



**HAL**  
open science

# Modulation du potentiel invasif des cellules cancéreuses mammaires humaines par le canal calcique Orai3

Mohamed Chamlali

► **To cite this version:**

Mohamed Chamlali. Modulation du potentiel invasif des cellules cancéreuses mammaires humaines par le canal calcique Orai3. Santé. Université de Picardie Jules Verne, 2021. Français. NNT : 2021AMIE0078 . tel-03941281

**HAL Id: tel-03941281**

**<https://theses.hal.science/tel-03941281>**

Submitted on 16 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Thèse de Doctorat

*Mention Biologie – Santé  
Spécialité Physiopathologie Humaine*

présentée à l'*Ecole Doctorale en Sciences Technologie et Santé (ED 585)*

de l'Université de Picardie Jules Verne

par

**Mohamed Chamlali**

pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Picardie Jules Verne

***Modulation du potentiel migratoire des cellules cancéreuses  
mammaires humaines par le canal calcique ORAI3.***

Soutenue le 07 Décembre 2021, après avis des rapporteurs, devant le jury d'examen :

<b>M. H. MORJANI, Professeur des Universités</b> Université de Reims Champagne – Ardennes	<b>Examineur</b>
<b>M. F. VAN COPPENOLLE, Professeur des Universités</b> Université Claude Bernard Lyon 1	<b>Rapporteur</b>
<b>M. L. LEMONNIER, Chargé de recherche – HDR,</b> Université de Lille 1	<b>Rapporteur</b>
<b>M<sup>me</sup> I. MARCQ, Maître de Conférences – HDR,</b> Université de Picardie Jules Verne	<b>Examineur</b>
<b>M. A. PENNA, Chargé de recherche – HDR,</b> Université de Poitiers	<b>Examineur</b>
<b>M<sup>me</sup> H. OUADID-AHIDOUCH, Professeur des Universités,</b> Université de Picardie Jules Verne	<b>Directrice de thèse</b>



## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Fabien Van Coppenolle, le Dr Loïc Lemonnier, le Professeur Hamid Morjani, le Docteur Aubin Penna, et le Docteur Ingrid Marcq d'avoir accepté de prendre part à mon jury de doctorat. Je vous remercie d'avance aussi bien pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de recherche et votre regard critique, que pour nos échanges à l'issue de la présentation de mes travaux de thèse.

Naturellement, mes plus profonds remerciements s'adressent ensuite au Professeur Halima Ouadid-Ahidouch. Merci du fond du cœur de m'avoir accueilli au laboratoire depuis maintenant un bon moment. Merci également pour votre encadrement !! Il m'a tant apporté ... Aussi bien professionnellement qu'humainement. Votre porte toujours grande ouverte, vos encouragements et votre soutien, vos corrections ... Il y a tellement de choses pour lesquels j'aimerais vous exprimer ma gratitude. Encore une fois ... Merci !!!

La plus grande gratitude que j'exprime va également pour le Professeur Albrecht Schwab ... MERCI, MERCI, ET ENCORE MERCI. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre accueil à bras grands ouverts et de m'avoir accordé une énorme place au sein de votre laboratoire. Merci également pour votre remarquable gentillesse et disponibilité !! J'aurais énormément appris à vos côtés durant ces 3 mois. Pour tout ça, je vous en serais reconnaissant pour toujours. J'espère sincèrement continuer à collaborer avec vous pendant longtemps.

Au Docteur Lise Rodat-Despoix. Merci pour tout !! Ta rigueur, ta disponibilité, ta bonne humeur, et ton soutien ont été un moteur durant ma thèse. Tu as toujours su m'aider, me remotiver et débloquer n'importe quelle situation (Particulièrement en Western Blot). Je t'exprime ma plus grande reconnaissance pour tout le travail que tu as accompli durant ma thèse.

Mes remerciements vont ensuite au Docteur Philippe Kischel. Merci pour ton expertise. Tes conseils en biologie moléculaire ont été inestimables. Je regrette profondément ton départ et j'aurais réellement souhaité creuser Orai3 et P53 avec toi.

