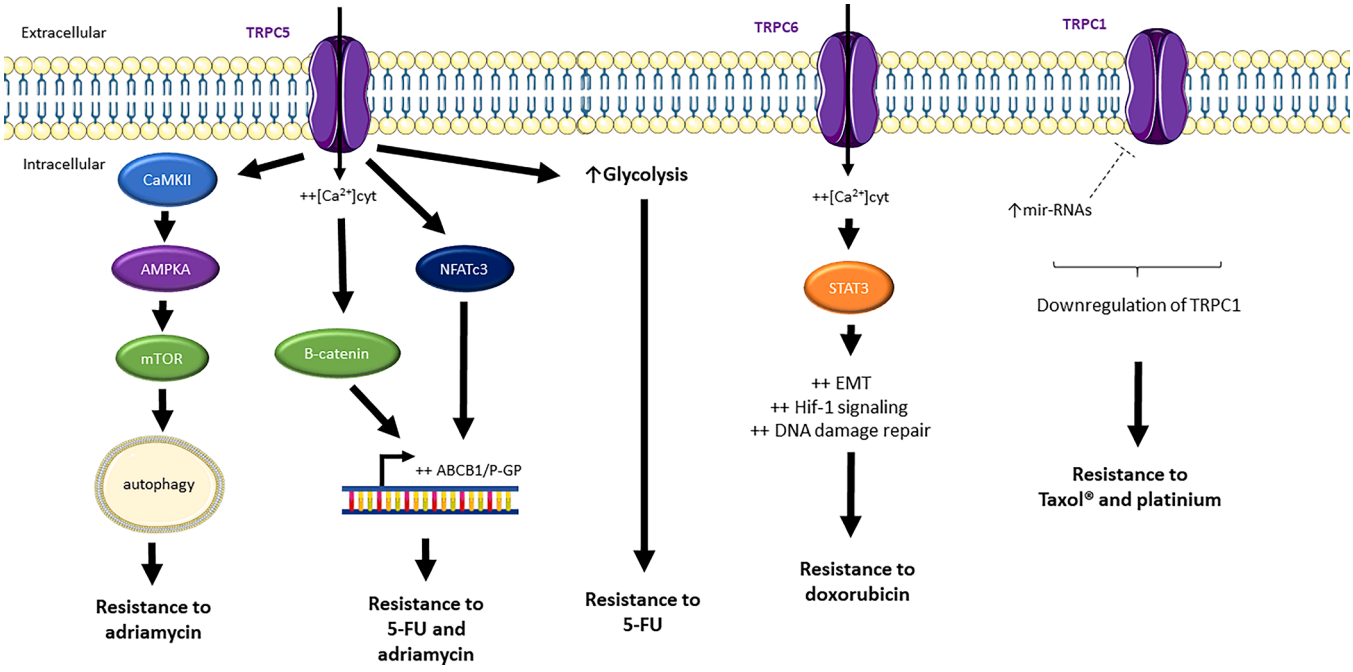


Fig. 3. Transient Receptor Protein Canonical channel (TRPC) involvement in chemoresistance Adriamycin treatment increases TRPC5 expression, leading to an activation of a calmodulin-dependent signaling pathway (CaMKII/AMPKA/mTOR), autophagy and chemoresistance. TRPC5 overexpression increases intracellular Ca^{2+}, β-catenin nuclear translocation and drug transporters (ABCB1/P-GP) expression, and leads to chemoresistance to 5-FU. TRPC5 overexpression increases P-GP expression in a NFATC3-dependent pathway, leading to alteration of adriamycin localization and chemoresistance. In 5-FU resistant cells, TRPC5 and the glucose transporter (GLUT1) are overexpressed. TRPC5 activity increases glycolysis and chemoresistance to 5-FU. TRPC6 mediates STAT3 activation and increases epithelial-mesenchymal transition, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling and DNA damage repair, leading to chemoresistance to doxorubicin. The downregulation of TRPC1 expression by mir-RNAs contributes to resistance to platinum and Taxol®.

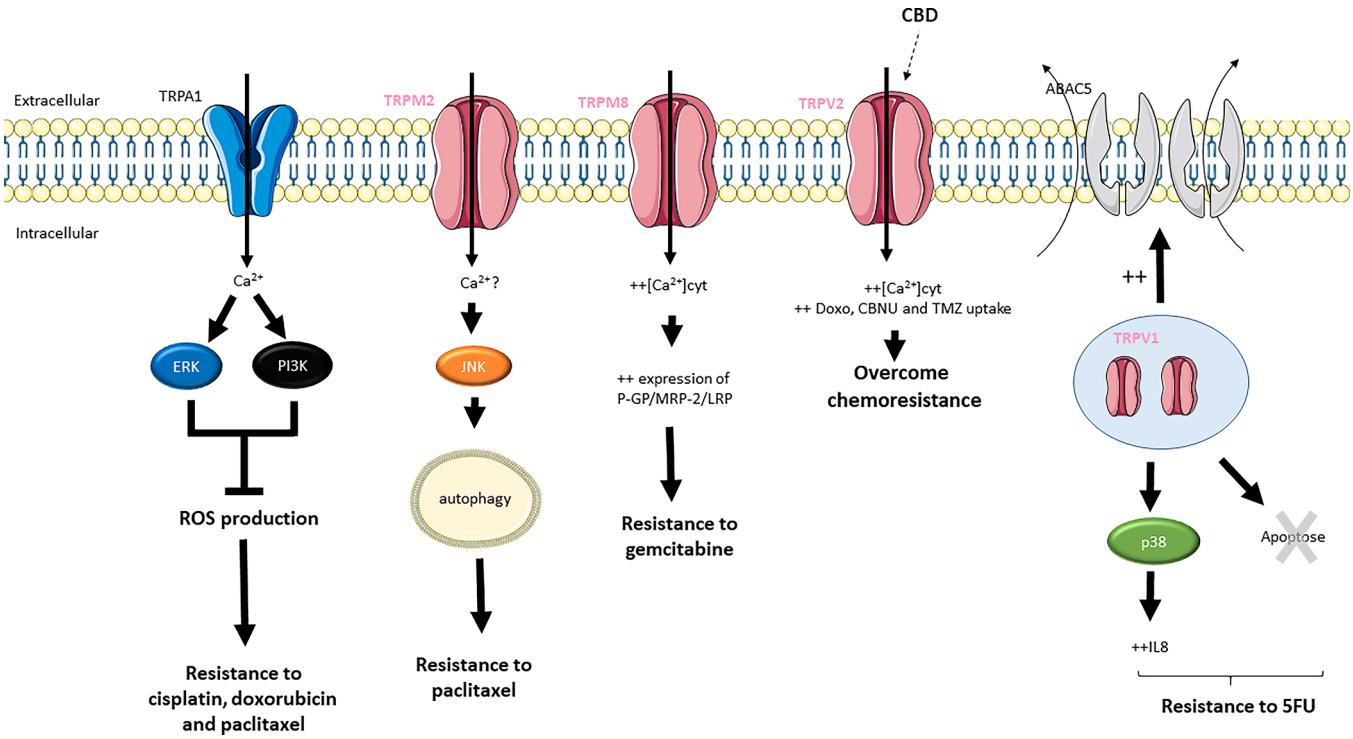


Fig. 4. Involvement of other Transient Receptor Protein (TRP) families in chemoresistance TRPA1 inhibits cisplatin, doxorubicin or paclitaxel-induced ROS production and cell death by activating phosphoinositide-3-kinase (PI3K) and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent pathways. TRPM2 controls autophagy in a JNK-dependent pathway, leading to resistance to paclitaxel and/or doxorubicin. In gemcitabine resistant pancreatic cells, TRPM8 expression and activity regulates multidrug-resistant associated proteins (P-GP, MRP-2, LRP). TRPV1 involvement in chemotherapy is unclear. Activation of TRPV1 in breast cancer leads to apoptosis, but its activity and expression participate in 5-FU resistance in resistant non-small-cell lung cancer cells. TRPV1 overexpression increases drug transporter ABCA5 expression, leading to apoptosis inhibition and activation the p38 MAPK pathway. It also increases interleukin-8 (IL-8) secretion to promote resistance to 5-Fluorouracil.

mitochondrial function and controls bioenergy production, promoting resistance to paclitaxel and/or doxorubicin treatment [73]. In 2018, Liu and collaborators showed that the expression and activity of multidrug resistance-associated proteins, P-GP, MRP-2 and LRP correlated with TRPM8 expression in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cell lines [74].

Patients with glioblastoma multiforme (GBM) have a high resistance to temozolomide, carmustine and doxorubicin. Cannabidiol (CBD) enhances TRPV2 expression and activation. This leads to increased chemosensitivity of human GBM cells to the cytotoxic effects of the chemotherapeutic agents. It appears that TRPV2 activation by CBD increases doxorubicin uptake into glioma cells [75]. In the same vein, it has been shown that the activation of TRPV1 in MCF-7 breast cancer cells increases apoptosis and oxidant effects of cisplatin [76–78]. Nevertheless, the involvement of TRPV1 in chemotherapy is variable with some studies suggesting that while TRPV1 expression is upregulated in 5-FU-resistant non-small-cell lung cancer, the chemoresistance of these cells is independent of TRPV1 channel function. Others suggested that TRPV1 overexpression induces 5-FU resistance by upregulation of the drug transporter ABCA5, enhancing DNA repair efficiency and leading to inhibition of apoptosis. In this case, TRPV1 overexpression seems to activate the p38 MAPK signaling pathway and increase IL-8 secretion to promote cell survival [79].

2.4. Transporters and exchangers

The plasma membrane Ca^{2+} pumps and exchangers are ion transporters that enable Ca^{2+} transport out of the cell to maintain Ca^{2+} concentrations in the cytosol. Chronic elevation of Ca^{2+}concentration leads to mitochondrial Ca^{2+}, overload and cell death. In this regard, the inhibition of plasma membrane Ca^{2+} pumps and exchangers seems to be relevant in treatments that sensitize cancer cells to apoptosis.

Two groups have described a link between Ca^{2+} pumps and exchangers and resistance to cisplatin in ovarian cancer. PMCA2/3/4 pumps are downregulated in ovarian cancer cisplatin-resistant cells MDAH/DDP compared to MDAH-sensitive cells, while PMCA1 and NCX3 are increased in platinum-resistant lineage [21]. NCX3 NCKX4, NCKX5 and NCKX6 exchangers are overexpressed in A2780 cisplatin-resistant cells, while NCX1 and NCX2 are downregulated. Administration of a Na^{+}/Ca^{2+} exchanger inhibitor, KB-R7943, reduces NCX/NCKX activity and sensitizes resistant cells to cisplatin [24].