Un grand Merci également au Docteur Aubin Penna et au Docteur Ingrid Marcq d'avoir suivi mes travaux durant ma thèse dans le cadre du CST. Je vous en suis très reconnaissant. Une pensée particulière au Docteur Ingrid Marcq qui aura suivi mon travail depuis le Master. C'est une belle façon de clôturer le chapitre.

Étant donné que la thèse fait partie intégrante de la vie d'un doctorant, une ribambelle de personne mérite mes plus sincères remerciements pour non seulement leur aide de quelque manière dans mon travail, mais également pour avoir réussi à rendre ma vie un peu plus lumineuse chaque jour.

Merci au Professeur Mathieu Gautier pour sa bienveillance quotidienne. Merci au Docteur Isabelle Dhennin-Duthille pour sa disponibilité et les réponses apportées à mes questions. Merci également au Docteur Alban Girault pour la formation des plus complètes que j'ai eu à ses côtés en Master 2. Je remercie vivement le Docteur Frédéric Hague, pour sa bonne humeur, mais également pour son écoute et ses conseils. Merci aussi à Marie-Sophie Telliez pour sa bienveillance. Et surtout, un grand merci à Lucille et Nathalie, pour leur disponibilité, leur bonne humeur et les innombrables pauses cigarettes !

La thèse est une aventure des plus compliquées ... Et pourtant, elle l'aurait beaucoup plus été sans quelques très bons collègues ... Ces 3 dernières années n'auraient pas été les mêmes sans vous. Il y en a beaucoup trop pour tous les nommer mais je pense à vous ... Néanmoins, je tiens à remercier certains d'entre eux de vive voix : Merci à mes très chers collègues, Sana, « Julu », Julie, Riadh, Sylvie, Hiba et Thibaut pour nos longues discussions plus ou moins sérieuses, nos rires, et notre superbe cohésion ! Je suis ravi de vous avoir rencontré et d'avoir partagé ces bons moments avec vous tous ! Merci également à Zöltan, Matteo, Thorsten et tous les autres pour avoir rendu mon séjour à Münster le plus agréable possible !! J'adresse une pensée particulière au Docteur Mehdi Badaoui, un de tes enseignements résonne et résonnera encore dans mon esprit ... « ça rentre par une oreille et ça en ressort directement par l'autre, c'est ça la clé du succès », je n'y croyais pas et pourtant ...

Enfin, je remercie mes proches qui ont suivi de près ou de loin cette fabuleuse aventure. Notamment vous les gars !! Morgan, Seb, Flo et compagnie, merci d'avoir toujours pensé à moi pour les apéros même lorsque je refusais de venir de peur de devoir me coller une journée au labo sans avoir dormi. Promis, je reprendrai nos bonnes vieilles habitudes d'ici peu. Merci pour votre soutien, vos visites à la maison, et pour tous nos moments de folie ! Merci à Candice, grande aventurière en thèse également, pour nos moments de solidarité. Nos discussions m'ont toujours remonté le moral et m'ont permis de me relever. Pour ça, MERCI ! A Nicolas alias Jacky, un autre grand aventurier ... D'abord, bon courage et bravo d'avance pour ta soutenance de thèse. Merci pour tes blagues douteuses, pour nos messages plaintifs et pour tout.

A ma famille ... Que dire à part MERCI du fond du cœur et que je ne vous oublie pas !!!

Enfin, à Julie ... Tu sais tout ce que je pense de toi !!! Je t'en serais éternellement reconnaissant ...

# Table des matières

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE 1 : LA GLANDE MAMMAIRE, DU FONCTIONNEMENT PHYSIOLOGIQUE AU CANCER 2</b>	
1. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE .....	2
2. CANCEROGENESE .....	3
a. Étapes de la cancérogenèse .....	5
b. Migration et invasion cellulaires .....	9
c. Angiogenèse et formation de métastases .....	9
3. ÉPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU SEIN .....	10
a. Incidence et mortalité .....	10
b. Facteurs de risque .....	11
c. Classification des cancers du sein .....	11
d. Traitements thérapeutiques .....	15
<b>PARTIE 2 : MIGRATION CELLULAIRE .....</b>	<b>17</b>
1. INTRODUCTION .....	17
2. MECANISMES GENERAUX .....	17
a. Migration cellulaire individuelle : exemple de la migration mésenchymateuse .....	17
b. Autres types de migration .....	19
3. LE CYTOSQUELETTE : FOCUS SUR LES FILAMENTS D'ACTINE .....	21
a. Microtubules et filaments intermédiaires .....	21
a. Dynamique de l'actine .....	24
b. Protrusions cellulaires et morphologie .....	25
4. COMPLEXES D'ADHESION FOCALUX .....	27
a. Formation des complexes d'adhésion focaux .....	27
b. Régulation du recyclage des complexes d'adhésion focaux : Focus sur la calpaïne .....	40
<b>PARTIE 3 : SIGNALISATION CALCIQUE ET CANAUX ORAI3 .....</b>	<b>48</b>
1. LE CALCIUM .....	48
a. Définition .....	48
b. Homéostasie calcique .....	50
c. Calcium et cancer .....	57
2. LE CANAL ORAI3 .....	61
a. Généralités sur les canaux ORAI .....	61
b. Les canaux ORAI3 dans la physiopathologie .....	76
c. Canaux ORAI3 et cancers .....	78

<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....	<b>83</b>
<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>84</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>86</b>
<b>CULTURE CELLULAIRE</b> .....	<b>87</b>
1. LIGNEES CELLULAIRES CANCEREUSES .....	87
2. CLONES CELLULAIRES .....	87
3. ENTRETIEN DES LIGNEES CELLULAIRES .....	88
4. CONGELATION ET DECONGELATION DES CELLULES .....	89
<b>RECOUVREMENT DES SURFACES DE CULTURE LE COLLAGENE DE TYPE I</b> .....	<b>89</b>
<b>TRANSFECTION</b> .....	<b>90</b>
1. PRINCIPE.....	90
2. EXTINCTION MOLECULAIRE PAR siARN .....	90
3. SUREXPRESSION TRANSITOIRE .....	91
<b>MIGRATION CELLULAIRE</b> .....	<b>92</b>
1. VIDEOMICROSCOPIE .....	92
2. MIGRATION PAR CHAMBRE DE BOYDEN .....	92
<b>VIABILITE ET PROLIFERATION CELLULAIRE</b> .....	<b>93</b>
<b>ADHESION CELLULAIRE</b> .....	<b>93</b>
1. PROTOCOLE AU MTT .....	93
2. MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE - <i>SINGLE CELL FORCE SPECTROSCOPY</i> .....	94
a. <i>Principe</i> .....	94
b. <i>Acquisition et analyse</i> .....	95
<b>MORPHOLOGIE CELLULAIRE</b> .....	<b>96</b>
<b>IMMUNOFLUORESCENCE</b> .....	<b>97</b>
<b>EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE ET TRADUCTIONNELLE</b> .....	<b>98</b>
1. EXPRESSION TRANSCRIPTIONNELLE : QRT-PCR .....	98
a. <i>Extraction des ARN</i> .....	98
b. <i>Rétro-transcription (RT)</i> .....	98
c. <i>PCR quantitative en temps réel (qPCR)</i> .....	99
2. EXPRESSION PROTEIQUE : WESTERN BLOT .....	100
a. <i>Extraction des protéines</i> .....	100
b. <i>Western Blot</i> .....	101
<b>PROXIMITY LIGATION ASSAY</b> .....	<b>103</b>
<b>IMAGERIE CALCIQUE</b> .....	<b>104</b>