3. Intracellular calcium fluxes

3.1. Endoplasmic reticulum

The endoplasmic reticulum is the main source of intracellular Ca^{2+} and seems to be a critical anticancer drug target because sustained massive ER Ca^{2+} release is often associated with mitochondrial-dependent cell death [80].

Interestingly, several studies have demonstrated that cisplatin-induced-Ca^{2+} release from ER is altered in chemoresistant cells (Fig. 5). The cytosolic Ca^{2+} increase observed after cisplatin treatment is reduced in cisplatin-resistant MFC-7 compared to drug-sensitive cells [81]. This work is supported by other studies in which cisplatin treatment induces ER stress in SKOV3, but not in cisplatin-resistant SKOV3/DDP (cis--diamminedichloroplatinum (II)). This leads to cytosolic Ca^{2+}increase, mitochondrial Ca^{2+} overload and apoptosis of cisplatin-sensitive cells, but not in resistant cells [82]. Cisplatin-induced apoptosis in sensitive and resistant ovarian cancer cells (A2780s/A2780cp and OV2008/C13*) is regulated by P73 and the expression level of calpain, a Ca^{2+}-dependent protease. Cisplatin treatment increases cytosolic Ca^{2+}

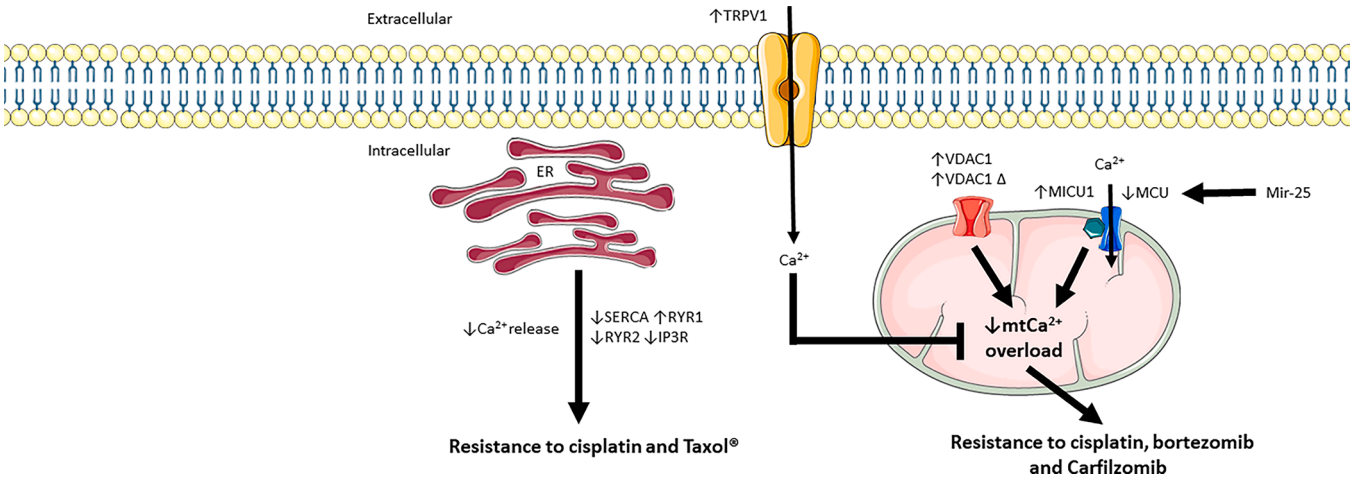


Fig. 5. Endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria control cell death and chemoresistance In resistant cells, Ca^{2+}release from the ER decreases and correlates to alteration of ryanodine receptor (RYR), Inositol-3-phosphate receptor (IP_3R) and Sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+}ATPase (SERCA) protein expression. TRPV1 overexpression promotes chemoresistance to bortezomib and carfilzomib, reducing mitochondrial Ca^{2+}uptake. Overexpression of the mitochondrial Ca^{2+}uptake 1 (MICU1), the voltage dependent anion channel 1 (VDAC1) and VDAC1-Δ correlates with chemoresistance. Mir-25 downregulates the mitochondrial Ca^{2+}uniporter (MCU) expression and inhibits mitochondrial Ca^{2+}overload.

concentration in sensitive cells but it does not affect the cytosolic Ca^{2+} concentration of resistant cells. The cytosolic Ca^{2+} concentration increase in sensitive cells is possibly due to the mobilization of intracellular Ca^{2+} stores, because it is not affected by extracellular Ca^{2+} removal [83].

Pharmacological inhibition of BCL-2/BCL-XL (ABT737) or their silencing by siRNA sensitizes cisplatin resistant SKOV3/DDP, COC1/DDP and A2780/DDP cell lines to cisplatin through ER Ca^{2+} release, cytosolic Ca^{2+} increase and a mitochondrial Ca^{2+} increase. This phenomenon is reduced in the presence of a non specific inhibitor, 2-APB, and these data were interpreted to mean that ER Ca^{2+} release through IP_3R mediates cisplatin sensitivity. However, the extracellular Ca^{2+} concentration used during experiments is not indicated in this article and 2-APB is known as a TRP and Orai channels inhibitor [84]. While the role of IP_3R in cisplatin sensitivity is uncertain, a significant decrease in IP_3R mRNA was observed in MDAH/DDP ovarian cancer cells compared to cisplatin-sensitive cells, supporting the idea of defective Ca^{2+} release in resistant cells. Similarly, a very strong decrease in RYR2 expression is measured in these cells, while the expression of RYR1 is increased. The expression of SERCA1/2/3 pumps is also reduced in cisplatin-resistant cells [21]. In multidrug-resistant acute myeloid leukemia, SERCA inhibitor CXL017 demonstrates selective toxicity to its HL60/MX2-resistant counterpart without effect on HL60 cells, suggesting SERCA activity has a role in chemoresistant cell survival [85].

All the previous studies were performed on cisplatin-resistant cells, but it seems that the mechanism is conserved in Taxol®-resistant cells. In the A549 lung cancer cell line and its Taxol®-resistant counterpart, ER Ca^{2+} release is decreased in resistant cells. It reflects a lower ER Ca^{2+} load, which correlates to Bcl-2 overexpression in resistant cells. In addition, IP_3R and RYR responses are lower in Taxol®-resistant cells during stimulation by CMC (4-chloro-m-cresol) or ATP [86].

Taken together, these data suggest that chemoresistance manifests as a result of alterations in ER Ca^{2+} release driven by dysregulation of ER Ca^{2+} release channels and resistance to ER stress.

3.2. Mitochondria

Mitochondria do not only function to produce ATP but are *bona fide* signaling organelles that are also critical for cellular Ca^{2+} homeostasis. Mitochondrial Ca^{2+}plays an important role in the control of cell death [87]. Several studies have described the role of mitochondrial Ca^{2+} channels in the regulation of cancer cell survival and chemosensitivity [11,37,88,89], but there are no available data on the role of those channels in chemoresistance cells.

The Ca^{2+} derived from the extracellular medium or released by the intracellular stores passes across the outer mitochondrial membrane (OMM) through the voltage-dependent anion channel (VDAC) and reaches the internal matrix *via* the MCU complex, located at the inner mitochondrial membrane (IMM).

VDAC1 is overexpressed in various cancer cell types but his role is ambivalent [90]. VDAC1 silencing by siRNA has been shown to prevent cisplatin-induced apoptosis and Bax activation in non-small-cell lung cancer cells [91]. VDAC1 has also been described as an anchor protein for the anti-apoptotic proteins BCL-2 and BCL-XL. Fixation of BCL-2 on VDAC1 is able to decrease the conductance of the VDAC1 channel and protect against apoptosis [92]. The key role of VDAC1 in apoptosis versus survival is demonstrated by findings that VDAC1 expression is linked to chemoresistance in patients. In fact, a truncated channel-forming active VDAC1-ΔC was detected in tumor tissues of patients with advanced chemotherapy-resistant lung adenocarcinoma [93–95]. Under hypoxic conditions, activation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) induces expression of VDAC1-ΔC, which confers selective protection against apoptosis and allows maintenance of ATP production and cell survival. In another study, transcript analysis of dexamethasone-resistant acute lymphoblastic leukemia patients showed significantly lower expression of VDAC1 compared to control samples [96]. All these studies demonstrate an important role of VDAC1 and VDAC1-ΔC in cancer pathophysiology and treatment resistance (Fig. 5).

The MCU channel complex is composed of pore-forming proteins (MCU, MCUb) and regulatory components (EMRE, MICU1/2/3). Mitochondrial Ca^{2+} overload due to MCU permeability causes mPTP opening and the release of cytochrome C and factors that initiate apoptosis. Regarding the involvement of MCU complex in chemoresistance, there is evidence that in human colon cancer, microRNA-25 decreases mitochondrial Ca^{2+} uptake by MCU downregulation, causing resistance to apoptosis and promoting cancer cell proliferation and resistance to proapoptotic stimuli, as re-expression of MCU channel sensitizes cancer cells to treatment [37,97]. In breast cancer, overexpression of MCU and the decrease of MICU1 expression are correlated with poor patients survival [98]. MCU expression is correlated with breast tumor size, lymph node infiltration, metastasis and invasiveness potential [36]. In an MDA-MB-231 xenograft model, MCU knockout induces a reduction in tumor size and metastasis [38]. In ovarian cancer, high levels of MICU1

contribute to chemoresistance by inhibiting the mitochondrial Ca^{2+} response to cisplatin. Inhibition of MICU1 reduces tumor growth by reinstatement of chemosensitivity and apoptosis induction [88].

NCLX is the major extrusion mediator of mitochondrial matrix Ca^{2+}, and is essential for Ca^{2+} homeostasis and viability [99]. Recently, Pathak et al. (2020) showed that the loss of NCLX in colorectal cancer cells inhibits mitochondrial Ca^{2+} extrusion, enhances caspase 3 activation and increases the chemoresistance to 5FU [11].

One study showed that TRPV1 blockade by AMG9810, in combination with bortezomib (an anti-cancer drug inhibiting the proteasome), sensitizes bortezomib-resistant-cells by increasing ROS production, ER stress and mitochondrial Ca^{2+} overload. However, the description of the localization of TRPV1 in the study of Beider et *al.* is unclear. Mitochondrial Ca^{2+} measurements were performed, but there is no data available regarding in consequences of AMG9810 on cytosolic Ca^{2+} [100] (Fig. 5).

4. Calcium signaling as a therapeutic target

Overall, since available data implicates Ca^{2+}signaling in chemoresistance (Table 1), it could be worthwhile to test pharmacological tools targeting Ca^{2+}signaling mediators as chemotherapeutic agents.

As VGCC participate in chemoresistance, their blockers could be relevant as new anticancer drugs. Mibefradil, a T- and L-type Ca^{2+} channel blocker, was approved as an antihypertensive drug by the US Food and Drug Administration (FDA) in 1997. However, it inhibited cytochromes P450, CYP3A4 and 2D6 leading to an increase of drug concentration in the liver and in blood associated to toxicities for

Table 1
Main evidences of calcium fluxes involvement in chemoresistance.

Drug resistance family	Channel involved	Cancer type	Patient samples, animals and cell lines	Description	Reference
signal transduction inhibitors	$Ca_v3.2$	Melanoma	$BRAF^{V600E}$-mutant Vemurafenib-S and Vemurafenib-R human melanoma	Inhibition of VGCC = apoptosis induction, impairs migration and invasion	[50]
(verumafenib, bortezomib	TRPV1	Myeloma	Patient samples RPMI8226, U266, NCI-H929, OPM-1 and OPM-2	TRPV1 inhibition increases mitochondrial Ca^{2+}levels, mitochondrial membrane depolarization and ROS accumulation	[100]
alkylating agents (cisplatin)	T-Type Ca^{2+}channels	Glioblastoma cells	U251, U87 and T98G	T-Type Ca^{2+}channels confers viability and resistance to chemotherapy	[49]
	Orai1	Ovarian cancer	A2780 and A2780cis	+++ SOCE mediating chemoresistance to cisplatin	[55]
	Orai1 TRPC1	Ovarian cancer	IGROV1, IGROV1CP and IGROV1SRT	+++ SOCE = +++ cell migration and chemoresistance to cisplatin	[56]
	STIM1	Osteo-sarcoma	MG63 and patient samples	inhibits ER stress induced by cisplatin and leads to chemoresistance	[58]
	NCX3, NCKX4, NCKX5, and NCKX6	Ovarian cancer	A2780	overexpression and activity increase cisplatin-induced cell death resistance	[24]
	TRPA1	Breast and lung cancer	H1792, H647, A549, H23, H358, and sNF96.2, MCF-10A, HCC1569, HCC38, HCC202, HCC70, HCC1500, MDAMB-175, T47D, and BT-549	Overexpression inhibits chemotherapy-induced ROS production and cell death	[71]
	KCa3.2	Colorectal cancer	HCT-116, HCT-29, HCT-8 and H630	Cisplatin uptake into resistant cells depends on KCa3.2 channel activity	[114]
	BKca or KCa1.1	Ovarian cancer	A2780, MCP1, CP70, OVCAR5	miR-31 represses BKca or KCa1.1 expression, which lead to chemoresistance	[113]
	STIM1	Pancreatic ductal adenocarcinoma	CFPAC-1, L3.6pl, Panc1, BxPC-3, HCT116, DLD-1, SJSA, MG63, HEK293T	overexpression is responsible for ER stress tolerance, activation of NFAT and epigenetic alteration, but is not responsible for 5-FU chemoresistance	[61]
	Orai1 STIM1	Pancreatic adenocarcinoma	Panc1, ASPC1, BxPC3, MiaPaca2, Capan1, H6C7	Chemotherapy increases Orai1/STIM1 expression, which controls anti-apoptotic pathways	[60]
	Orai1 STIM1	Hepatocellular carcinoma	HepG2	Overexpression inhibits 5-FU induced autophagy and cell death	[61]
Antimetabolites (5-FU, Gemcitabine)	TRPC5	Colorectal cancer	HCT-8, LoVo	Promotes nuclear β-catenin accumulation and ABCB1 expression in resistance to 5-FU	[70]
	TRPC5	Colorectal cancer	HCT-8, LoVo, patient samples	Regulates glycolysis and chemoresistance to 5-FU	[69]
	TRPC5	Breast and colorectal cancer	MCF-7, HCT-8	Mir-320a is downregulated in resistant cells, and is responsible for TRPC5 and NFATc3 overexpression, which promotes chemoresistance	[68]
	TRPC5	Breast cancer	Patient samples, mice, MCF-7, T47D and MDA-MB 231	Induces autophagy in a CaMKKβ/AMPKα/mTOR pathway, leading to chemoresistance	[66]
	TRPC5	Breast cancer	MCF-7	Overexpression upregulates P-GP expression and resistance to adriamycin	[67]
	TRPM8	Pancreatic cancer	Primary tissues, PDE, SW1990, PANC-1, CAPAN-1 and BXPC3	TRPM8 activity controls multidrug resistance-associated protein expression	[74]
	TRPV1	Non-small-cell lung cancer	HEK293T and A549	TRPV1 activity increases ABCA5 drug transporters and contributes to resistance to 5-FU.	[79]
Anthracyclines (adryamycin, doxorubicin)	TRPM2	Gastric cancer cells	AGS and MKN45	TRPM2 regulates autophagy in a JNK-dependent pathway and leads to paclitaxel/doxorubicin resistance.	[73]
	TRPC6	Hepatocellular carcinoma	Huh7 and HepG2, nude mice	TRPC6 activates a STAT3 pathway to confer resistance to doxorubicin	[65]
immunotherapy	$Ca_v1.2$	Diffuse large B-cell lymphoma	Patients and OCI-ly7, OCI-ly8, and OCI-ly3 DLBCL cell lines	Mir-363 decreases $Ca_v1.2$ expression and confers resistance to rituximab	[45]

patients. Therefore, Mibefradil was withdrawn [101]. The second example of VGCC blocker is Nifedipine which has been used in the clinic for a long time to treat hypertension and angina. Despite the potential role of VGCC in cancer, long-term treatment with Nifedipine does not seem to alter the risk of developing breast cancer. [102–104]. Verapamil, another L-type Ca^{2+} channel blocker, has shown interesting results as an anticancer drug. It increases patient survival in anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma and in advanced non-small lung cancer when co-administrated with vindesine and ifosfamide [105,106]. However, a phase III clinical trial showed that Verapamil combined with standard chemotherapy (vincristine, doxorubicin and dexamethasone) did not improve survival in multiple myeloma [107].

In the last two decades, SOCE has emerged as a clinically relevant and highly reproducible biomarker of cancer prognosis and response to treatment. Unfortunately, all currently available inhibitors directed against SOCE lack selectivity. In 2018, only four SOCE inhibitors had been tested in phase I of clinical trials (CM2489 for psoriasis, CM4620 for pancreatitis, RP3128 for asthma, and RP4010 for non-Hodgkin lymphomas). Of those four drugs, only CM4620 is currently in phase II. Carboxyamidotriazole (CAI), a synthetic indirect inhibitor of SOCE, has undergone clinical validation for use in association with chemotherapy/radiotherapy in a number of different cancers (clinical trial numbers: NCT00006486, NCT00005045, NCT00003869, NCT00019461, NCT00019019, NCT00004146, NCT03401190, NCT02958982, NCT03119467) [108,109].

As it has been described previously, TRPC5 seems to be involved in chemoresistant cancer. Interestingly, GFB-887, a TRPC5 inhibitor, has been tested recently in clinical trials on healthy patients or on patients with fibromyalgia syndrome (Clinical trials numbers : NCT03970122, NCT03015662). Two new trials are currently in recruitment, and are focused on the role of GFB-887 in glomerular diseases, but not on cancer (clinical trial numbers: NCT04387448, NCT04950114). It could be interesting to test GFB-887 in combination with chemotherapies-resistant cancer cells expressing TRPC5 (see the transient receptor potential channels section) to study its efficacy as an anticancer drug.

Although the therapeutic potential of Ca^{2+} channels in the fight against cancer should be pursued, it should be noted that these channels are expressed in many tissues, and that non-specific effects are a common point described in all the studies quoted previously. In fact, the toxicity of Ca^{2+} channels blockers on normal cells shall be considered. Further work is clearly needed to improve the selectivity of these inhibitors. Developing inhibitors that exclusively target tumor cells could radically change the thinking about pharmacological cancer treatment. While Ca^{2+}channel inhibitors are unlikely to be used as first-line chemotherapy, combining conventional chemotherapy with Ca^{2+}channel blockers could re-sensitize resistant cancer cells to the chemotherapeutic drug. In this context, it would be necessary to determine whether complete block of Ca^{2+}flux is required, or whether a partial inhibition is sufficient to achieve anticancer effects.

5. Ca^{2+}activated K^+ channels in chemoresistance

Ca^{2+} fluxes across the plasma membrane are modulated by the membrane potential. Ca^{2+} activated potassium channels (KCa) can potentiate Ca^{2+} fluxes by promoting plasma membrane hyperpolarization. KCa are grouped in three sub-families—small conductance (SK), intermediate conductance (IK) and big conductance (BK) [110]. Several studies have described a role of KCa in the regulation of Ca^{2+}fluxes and their contribution to cancer cell aggressiveness [16,20,111,112].