1. PRINCIPE.....	104
2. PROTOCOLE AU QUENCH MANGANESE .....	106
3. PROTOCOLE D'ENTREE BASALE DE CALCIUM .....	107
4. PROTOCOLE D'ETUDE DE LA CONCENTRATION CALCIQUE INTRACELLULAIRE.....	107
5. PROTOCOLE SOC .....	107
<b>ANALYSES STATISTIQUES.....</b>	<b>107</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>109</b>
PARTIE 1 : ORAI3 REGULE LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES	
BASALES ER- VIA DES MECANISMES DEPENDANT ET INDEPENDANT DU CALCIUM.....	110
<i>Résumé .....</i>	<i>110</i>
<i>Résultats complémentaires : ORAI3 régule l'expression de l'intégrine <math>\beta 1</math> et la localisation de la paxilline</i>	
.....	115
PARTIE 2 : ORAI3 MODULE LA PROLIFERATION, MAIS PAS LA MIGRATION, DES CELLULES	
CANCEREUSES MAMMAIRES LUMINALES ER+ .....	119
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>123</b>
ORAI3 REGULE LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES DE TYPE BASAL VIA UNE	
MODULATION DE LA CONCENTRATION CALCIQUE INTRACELLULAIRE ET DES CAPACITE ADHESIVES CELLULAIRES.	
.....	125
ORAI3, DE FAÇON INDEPENDANTE DE SA FONCTION CANALAIRE ET EN INTERAGISSANT AVEC FAK, MAINTIENT	
LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE. ....	128
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>130</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>135</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>154</b>

# INTRODUCTION



# PARTIE 1 : La glande mammaire, du fonctionnement physiologique au cancer

## 1. Anatomie et physiologie de la glande mammaire

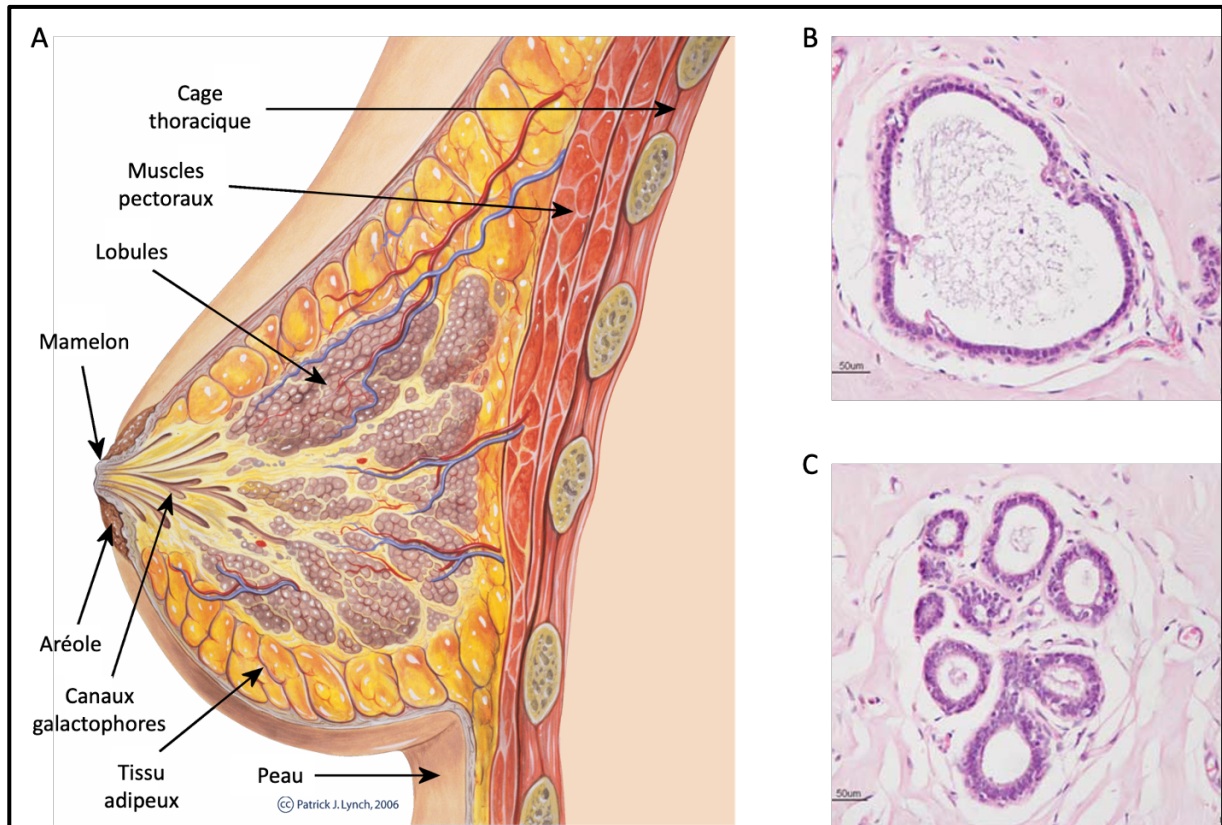
Au cours du développement embryonnaire, et sous l'influence de la prolactine, de glucocorticoïdes et de l'hormone de croissance, l'ectoderme subit un épaissement bilatéral formant une crête mammaire sur laquelle apparaissent deux bourgeons mammaires symétriques. Ces bourgeons persistent pour former une aréole qui s'invagine dans le mésoderme pour former des prolongements cylindriques pleins qui se dilatent et se creuse pour former une amorce des futurs canaux galactophores. Chez l'homme, le développement de la glande mammaire est inhibé par les androgènes, et plus particulièrement la testostérone qui induit une nécrose des cellules épithéliales mammaires conduisant au dimorphisme sexuel (Javed et Lteif 2013, Spina et Cowin 2021).