In chemoresistant sublines, there is little information on the role of those channels in drug resistance (Fig. 6). The majority of available data seem to indicate that KCa inhibition or downregulation participates in chemoresistance. In ovarian cancer patients' tissues, the decrease of KCNN3 (KCA2.3–3) mRNA and protein expression correlates with lower patient survival and increases drug resistance [113]. Mir-31 increased-expression correlates to KCNMA1 (Ca^{2+} activated K^+ channel large conductance subfamily M alpha, member 1) downregulation. In MCP1

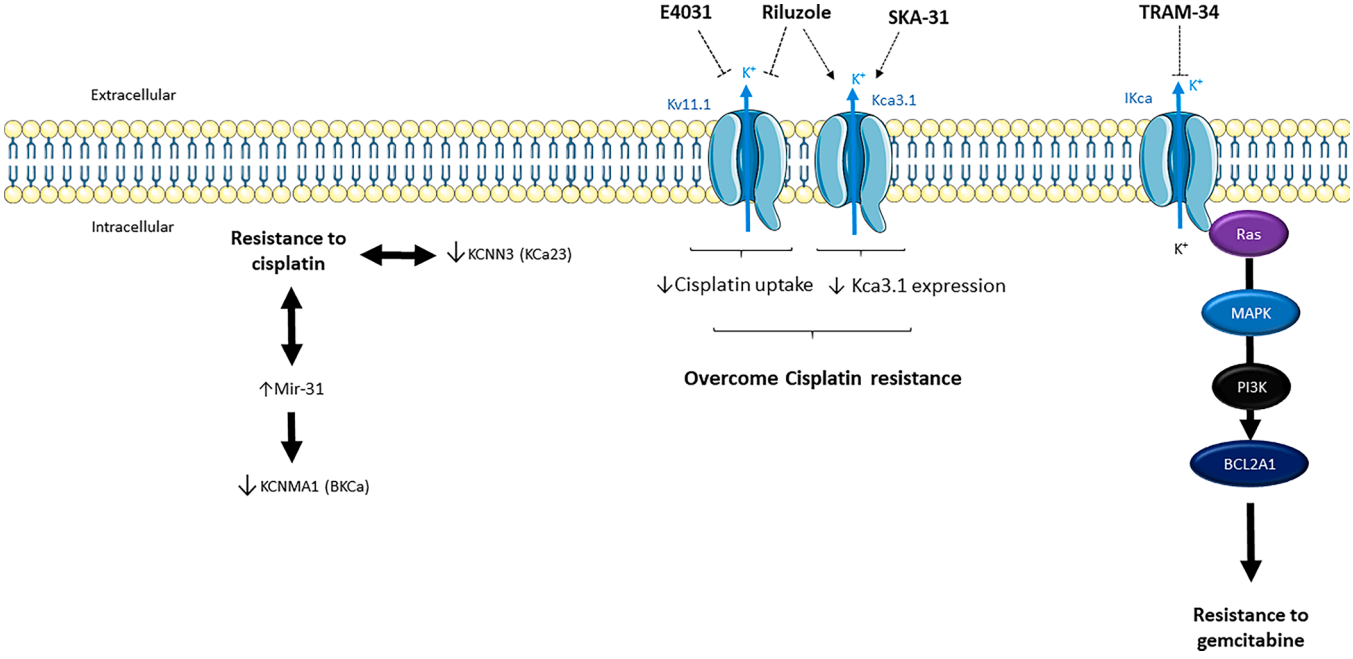


Fig. 6. Ca^{2+}Activated K^+ channels (KCa) participate in both chemoresistance and cell death KCa inhibition or downregulation leads to chemoresistance. Those mechanisms act in a transcriptional manner. First, Mir-31 overexpression is responsible for KCNNMA1 downregulation in chemoresistant cells. Inhibition of Big conductance KCa channels or KCNMA1 knockdown induces resistance to cisplatin-sensitive cells. Second, KCa3.1 participates in cisplatin uptake and cell death. In chemoresistant cells, voltage dependent K^+channels (K_v11.1) regulates KCa3.1 expression. K_v11.1 inhibition by E4031 increases KCa3.2 expression and leads to cisplatin uptake and cell death. In this regard, activation of KCa by riluzole or SKA-31 sensitizes cells to cisplatin. One study however has described KCa as an activator of chemoresistance. Intermediate conductance KCa (IKCa) proteins mediate a Ras/MAPK/PI3K/Bcl-2 pathway that promotes chemoresistance to gemcitabine. Inhibition of IKCa by TRAM-34 induces cell death.

and CP70 ovarian cancer cisplatin resistant sublines, Mir-31 is overexpressed and KCNMA1 is downregulated. Inhibition of BK channels or KCNMA1 knockdown in cisplatin-sensitive A2780 cells induces chemoresistance [114]. Modification of KCa expression may facilitate absorption of cisplatin into colon cancer HCT-116 and HCT-8 cells. Cisplatin-resistant colon cancer cells overexpress KCa3.1 and K_v11.1. Activation of KCa3.1 by SKA-31 and inhibition of K_v11.1 by E4031 synergistically provides cisplatin induced-apoptosis and inhibition of cell proliferation. Blocking K_v11.1 activity decreases KCa3.2 expression, leading to cisplatin-dependent cell death. This suggest that K_v11.1 induces chemoresistance while KCa3.1 activity promotes cell death. Similar results have been obtained with riluzole treatment, known to be a KCa3.1 activator and a K_v11.1 inhibitor [115].

To our knowledge, only one article identifies KCa activity as an activator of chemoresistance. In gemcitabine-resistant breast cancer cells, IKCa is responsible for BCL-2-linked-protein (BCL2A1) overexpression, which suppresses apoptosis in Ras-MAPK- and PI3K/AKT-dependent pathways. Inhibiting IKCa by TRAM-34 reduces chemoresistance and tumor size, as well as MAPK and PI3K pathway activity [116].

6. Ca^{2+}activated K^+ channel activators and inhibitors

Due to the relationship between Ca^{2+} channels and KCa in cancer cells, developing new inhibitors of KCa could be an effective way to trigger cancer cell death. Our laboratory has described the role of the SK3-Orai1 complex in cancer cell migration [16,20] and we have shown that alteration of that complex reduces metastasis in mice. To our knowledge, this interaction has never been studied in chemoresistant models.

Several KCa activators are available on the market. However, none have been evaluated as anticancer treatments in clinical trials. The first KCa channel activator approved by the FDA is chlorzoxazone. SKCa channel activator chlorzoxazone is used for episodic ataxia and spasticity [117,118]. Riluzole, another SKCa activator, reduces arthritic pain, improves ataxia symptoms and is approved as a treatment for amyotrophic lateral sclerosis [119–121]. Interestingly, Blyufer and collaborators have reviewed its role as an anticancer drug. Several studies have shown the synergistic effect of riluzole with other drugs (paclitaxel, cisplatin, sorafenib) in cancer cell lines that decrease cell proliferation and viability [122]. BMS204352, also known as maxipost, is a BK and K_v7 activator tested in phase III of a clinical trial for acute ischemic stroke (NCT03887325). However, it has never been tested in cancer studies.

Only one KCa inhibitor has been tested in clinical trials. Senicapoc is an IK inhibitor that has been tested for Alzheimer's disease (NCT04804241) and dehydrated stomatocytosis (NCT04372498). While it was tested in phase I and II clinical trials (NCT00861211 ; NCT00861185) for the treatment of asthma, there is no information available on its potential anticancer properties.

Targeting KCa as an anticancer drug could be relevant because of the participation of KCa in membrane Ca^{2+} flux regulation. Pharmacological tools targeting KCa could prevent side effects usually observed with Ca^{2+} channel blockers. Moreover, the drugs studied in clinical trials appear to be well tolerated by patients. However, there is insufficient data on when KCa inhibitors or activators could be used, because the mechanisms surrounding these channels in chemoresistance are not well understood.

7. Conclusion

During last decade, several studies have indicated that many Ca^{2+} channels are highly expressed in human cancer cells and tissues, where they regulate a number of cellular processes, including proliferation, migration, invasion and apoptosis resistance. A correlation between the expression levels of these channels and resistance to cytotoxic drugs has also been reported in some cases, supporting their putative role as predictive markers for chemotherapy treatment. Here, we summarized the instances where dysregulation of Ca^{2+} signaling contributes to chemoresistance in cancers. It should be noted that every cancer type or model of cancer cell resistance develops its own Ca^{2+} signaling signature. It is likely that in each case the resistance profile of a specific cancer type is dependent on the type of drug used and its mechanism of action, as well as to the different types of tumor cells. Most studies have reported the involvement of one Ca^{2+} channel or another in chemoresistance, but there is now evidence that several Ca^{2+} channels may work in combination with other channels to promote malignant behaviors [110]. For instance, simultaneous activation of KCa3.1 and inhibition of K_v11.1 with riluzole has been shown to synergistically increase apoptosis and overcome cisplatin resistance [115]. Thus, the identification of new onco-complexes of channels involved in chemoresistance might allow for the establishment of new, promising therapeutic approaches mixing pharmacological modulators of calcium channels with established chemotherapies.

Clearly, additional studies are necessary to thoroughly characterize the molecular network of Ca^{2+} channels in resistance to drug treatment in different cancers. Among drugs capable of interacting with Ca^{2+} channels, few molecules display real specificity while for most drugs toxicity profiles of these drugs are not yet available, except for molecules used in cardiovascular medicine. As we gain further knowledge of the various Ca^{2+} signaling networks involved in chemoresistance and progression of different types of cancers, combination therapies utilizing Ca^{2+} channels and transporters as targets might prove impactful in combating chemoresistance to established cancer therapies.

Authors contributions

M. Potier-Cartereau conceived the idea for this review article, O Romito performed the literature search, data analysis, and drafted the review. O Champion, W. Raoul, M. Gueguinou, A. Robert, M Trebak, C Goupille and M Potier-Cartereau critically revised the manuscript.

Authors' notes

Olivier Romito is a recipient of a 3-year doctoral grant from Tours University. Maxime Guéguinou is a recipient of a 3-year postdoctoral grant from Région center—Val-de Loire (Opticoregumine project). Alison Robert is a recipient of a 3-year doctoral grant from Inserm/Région center—Val-de Loire. Inserm UMR 1069 is leader of Cancéropôle Grand-Ouest 3MC and Castor networks, member of Région center—Val-de Loire thematic research consortium RTR MOTIVHEALTH (Molecular and Technological Innovation for Health) and member of CNRS research group APPICOM (Integrative Approach for a multiscale functional analysis of membrane proteins).

Declaration of Competing Interest

Mohamed Trebak is a paid consultant of Seeker Biologics Inc. The other authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

This study was supported by grants from INSERM, University of Tours, the "Région center-Val de Loire", the "Cancéropôle Grand Ouest", the Association "CANCEN",Tours' Hospital oncology association ACORT" and the committees of Ligue Contre le Cancer Grand-Ouest (comities 85, 37, 49, 72, 17).

References

[1] G. Makin, C. Dive, Apoptosis and cancer chemotherapy, Trends Cell Biol. 11 (2001) S22–S26, https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02124-9.

[2] H.-C. Zheng, The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers, Oncotarget 8 (2017) 59950–59964, https://doi.org/10.18632/oncotarget.19048.

[3] M.J. Berridge, P. Lipp, M.D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1 (2000) 11–21, https://doi.org/10.1038/35036035.

[4] D.E. Clapham, Calcium signaling, Cell 131 (2007) 1047–1058, https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028.

[5] S.M. Emrich, R.E. Yoast, M. Trebak, Physiological Functions of CRAC Channels, Annu. Rev. Physiol. 84 (2022) 355–379, https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-052521-013426.

[6] Y.-H. Wang, A.Y. Tao, M. Vaeth, S. Feske, Calcium regulation of T cell metabolism, Curr. Opin. Physiol. 17 (2020) 207–223, https://doi.org/10.1016/j.cophys.2020.07.016.

[7] W.A. Catterall, Voltage-gated calcium channels, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 (2011), a003947, https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947 a003947.

[8] M. Prakriya, S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, P.G. Hogan, Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel, Nature 443 (2006) 230–233, https://doi.org/10.1038/nature05122.

[9] K. Venkatachalam, C. Montell, T.R.P. Channels, Annu. Rev. Biochem. 76 (2007) 387–417, https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819.

[10] J.T. Penniston, A. Enyedi, A.K. Verma, H.P. Adamo, A.G. Filoteo, Plasma Membrane Ca $^{2+}$ Pumps [a], Ann. N. Y. Acad. Sci. 834 (1997) 56–64, https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb52225.x.

[11] T. Pathak, M. Gueguinou, V. Walter, C. Delierneux, M.T. Johnson, X. Zhang, P. Xin, R.E. Yoast, S.M. Emrich, G.S. Yochum, I. Sekler, W.A. Koltun, D.L. Gill, N. Hempel, M. Trebak, Dichotomous role of the human mitochondrial Na+/Ca2+/Li+ exchanger NCLX in colorectal cancer growth and metastasis, Elife 9 (2020) e59686, https://doi.org/10.7554/eLife.59686.

[12] S. Marchi, S. Patergnani, S. Missiroli, G. Morciano, A. Rimessi, M.R. Wieckowski, C. Giorgi, P. Pinton, Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death, Cell Calcium 69 (2018) 62–72, https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.05.003.

[13] R. Bravo-Sagua, V. Parra, C. López-Crisosto, P. Díaz, A.F.G. Quest, S. Lavandero, Calcium transport and signaling in mitochondria, in: R. Terjung (Ed.), Compr. Physiol, 1st ed., Wiley, 2017, pp. 623–634, https://doi.org/10.1002/cphy.c160013.

[14] S. Panda, O. Chatterjee, L. Roy, S. Chatterjee, Targeting Ca2+ signaling: a new arsenal against cancer, Drug Discov. Today. 27 (2022) 923–934, https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.11.012.

[15] S.B. Chalmers, G.R. Monteith, ORAI channels and cancer, Cell Calcium 74 (2018) 160–167, https://doi.org/10.1016/j.ceca.2018.07.011.

[16] A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, L. Clarysse, G. Fromont, S. Marionneau-Lambot, M. Guéguinou, J.-C. Pagès, C. Collin, T. Oullier, A. Girault, F. Arbion, J.-P. Haelters, P.-A. Jaffrès, M. Pinault, P. Besson, V. Joulin, P. Bougnoux, C. Vandier, Pivotal Role of the Lipid Raft SK3–Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases, Cancer Res 73 (2013) 4852–4861, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4572.

[17] D.L. Choi, S.J. Jang, S. Cho, H.-E. Choi, H.-K. Rim, K.-T. Lee, J.Y. Lee, Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells by T-type calcium channel antagonist, Bioorg. Med. Chem. Lett. 24 (2014) 1565–1570, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.01.071.

[18] C. Cui, R. Merritt, L. Fu, Z. Pan, Targeting calcium signaling in cancer therapy, Acta Pharm. Sin. B. 7 (2017) 3–17, https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.11.001.

[19] M. Flourakis, V. Lehen'kyi, B. Beck, M. Raphaël, M. Vandenberghe, F.V. Abeele, M. Roudbaraki, G. Lepage, B. Mauroy, C. Romanin, Y. Shuba, R. Skryma, N. Prevarskaya, Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells, Cell Death Dis. 1 (2010) e75, https://doi.org/10.1038/cddis.2010.52, e75.

[20] M. Guéguinou, T. Harnois, D. Crottes, A. Uguen, N. Deliot, A. Gambade, A. Chantôme, J.P. Haelters, P.A. Jaffrès, M.L. Jourdan, G. Weber, O. Soriani, P. Bougnoux, O. Mignen, N. Bourmeyster, B. Constantin, T. Lecomte, C. Vandier, M. Potier-Cartereau, SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: a novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmline, Oncotarget 7 (2016) 36168–36184, https://doi.org/10.18632/oncotarget.8786.

[21] B. Kucukkaya, H. Basoglu, D. Erdag, F. Akbas, S. Susgun, L. Yalcintepe, Calcium homeostasis in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer, Gen. Physiol. Biophys. 38 (2019) 353–363, https://doi.org/10.4149/gpb_2019013.

[22] W.J. Lee, S.J. Roberts-Thomson, G.R. Monteith, Plasma membrane calcium-ATPase 2 and 4 in human breast cancer cell lines, Biochem. Biophys. Res. Commun. 337 (2005) 779–783, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.09.119.

[23] R.K. Motiani, I.F. Abdullaev, M. Trebak, A Novel Native Store-operated Calcium Channel Encoded by Orai3, J. Biol. Chem. 285 (2010) 19173–19183, https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102582.

[24] L. Pelzl, Z. Hosseinzadeh, K. Alzoubi, T. Al-Maghout, S. Schmidt, C. Stournaras, F. Lang, Impact of Na+/Ca2+ Exchangers on Therapy Resistance of Ovary Carcinoma Cells, Cell. Physiol. Biochem. 37 (2015) 1857–1868, https://doi.org/10.1159/000438547.

[25] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion Channels in Cancer: are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? Physiol. Rev. 98 (2018) 559–621, https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016.

[26] P. Ribiczey, A. Tordai, H. Andrikovics, A.G. Filoteo, J.T. Penniston, J. Enouf, Á. Enyedi, B. Papp, T. Kovács, Isoform-specific up-regulation of plasma membrane Ca2+ATPase expression during colon and gastric cancer cell differentiation, Cell Calcium 42 (2007) 590–605, https://doi.org/10.1016/j.ceca.2007.02.003.

[27] M. Doghman-Bouguerra, E. Lalli, ER-mitochondria interactions: both strength and weakness within cancer cells, Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1866 (2019) 650–662, https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.01.009.

[28] A. Bergner, J. Kellner, A. Tufman, R.M. Huber, Endoplasmic reticulum Ca2+-homeostasis is altered in small and non-small cell lung cancer cell lines, J. Exp. Clin. Cancer Res. 28 (2009) 25, https://doi.org/10.1186/1756-9966-28-25.

[29] J.-.P. Brouland, P. Gélébart, T. Kovàcs, J. Enouf, J. Grossmann, B. Papp, The Loss of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium Transport ATPase 3 Expression Is an Early Event during the Multistep Process of Colon Carcinogenesis, Am. J. Pathol. 167 (2005) 233–242, https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62968-9.

[30] S.S. Kang, K.-S. Han, B.M. Ku, Y.K. Lee, J. Hong, H.Y. Shin, A.G. Almonte, D. H. Woo, D.J. Brat, E.M. Hwang, S.H. Yoo, C.K. Chung, S.-H. Park, S.H. Paek, E. J. Roh, S. joong Lee, J.-Y. Park, S.F. Traynelis, C.J. Lee, Caffeine-mediated inhibition of calcium release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival, Cancer Res. 70 (2010) 1173–1183, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2886.

[31] W. Li, Z. Ouyang, Q. Zhang, L. Wang, Y. Shen, X. Wu, Y. Gu, Y. Shu, B. Yu, X. Wu, Y. Sun, Q. Xu, SBF-1 exerts strong anticervical cancer effect through inducing endoplasmic reticulum stress-associated cell death via targeting sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase 2, Cell Death Dis. 5 (2014) e1581, https://doi.org/10.1038/cddis.2014.538, e1581.

[32] F. Pacifico, L. Ulianich, S. De Micheli, S. Treglia, A. Leonardi, P. Vito, S. Formisano, E. Consiglio, B. Di Jeso, The expression of the sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPases in thyroid and its down-regulation following neoplastic transformation, J. Mol. Endocrinol. 30 (2003) 399–409, https://doi.org/10.1677/jme.0.0300399.

[33] B. Papp, J.-P. Brouland, Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis, Breast Cancer Basic Clin. Res. 5 (2011), https://doi.org/10.4137/BCBCR.S7481. BCBCR.S7481.

[34] C. Sakakura, A. Hagiwara, K. Fukuda, K. Shimomura, T. Takagi, S. Kin, Y. Nakase, J. Fujiyama, K. Mikoshiba, Y. Okazaki, H. Yamagishi, Possible involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3) in the peritoneal dissemination of gastric cancers, Anticancer Res. 23 (2003) 3691–3697.

[35] K. Shibao, M.J. Fiedler, J. Nagata, N. Minagawa, K. Hirata, Y. Nakayama, Y. Iwakiri, M.H. Nathanson, K. Yamaguchi, The type III inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is associated with aggressiveness of colorectal carcinoma, Cell Calcium 48 (2010) 315–323, https://doi.org/10.1016/j.ceca.2010.09.005.

[36] Y. Liu, M. Jin, Y. Wang, J. Zhu, R. Tan, J. Zhao, X. Ji, C. Jin, Y. Jia, T. Ren, J. Xing, MCU-induced mitochondrial calcium uptake promotes mitochondrial biogenesis and colorectal cancer growth, Signal Transduct. Target. Ther. 5 (2020) 59, https://doi.org/10.1038/s41392-020-0155-5.

[37] S. Marchi, L. Lupini, S. Patergnani, A. Rimessi, S. Missiroli, M. Bonora, A. Bononi, F. Corrà, C. Giorgi, E. De Marchi, F. Poletti, R. Gafà, G. Lanza, M. Negrini, R. Rizzuto, P. Pinton, Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25, Curr. Biol. 23 (2013) 58–63, https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.026.

[38] A. Tosatto, R. Sommaggio, C. Kummerow, R.B. Bentham, T.S. Blacker, T. Berecz, M.R. Duchen, A. Rosato, I. Bogeski, G. Szabadkai, R. Rizzuto, C. Mammucari, The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF -1α, EMBO Mol. Med. 8 (2016) 569–585, https://doi.org/10.15252/emmm.201606255.