Chez la femme, de la naissance à la puberté, la glande mammaire se développe lentement en absence de stimulation hormonale. A la puberté, un cocktail hormonal composé d'œstrogènes (produits par les ovaires) et de corticoïdes (issus des glande surrénales), potentialisé par des facteurs de croissance (produit par le stroma mammaire), stimule le développement et les ramifications des canaux galactophores pour former une glande pré-mature. En effet, les cellules épithéliales mammaires se différencient en cellules luminales sécrétrices formant des amas cellulaires : les alvéoles. Par ailleurs, les autres cellules épithéliales se différencient également en d'autres cellules spécialisées formant les canaux galactophores. La glande mammaire reste dans cet état pré-mature et inactif jusqu'à la grossesse.

La maturation complète de la glande mammaire s'accomplit lors de la grossesse sous l'effet des hormones gestationnelles : les œstrogènes, la progestérone, la prolactine et les corticoïdes. Durant la phase gravide, une importante prolifération et un début d'activité des cellules épithéliales lobulaires mammaires sont observés entraînant une augmentation de la taille de la glande mammaire.

Le pic d'activité mammaire est observé durant la lactation. L'expression de gènes codant les protéines du lait s'active fortement chargeant ainsi les cellules épithéliales lobulaires des composants protéiques du lait maternel qui est sécrété dans la lumière des acini puis dans les canaux galactophores pour converger vers le mamelon. Suite à l'arrêt de la lactation, une involution mammaire se produit, causée par une disparition des cellules épithéliales sécrétrices

de lait et un arrêt de l'expression des composants du lait. C'est la fin du cycle de développement de la glande mammaire (**Figure 1**). Enfin, lors de la ménopause, par un manque de stimulation hormonale, une augmentation de l'atrophie cellulaire épithéliale mammaire survient, accompagnée d'une modification architecturale du stroma mammaire ainsi que d'une altération structurelle des fibres de collagène (Javed et Lteif 2013).