[39] A. Vultur, C.S. Gibhardt, H. Stanisz, I. Bogeski, The role of the mitochondrial calcium uniporter (MCU) complex in cancer, Pflüg. Arch. - Eur, J. Physiol. 470 (2018) 1149–1163, https://doi.org/10.1007/s00424-018-2162-8.

[40] X. Wang, Y. Li, Z. Li, S. Lin, H. Wang, J. Sun, C. Lan, L. Wu, D. Sun, C. Huang, P. K. Singh, N. Hempel, M. Trebak, G.M. DeNicola, J. Hao, S. Yang, Mitochondrial calcium uniporter drives metastasis and confers a targetable cystine dependency in pancreatic cancer, Cancer Res. 82 (2022) 2254–2268, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-3230.

[41] A. Alharbi, Y. Zhang, J. Parrington, Deciphering the Role of Ca2+ Signalling in Cancer Metastasis: from the Bench to the Bedside, Cancers (Basel) 13 (2021) 179, https://doi.org/10.3390/cancers13020179.

[42] N.N. Phan, C.-Y. Wang, C.-F. Chen, Z. Sun, M.-D. Lai, Y.-C. Lin, Voltage-gated calcium channels: novel targets for cancer therapy, Oncol. Lett. 14 (2017) 2059–2074, https://doi.org/10.3892/ol.2017.6457.

[43] C.-Y. Wang, M.-D. Lai, N.N. Phan, Z. Sun, Y.-C. Lin, Meta-analysis of public microarray datasets reveals voltage-gated calcium gene signatures in clinical cancer patients, PLoS ONE 10 (2015), e0125766, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125766.

[44] J. Yu, S. Wang, W. Zhao, J. Duan, Z. Wang, H. Chen, Y. Tian, D. Wang, J. Zhao, T. An, H. Bai, M. Wu, J. Wang, Mechanistic exploration of cancer stem cell marker voltage-dependent calcium channel α2δ1 subunit-mediated chemotherapy resistance in small-cell lung cancer, Clin. Cancer Res. 24 (2018) 2148–2158, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1932.

[45] J.-Y. Zhang, P.-P. Zhang, W.-P. Zhou, J.-Y. Yu, Z.-H. Yao, J.-F. Chu, S.-N. Yao, C. Wang, W. Lone, Q.-X. Xia, J. Ma, S.-J. Yang, K.-D. Liu, Z.-G. Dong, Y.-J. Guo, L. M. Smith, T.W. McKeithan, W.C. Chan, J. Iqbal, Y.-Y. Liu, L-Type Cav 1.2 Calcium Channel-α-1C Regulates Response to Rituximab in Diffuse Large B-Cell Lymphoma, Clin. Cancer Res. 25 (2019) 4168–4178, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2146.

[46] S.J. Jang, H.W. Choi, D.L. Choi, S. Cho, H.-K. Rim, H.-E. Choi, K.-S. Kim, M. Huang, H. Rhim, K.-T. Lee, J.Y. Lee, In vitro cytotoxicity on human ovarian cancer cells by T-type calcium channel blockers, Bioorg. Med. Chem. Lett. 23 (2013) 6656–6662, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.10.049.

[47] R. Marques, C.G. Peres, C.V. Vaz, I.M. Gomes, M.I. Figueira, E. Cairrão, I. Verde, C.J. Maia, S. Socorro, 5α-Dihydrotestosterone regulates the expression of L-type calcium channels and calcium-binding protein regucalcin in human breast cancer cells with suppression of cell growth, Med. Oncol. 32 (2015) 228, https://doi.org/10.1007/s12032-015-0676-x.

[48] R.P. Mason, Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis: implications for carcinogenic potential, Cancer 85 (1999) 2093–2102, https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990515)85:10<2093::AID-CNCR1>3.0.CO;2-E.

[49] N.C.K. Valerie, B. Dziegielewska, A.S. Hosing, E. Augustin, L.S. Gray, D. L. Brautigan, J.M. Larner, J. Dziegielewski, Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells, Biochem. Pharmacol. 85 (2013) 888–897, https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.12.017.

[50] C. Barceló, P. Sisó, O. Maiques, S. García-Mulero, R. Sanz-Pamplona, R. Navaridas, C. Megino, I. Felip, I. Urdanibia, N. Eritja, X. Soria, J.M. Piulats, R. M. Penin, X. Dolcet, X. Matías-Guiu, R.M. Martí, A. Macià, T-Type Calcium Channels as Potential Therapeutic Targets in Vemurafenib-Resistant BRAFV600E Melanoma, J. Invest. Dermatol. 140 (2020) 1253–1265, https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.014.

[51] G.H. Mickisch, J. Kössig, G. Keilhauer, E. Schlick, R.K. Tschada, P.M. Alken, Effects of calcium antagonists in multidrug resistant primary human renal cell carcinomas, Cancer Res 50 (1990) 3670–3674.

[52] S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.-.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, A. Rao, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function, Nature 441 (2006) 179–185, https://doi.org/10.1038/nature04702.

[53] J.C. Mercer, W.I. DeHaven, J.T. Smyth, B. Wedel, R.R. Boyles, G.S. Bird, J. W. Putney, Large Store-operated Calcium Selective Currents Due to Co-expression of Orai1 or Orai2 with the Intracellular Calcium Sensor, Stim1, J. Biol. Chem. 281 (2006) 24979–24990, https://doi.org/10.1074/jbc.M604589200.

[54] S. Yang, J.J. Zhang, X.-Y. Huang, Orai1 and STIM1 Are Critical for Breast Tumor Cell Migration and Metastasis, Cancer Cell 15 (2009) 124–134, https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.12.019.

[55] S. Schmidt, G. Liu, G. Liu, W. Yang, S. Honisch, S. Pantelakos, C. Stournaras, A. Hönig, F. Lang, Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated Ca2+ entry in therapy resistant ovary carcinoma cells, Oncotarget 5 (2014) 4799–4810, https://doi.org/10.18632/oncotarget.2035.

[56] H.-K. Huang, Y.-H. Lin, H.-A. Chang, Y.-S. Lai, Y.-C. Chen, S.-C. Huang, C.-Y. Chou, W.-T. Chiu, Chemoresistant ovarian cancer enhances its migration abilities by increasing store-operated Ca2+ entry-mediated turnover of focal adhesions, J. Biomed. Sci. 27 (2020) 36, https://doi.org/10.1186/s12929-020-00630-5.

[57] J. Hasna, F. Hague, L. Rodat-Despoix, D. Geerts, C. Leroy, D. Tulasne, H. Ouadid-Ahidouch, P. Kischel, Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: the p53 connection, Cell Death Differ. 25 (2018) 693–707, https://doi.org/10.1038/s41418-017-0007-1.

[58] X. Sun, Q. Wei, J. Cheng, Y. Bian, C. Tian, Y. Hu, H. Li, Enhanced Stim1 expression is associated with acquired chemo-resistance of cisplatin in osteosarcoma cells, Hum. Cell. 30 (2017) 216–225, https://doi.org/10.1007/s13577-017-0167-9.

[59] A.P. Kutschat, F.H. Hamdan, X. Wang, A.Q. Wixom, Z. Najafova, C.S. Gibhardt, W. Kopp, J. Gaedcke, P. Ströbel, V. Ellenrieder, I. Bogeski, E. Hessmann, S. A. Johnsen, STIM1 Mediates Calcium-Dependent Epigenetic Reprogramming in Pancreatic Cancer, Cancer Res. 81 (2021) 2943–2955, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2874.

[60] K. Kondratska, A. Kondratskyi, M. Yassine, L. Lemonnier, G. Lepage, A. Morabito, R. Skryma, N. Prevarskaya, Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma, Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1843 (2014) 2263–2269, https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.012.

[61] B.-D. Tang, X. Xia, X.-F. Lv, B.-X. Yu, J.-N. Yuan, X.-Y. Mai, J.-Y. Shang, J.-G. Zhou, S.-J. Liang, R.-P. Pang, Inhibition of Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry enhances chemosensitivity of HepG2 hepatocarcinoma cells to 5-fluorouracil, J. Cell. Mol. Med. 21 (2017) 904–915, https://doi.org/10.1111/jcmm.13029.

[62] R. Cai, X. Ding, K. Zhou, Y. Shi, R. Ge, G. Ren, Y. Jin, Y. Wang, Blockade of TRPC6 channels induced G2/M phase arrest and suppressed growth in human gastric cancer cells, Int. J. Cancer. 125 (2009) 2281–2287, https://doi.org/10.1002/ijc.24551.

[63] X. Liu, J. Zou, J. Su, Y. Lu, J. Zhang, L. Li, F. Yin, Downregulation of transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1 contributes to drug resistance and high histological grade in ovarian cancer, Int. J. Oncol. 48 (2016) 243–252, https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3254.

[64] T. Maeda, A. Suzuki, K. Koga, C. Miyamoto, Y. Maehata, S. Ozawa, R.-I. Hata, Y. Nagashima, K. Nabeshima, K. Miyazaki, Y. Kato, TRPM5 mediates acidic extracellular pH signaling and TRPM5 inhibition reduces spontaneous metastasis in mouse B16-BL6 melanoma cells, Oncotarget 8 (2017) 78312–78326, https://doi.org/10.18632/oncotarget.20826.

[65] L. Wen, C. Liang, E. Chen, W. Chen, F. Liang, X. Zhi, T. Wei, F. Xue, G. Li, Q. Yang, W. Gong, X. Feng, X. Bai, T. Liang, Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent, Sci. Rep. 6 (2016) 23269, https://doi.org/10.1038/srep23269.

[66] P. Zhang, X. Liu, H. Li, Z. Chen, X. Yao, J. Jin, X. Ma, TRPC5-induced autophagy promotes drug resistance in breast carcinoma via CaMKKβ/AMPKα/mTOR pathway, Sci. Rep. 7 (2017) 3158, https://doi.org/10.1038/s41598-017-03230-w.

[67] X. Ma, Y. Cai, D. He, C. Zou, P. Zhang, C.Y. Lo, Z. Xu, F.L. Chan, S. Yu, Y. Chen, R. Zhu, J. Lei, J. Jin, X. Yao, Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells, Proc. Natl. Acad. Sci 109 (2012) 16282–16287, https://doi.org/10.1073/pnas.1202989109.

[68] D.-X. He, X.-T. Gu, L. Jiang, J. Jin, X. Ma, A Methylation-Based Regulatory Network for MicroRNA 320a in Chemoresistant Breast Cancer, Mol. Pharmacol. 86 (2014) 536–547, https://doi.org/10.1124/mol.114.092759.

[69] T. Wang, K. Ning, X. Sun, C. Zhang, L. Jin, D. Hua, Glycolysis is essential for chemoresistance induced by transient receptor potential channel C5 in colorectal cancer, BMC Cancer 18 (2018) 207, https://doi.org/10.1186/s12885-018-4123-1.

[70] T. Wang, Z. Chen, Y. Zhu, Q. Pan, Y. Liu, X. Qi, L. Jin, J. Jin, X. Ma, D. Hua, Inhibition of Transient Receptor Potential Channel 5 Reverses 5-Fluorouracil Resistance in Human Colorectal Cancer Cells, J. Biol. Chem. 290 (2015) 448–456, https://doi.org/10.1074/jbc.M114.590364.

[71] N. Takahashi, H.-Y. Chen, I.S. Harris, D.G. Stover, L.M. Selfors, R.T. Bronson, T. Deraedt, K. Cichowski, A.L. Welm, Y. Mori, G.B. Mills, J.S. Brugge, Cancer cells co-opt the neuronal redox-sensing channel trpa1 to promote oxidative-stress tolerance, Cancer Cell 33 (2018) 985–1003, https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.05.001, e7.

[72] S.D. Blake, C.M. Tweed, S.G. McKamey, D.W. Koh, Transient receptor potential, Melastatin-2 (TRPM2) blockade: perspectives on potential novel clinical utility in cancer, Transl. Cancer Res. 6 (2017) S342–S347, https://doi.org/10.21037/tcr.2017.03.11.

[73] S. Almasi, B.E. Kennedy, M. El-Aghil, A.M. Sterea, S. Gujar, S. Partida-Sánchez, Y. El Hiani, TRPM2 channel–mediated regulation of autophagy maintains mitochondrial function and promotes gastric cancer cell survival via the JNK-signaling pathway, J. Biol. Chem. 293 (2018) 3637–3650, https://doi.org/10.1074/jbc.M117.817635.

[74] J. Liu, G. Hu, Y. Gong, Q. Yu, B. He, W. Li, Z. He, W. Hao, Z. He, Y. Liu, Silencing of TRPM8 inhibits aggressive tumor phenotypes and enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer, Pancreatology 18 (2018) 935–944, https://doi.org/10.1016/j.pan.2018.08.011.

[75] M. Nabissi, M.B. Morelli, M. Santoni, G. Santoni, Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents, Carcinogenesis 34 (2013) 48–57, https://doi.org/10.1093/carcin/bgs328.

[76] H.A. Deveci, M. Nazıroğlu, G. Nur, 5-Fluorouracil-induced mitochondrial oxidative cytotoxicity and apoptosis are increased in MCF-7 human breast cancer cells by TRPV1 channel activation but not Hypericum perforatum treatment, Mol. Cell. Biochem. 439 (2018) 189–198, https://doi.org/10.1007/s11010-017-3147-1.

[77] P.A. Koşar, M. Nazıroğlu, İ.S. Övey, B. Çiğ, Synergic Effects of Doxorubicin and Melatonin on Apoptosis and Mitochondrial Oxidative Stress in MCF-7 Breast Cancer Cells: involvement of TRPV1 Channels, J. Membr. Biol. 249 (2016) 129–140, https://doi.org/10.1007/s00232-015-9855-0.

[78] G. Nur, M. Nazıroğlu, H.A. Deveci, Synergic prooxidant, apoptotic and TRPV1 channel activator effects of alpha-lipoic acid and cisplatin in MCF-7 breast cancer cells, J. Recept. Signal Transduct. 37 (2017) 569–577, https://doi.org/10.1080/10799893.2017.1369121.

[79] L. Li, C. Chen, Q. Xiang, S. Fan, T. Xiao, Y. Chen, D. Zheng, Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1 Expression Promotes Chemoresistance in Non-Small-Cell Lung Cancer, Front. Oncol. 12 (2022), 773654, https://doi.org/10.3389/fonc.2022.773654.

[80] J.D. Malhotra, R.J. Kaufman, ER Stress and its functional link to mitochondria: role in cell survival and death, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 3 (2011), a004424, https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004424 a004424.

[81] N. Al-Taweel, E. Varghese, A.-M. Florea, D. Büsselberg, Cisplatin (CDDP) triggers cell death of MCF-7 cells following disruption of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) homeostasis, J. Toxicol. Sci. 39 (2014) 765–774, https://doi.org/10.2131/jts.39.765.

[82] Y. Xu, C. Wang, J. Su, Q. Xie, L. Ma, L. Zeng, Y. Yu, S. Liu, S. Li, Z. Li, L. Sun, Tolerance to endoplasmic reticulum stress mediates cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by maintaining endoplasmic reticulum and mitochondrial homeostasis, Oncol. Rep. 34 (2015) 3051–3060, https://doi.org/10.3892/or.2015.4283.

[83] S. Al-Bahlani, M. Fraser, A.Y.C. Wong, B.S. Sayan, R. Bergeron, G. Melino, B. K. Tsang, P73 regulates cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism, Oncogene 30 (2011) 4219–4230, https://doi.org/10.1038/onc.2011.134.

[84] Q. Xie, J. Su, B. Jiao, L. Shen, L. Ma, X. Qu, C. Yu, X. Jiang, Y. Xu, L. Sun, ABT737 reverses cisplatin resistance by regulating ER-mitochondria Ca2+ signal transduction in human ovarian cancer cells, Int. J. Oncol. 49 (2016) 2507–2519, https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3733.

[85] N.P. Bleeker, R.L. Cornea, D.D. Thomas, C. Xing, A Novel SERCA Inhibitor Demonstrates Synergy with Classic SERCA Inhibitors and Targets Multidrug-Resistant AML, Mol. Pharm. 10 (2013) 4358–4366, https://doi.org/10.1021/mp400458u.

[86] S. Padar, C. Van Breemen, D.W. Thomas, J.A. Uchizono, J.C. Livesey, R. Rahimian, Differential regulation of calcium homeostasis in adenocarcinoma cell line A549 and its Taxol-resistant subclone: altered calcium regulation in