**Figure 1** : Anatomie et histologie de la glande mammaire. A. Anatomie de la glande mammaire. B/C. Image d'un canal galactophore (B) et d'un groupe alvéolaire (C) révélés par immunohistochimie. D'après : Patrick J. Lynch (image projeté à l'Université de Yale) et (Hassiotou et Geddes 2013)

## 2. Cancérogénèse

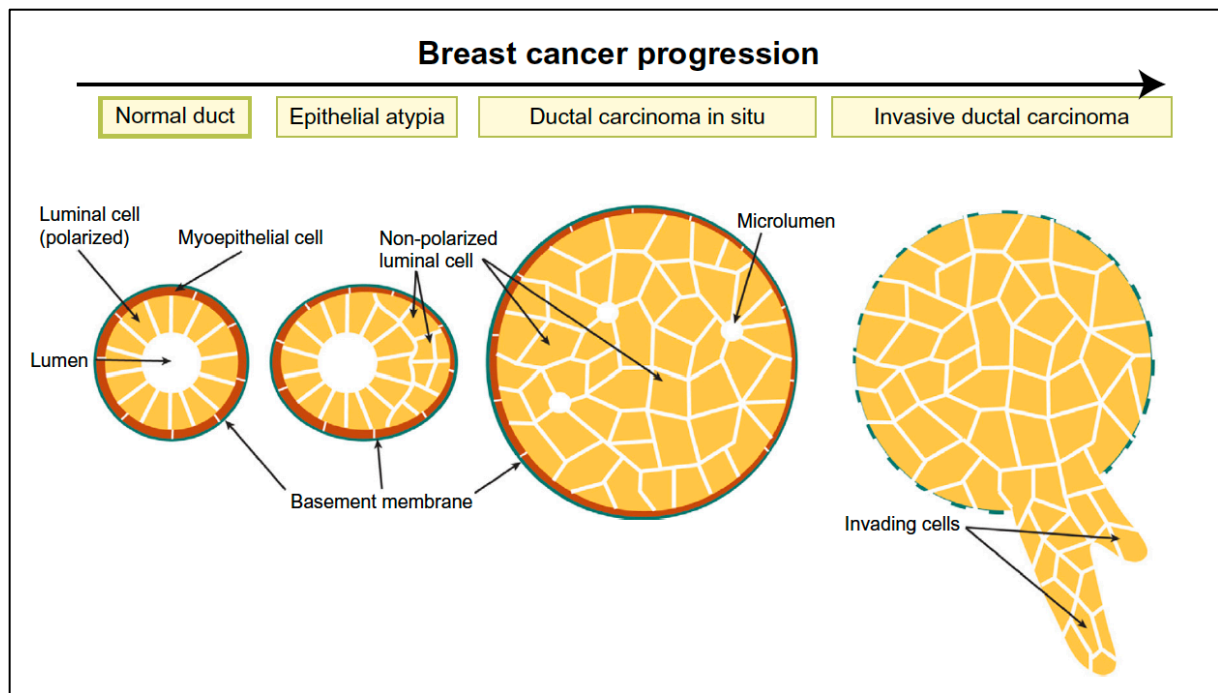
Propre aux eucaryotes pluricellulaires capables de renouvellement cellulaire tout au long de leur vie, les cancers représentent un ensemble de pathologies sévères (tumeurs malignes) pouvant affecter l'ensemble de l'organisme. Les cancers portent différents noms en fonction du tissu dans lequel ils se développent :

- Les carcinomes se développent au sein des tissus épithéliaux. Les adénocarcinomes représentent un sous-type de carcinome caractérisé par un développement survenant au sein des épithéliums glandulaires.
- Les sarcomes caractérisent les tumeurs naissant au cœur des tissus conjonctifs.
- Les cancers hématopoïétiques (également appelés tumeurs liquides) affectent les cellules circulantes (cellules sanguines ou lymphatiques)
- Les cancers affectant le système nerveux (SN). Dans la majorité des cas, les cancers du SN trouvent leur origine au sein des cellules de soutien du SN telles que les cellules gliales.

Les cancers du sein (à 95 % adénocarcinomes) sont des cancers affectant la glande mammaire et font partie des cancers les plus communs dans le monde. Plusieurs autres types rares de cancers du sein existe : les sarcomes de la glande mammaire, les lymphomes primitifs du sein ou encore les tumeurs phyllodes.