chemoresistant cells, Br. J. Pharmacol. 142 (2004) 305–316, https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705755.
[87] S.-Y. Jeong, D.-W. Seol, The role of mitochondria in apoptosis, BMB Rep. 41 (2008) 11–22, https://doi.org/10.5483/BMBRep.2008.41.1.011.
[88] P.K. Chakraborty, S.B. Mustafi, X. Xiong, S.K.D. Dwivedi, V. Nesin, S. Saha, M. Zhang, D. Dhanasekaran, M. Jayaraman, R. Mannel, K. Moore, S. McMeekin, D. Yang, R. Zuna, K. Ding, L. Tsiokas, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, MICU1 drives glycolysis and chemoresistance in ovarian cancer, Nat. Commun. 8 (2017) 14634, https://doi.org/10.1038/ncomms14634.
[89] P. Cruz, U. Ahumada-Castro, G. Bustos, J. Molgó, D. Sauma, A. Lovy, C. Cárdenas, Inhibition of InsP3R with Xestospongin B Reduces Mitochondrial Respiration and Induces Selective Cell Death in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells, Int. J. Mol. Sci. 22 (2021) 651, https://doi.org/10.3390/ijms22020651.
[90] V. Shoshan-Barmatz, D. Ben-Hail, L. Admoni, Y. Krelin, S.S. Tripathi, The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells, Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. 1848 (2015) 2547–2575, https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.040.
[91] N. Tajeddine, L. Galluzzi, O. Kepp, E. Hangen, E. Morselli, L. Senovilla, N. Araujo, G. Pinna, N. Larochette, N. Zamzami, N. Modjtahedi, A. Harel-Bellan, G. Kroemer, Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death, Oncogene 27 (2008) 4221–4232, https://doi.org/10.1038/onc.2008.63.
[92] N. Arbel, V. Shoshan-Barmatz, Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Bcl-2 to Prevent Antiapoptotic Activity, J. Biol. Chem. 285 (2010) 6053–6062, https://doi.org/10.1074/jbc.M109.082990.
[93] M.C. Brahimi-Horn, D. Ben-Hail, M. Ilie, P. Gounon, M. Rouleau, V. Hofman, J. Doyen, B. Mari, V. Shoshan-Barmatz, P. Hofman, J. Pouysségur, N.M. Mazure, Expression of a Truncated Active Form of VDAC1 in Lung Cancer Associates with Hypoxic Cell Survival and Correlates with Progression to Chemotherapy Resistance, Cancer Res 72 (2012) 2140–2150, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3940.
[94] I. Ferecatu, F. Canal, L. Fabbri, N.M. Mazure, C. Bouton, M.-P. Golinelli-Cohen, Dysfunction in the mitochondrial Fe-S assembly machinery leads to formation of the chemoresistant truncated VDAC1 isoform without HIF-1α activation, PLoS ONE 13 (2018), e0194782, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194782.
[95] H. Pahima, S. Reina, N. Tadmor, D. Dadon-Klein, A. Shteinfer-Kuzmine, N. M. Mazure, V.D. Pinto, V. Shoshan-Barmatz, Hypoxic-induced truncation of voltage-dependent anion channel 1 is mediated by both asparagine endopeptidase and calpain 1 activities, Oncotarget 9 (2018) 12825–12841, https://doi.org/10.18632/oncotarget.24377.
[96] N. Dehghan-Nayeri, M. Rezaei-Tavirani, M.D. Omrani, A. Gharehbaghian, K. Goudarzi Pour, P. Eshghi, Identification of potential predictive markers of dexamethasone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia, J. Cell Commun. Signal. 11 (2017) 137–145, https://doi.org/10.1007/s12079-016-0357-3.
[97] S. Marchi, P. Pinton, Mitochondrial calcium uniporter, MiRNA and cancer: live and let die, Commun. Integr. Biol. 6 (2013) e23818, https://doi.org/10.4161/cib.23818.
[98] D.D. Hall, Y. Wu, F.E. Domann, D.R. Spitz, M.E. Anderson, Mitochondrial Calcium Uniporter Activity Is Dispensable for MDA-MB-231 Breast Carcinoma Cell Survival, PLoS ONE 9 (2014) e96866, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096866.
[99] T.S. Luongo, J.P. Lambert, P. Gross, M. Nwokedi, A.A. Lombardi, S. Shanmughapriya, A.C. Carpenter, D. Kolmetzky, E. Gao, J.H. van Berlo, E. J. Tsai, J.D. Molkentin, X. Chen, M. Madesh, S.R. Houser, J.W. Elrod, The mitochondrial Na+/Ca2+ exchanger is essential for Ca2+ homeostasis and viability, Nature 545 (2017) 93–97, https://doi.org/10.1038/nature22082.
[100] K. Beider, E. Rosenberg, V. Dimenshtein-Voevoda, Y. Sirovsky, J. Vladimirsky, H. Magen, O. Ostrovsky, A. Shimoni, Z. Bromberg, L. Weiss, A. Peled, A. Nagler, Blocking of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) promotes terminal mitophagy in multiple myeloma, disturbing calcium homeostasis and targeting ubiquitin pathway and bortezomib-induced unfolded protein response, J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol. 13 (2020) 158, https://doi.org/10.1186/s13045-020-00993-0.
[101] P.H. Bui, A. Quesada, A. Handforth, O. Hankinson, The Mibefradil Derivative NNC55-0396, a Specific T-Type Calcium Channel Antagonist, Exhibits Less CYP3A4 Inhibition than Mibefradil, Drug Metab. Dispos. 36 (2008) 1291–1299, https://doi.org/10.1124/dmd.107.020115.
[102] H. Han, W. Guo, W. Shi, Y. Yu, Y. Zhang, X. Ye, J. He, Hypertension and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis, Sci. Rep. 7 (2017) 44877, https://doi.org/10.1038/srep44877.
[103] M. Pahor, J.M. Guralnik, L. Ferrucci, M.-C. Corti, M.E. Salive, J.R. Cerhan, R. B. Wallace, R.J. Havlik, Calcium-channel blockade and incidence of cancer in aged populations, Lancet 348 (1996) 493–497, https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)04277-8.
[104] C.R. Meier, L.E. Derby, S.S. Jick, H. Jick, Angiotensin-converting enzyme inhibitors, calcium channel blockers, and breast cancer, Arch. Intern. Med. 160 (2000) 349, https://doi.org/10.1001/archinte.160.3.349.
[105] D. Belpomme, S. Gauthier, E. Pujade-Lauraine, T. Facchini, M.-J. Goudier, I. Krakowski, G. Netter-Pinon, M. Frenay, C. Gousset, F.N. Marié, M. Benmiloud, F. Sturtz, Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma, Ann. Oncol. 11 (2000) 1471–1476, https://doi.org/10.1023/A:1026556119020.
[106] M. Millward, B. Cantwell, N. Munro, A. Robinson, P. Corris, A. Harris, Oral verapamil with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a randomised study, Br. J. Cancer. 67 (1993) 1031–1035, https://doi.org/10.1038/bjc.1993.189.
[107] W.S. Dalton, J.J. Crowley, S.S. Salmon, T.M. Grogan, L.R. Laufman, G.R. Weiss, J. D. Bonnet, A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A southwest oncology group study, Cancer 75 (1995) 815–820, https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950201)75:3<815:. AID-CNCR2820750311>3.0.CO;2-R.
[108] O. Mignen, C. Brink, A. Enfissi, A. Nadkarni, T.J. Shuttleworth, D.R. Giovannucci, T. Capiod, Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells, J. Cell Sci. 118 (2005) 5615–5623, https://doi.org/10.1242/jcs.02663.
[109] W.M. Stadler, G. Rosner, E. Small, D. Hollis, B. Rini, S.D. Zaentz, J. Mahoney, M. J. Ratain, Successful Implementation of the Randomized Discontinuation Trial Design: an Application to the Study of the Putative Antiangiogenic Agent Carboxyaminoimidazole in Renal Cell Carcinoma—CALGB 69901, J. Clin. Oncol. 23 (2005) 3726–3732, https://doi.org/10.1200/JCO.2005.44.150.
[110] M. Guéguinou, A. Chantôme, G. Fromont, P. Bougnoux, C. Vandier, M. Potier-Cartereau, KCa and Ca2+ channels: the complex thought, Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. 1843 (2014) 2322–2333, https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.02.019.
[111] G. D`Alessandro, C. Limatola, M. Catalano, Functional Roles of the Ca2+-activated K+ Channel, KCa3.1, in Brain Tumors, Curr. Neuropharmacol. 16 (2018) 636–643, https://doi.org/10.2174/0929867324666170713103621.
[112] C.J. Mohr, F.A. Steudel, D. Gross, P. Ruth, W.-Y. Lo, R. Hoppe, W. Schroth, H. Brauch, S.M. Huber, R. Lukowski, Cancer-Associated Intermediate Conductance Ca2+-Activated K+ Channel KCa3.1, Cancers (Basel) 11 (2019) 109, https://doi.org/10.3390/cancers11010109.
[113] X. Liu, L. Wei, B. Zhao, X. Cai, C. Dong, F. Yin, Low expression of KCNN3 may affect drug resistance in ovarian cancer, Mol. Med. Rep. (2018), https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9107.
[114] P. Samuel, R.C. Pink, D.P. Caley, J.M.S. Currie, S.A. Brooks, D.R.F. Carter, Over-expression of miR-31 or loss of KCNMA1 leads to increased cisplatin resistance in ovarian cancer cells, Tumor Biol. 37 (2016) 2565–2573, https://doi.org/10.1007/s13277-015-4081-z.
[115] S. Pillozzi, M. D`Amico, G. Bartoli, L. Gasparoli, G. Petroni, O. Crociani, T. Marzo, A. Guerriero, L. Messori, M. Severi, R. Udisti, H. Wulff, K.G. Chandy, A. Becchetti, A. Arcangeli, The combined activation of KCa3.1 and inhibition of Kv11.1/hERG1 currents contribute to overcome Cisplatin resistance in colorectal cancer cells, Br. J. Cancer. 118 (2018) 200–212, https://doi.org/10.1038/bjc.2017.392.
[116] P. Lin, J. Li, F. Ye, W. Fu, X. Hu, Z. Shao, C. Song, KCNN4 induces multiple chemoresistance in breast cancer by regulating BCL2A1, Am. J. Cancer Res. 10 (2020) 3302–3315.
[117] K. Alvina, K. Khodakhah, KCa Channels as Therapeutic Targets in Episodic Ataxia Type-2, J. Neurosci. 30 (2010) 7249–7257, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6341-09.2010.
[118] S. Losin, C.M. McKean, Chlorzoxazone (paraflex) in the treatment of severe spasticity, Dev. Med. Child Neurol. 8 (1966) 768–769.
[119] R.G. Miller, J.D. Mitchell, D.H. Moore, Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND), Cochrane Database Syst. Rev. (2012), https://doi.org/10.1002/14651858.CD001447.pub3.
[120] G. Ristori, S. Romano, A. Visconti, S. Cannoni, M. Spadaro, M. Frontali, F. E. Pontieri, N. Vanacore, M. Salvetti, Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial, Neurology 74 (2010) 839–845, https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d31e23.
[121] J.M. Thompson, G. Ji, V. Neugebauer, Small-Conductance Calcium-Activated Potassium (SK) Channels in the Amygdala Mediate Pain-Inhibiting Effects of Clinically Available Riluzole in a Rat Model of Arthritis Pain, Mol. Pain. 11 (2015) s12990, https://doi.org/10.1186/s12990-015-0055-9, 015–0055.
[122] A. Blyufer, S. Lhamo, C. Tam, I. Tariq, T. Thavornwatanayong, S. Mahajan, Riluzole: a neuroprotective drug with potential as a novel anti-cancer agent (Review), Int. J. Oncol. 59 (2021) 95, https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5275.

Alison ROBERT

Rôle des protéines d'absorption du calcium mitochondrial MICUs dans la progression du cancer colorectal

Résumé

La reprogrammation métabolique est un processus par lequel les cellules cancéreuses s'adaptent afin d'acquérir de nouvelles propriétés phénotypiques pour soutenir la croissance et la formation de métastases. Le métabolisme énergétique est en partie régulé par l'absorption de calcium mitochondrial à travers l'uniporteur d'influx du calcium MCU. Cet uniporteur est un grand complexe multimoléculaire composé du canal calcique MCU et de diverses protéines régulatrices d'absorption du calcium, telles que MICU1, MICU2, MICU3, MCUb et d'autres protéines stabilisatrices de ce complexe comme la protéine EMRE. Dans le cancer colorectal, l'expression de MCU est fortement augmentée dans les tissus tumoraux et associée à un mauvais pronostic chez les patients. Ce travail de thèse avait pour but de déterminer le rôle potentiel des protéines régulatrices de l'absorption du calcium MICUs dans les propriétés oncogéniques du CCR. Nos résultats démontrent une augmentation des transcrits de MICU2 dans les stades IV des patients atteints de CCR. Nos expérimentations in-vitro et in vivo décrivent un rôle spécifique de MICU2 dans la prolifération des cellules cancéreuses coliques. Nous montrons également que la protéine MICU2 intervient dans l'équilibre des flux métaboliques (glycolyse /OXPHOS) notamment par son action sur l'absorption du Ca^{2+} mitochondrial, le réseau mitochondrial et son rôle dans l'assemblage et le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Mots clés : complexe MCU, MICU2, signalisation calcique, métabolisme énergétique, mitochondrie, reprogrammation métabolique, canaux ioniques

Résumé en anglais

Metabolic reprogramming is a process by which cancer cells adapt to acquire new phenotypic properties to support tumor growth and metastasis. Energy metabolism is partly regulated by mitochondrial calcium uptake through the MCU calcium influx uniporter. This uniporter is a large multimolecular complex composed of the MCU calcium channel and various calcium uptake regulatory proteins, such as MICU1, MICU2, MICU3, MCUb and other stabilizing proteins of this complex such as the EMRE protein. In colorectal cancer, MCU expression is strongly increased in tumor tissues and associated with a poor prognosis in patients. The aim of this thesis work was to determine the potential role of calcium uptake regulatory proteins MICUs in the oncogenic properties of CRC. Our results demonstrate an increase in MICU2 transcripts in stage IV CRC patients. Our in-vitro and in vivo experiments describe a specific role for MICU2 in the proliferation of colorectal cancer cells. We also show that the MICU2 protein is involved in the balance of metabolic fluxes between glycolysis and OXPHOS, notably through its action on mitochondrial Ca^{2+} uptake, the mitochondrial network, and its role in the assembly and proper functioning of the respiratory chain.

Keywords : MCU complex, MICU2, calcium signalling, energetic metabolism, mitochondria, metabolic reprogramming, ion channels