Pour leur majorité, les adénocarcinomes mammaires se développent à partir des canaux galactophores (cancers canaux – 75 % des cancers du sein). De façon moins importante, les cancers du sein peuvent se développer à partir des lobules de la glande mammaires (cancers lobulaires – 25 %) (Weigelt *et al.* 2010). On distingue deux grands types de cancers du sein (**Figure 2**) :

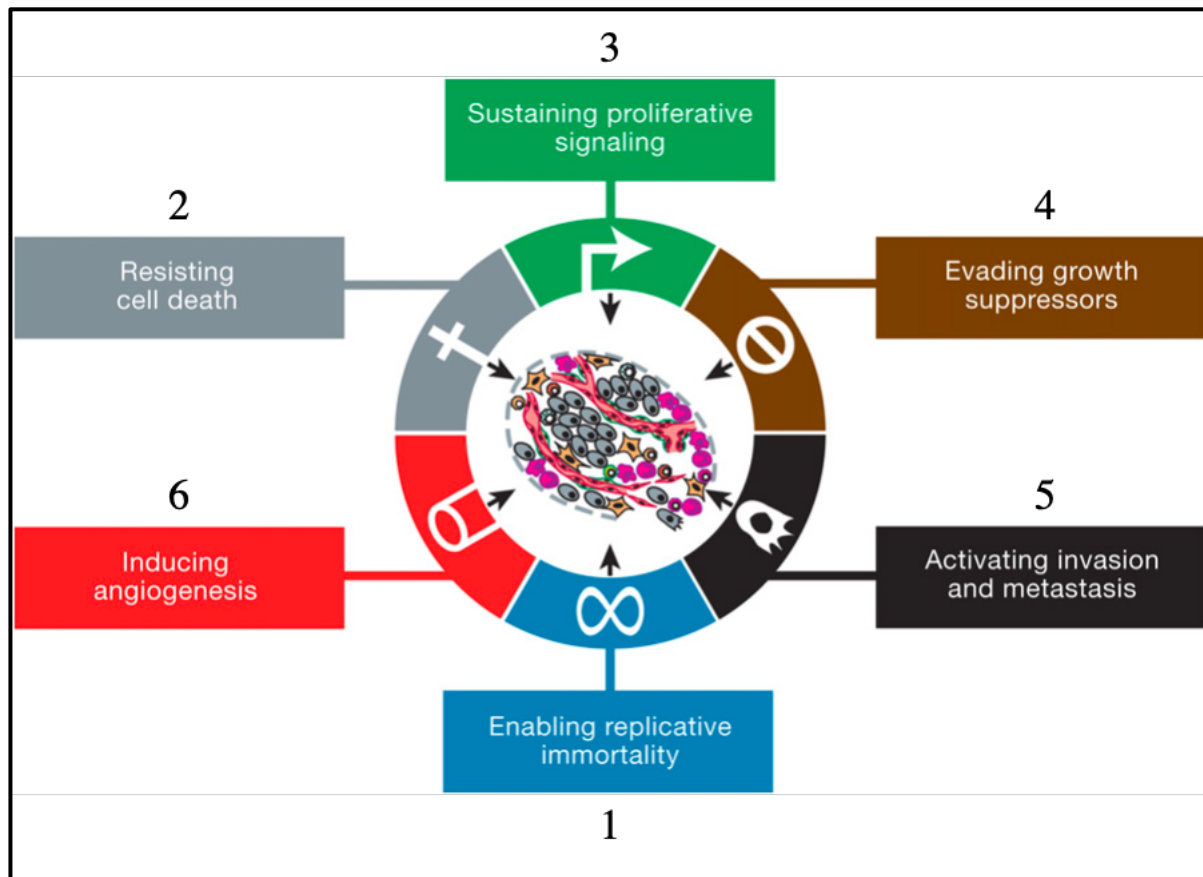
- Les cancers *in situ* caractérisés par des cellules cancéreuses confinées dans les canaux ou dans les lobules. Dans cet état de la maladie, les cellules cancéreuses n'ont pas franchi la lame basale pour coloniser les tissus environnants. Les cancers du sein *in situ* représentent pour beaucoup la phase précoce de la cancérogenèse, lors de la transformation des cellules. Ils représentent un quart des cancers du sein diagnostiqués (Chatterjee et McCaffrey 2014).
- Les cancers du seins invasifs, représentant les trois quarts des cancers mammaires diagnostiqués, sont définis par la capacité des cellules cancéreuses à franchir la lame basale pour se propager dans les tissus environnants et possiblement former des métastases à distance. Ce type de cancer s'impose en tant que cancers les plus agressifs (Chatterjee et McCaffrey 2014).



**Figure 2** : Les différentes étapes de la tumorigenèse. Les cellules épithéliales mammaires subissent une transformation menant à une prolifération cellulaire incontrôlée pour former une tumeur *in situ*, puis envahissent les tissus adjacents pour coloniser l'organisme et former des métastases. (Chatterjee et McCaffrey 2014)

#### a. Étapes de la cancérogenèse

Le développement tumoral est un processus cellulaire anormal caractérisé par une perturbation de la prolifération d'un clone cellulaire anormal (cellule transformée) (Sarkar *et al.* 2013). Durant ce processus, les cellules transformées acquièrent une insensibilité vis-à-vis de signaux moléculaires antiprolifératifs leur conférant une capacité de division cellulaire illimitée associée à une résistance aux processus de mort cellulaire programmée (apoptose). En 2000, Hanahan et Weinberg, ont classé les 6 caractéristiques primordiales de la cellule cancéreuse (nommées *Hallmarks of cancer*) (**Figure 3**) : (1) un potentiel répliatif illimité, (2) un échappement à l'apoptose, (3) une insensibilité vis-à-vis des signaux antiprolifératifs, (4) une autosuffisance vis-à-vis de facteurs de croissance, (5) une invasion tissulaire et une formation de métastases, et (6) une intensive néo-angiogenèse (Hanahan et Weinberg 2000).



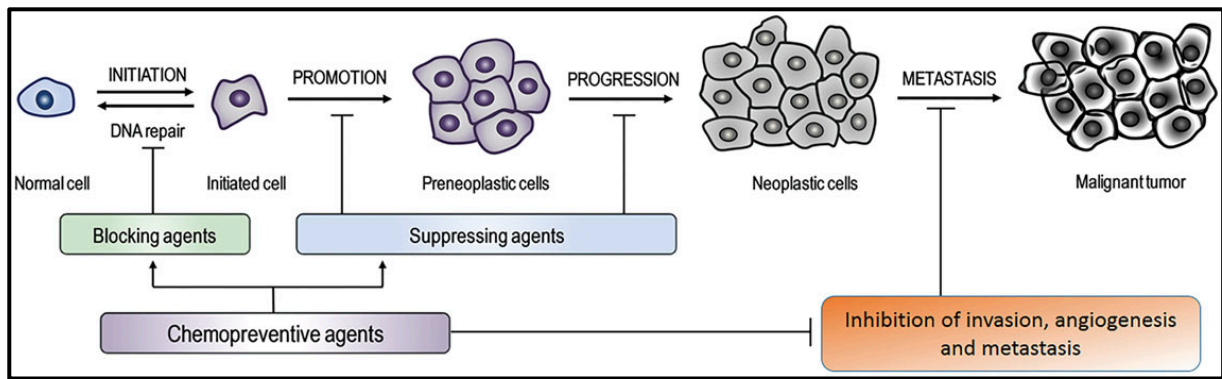
**Figure 3 :** Les six premières et principales caractéristiques des cancers. (Hanahan et Weinberg 2000)

Le développement tumoral suit trois étapes durant lesquelles les cellules se transforment et acquièrent la capacité à former une tumeur maligne (**Figure 4**) (Vincent et Gatenby 2008) :

- L'initiation : Une seule cellule va subir de multiples altérations génétiques d'origine extrinsèque (agents génotoxiques physiques, chimiques ou biologiques) ou intrinsèque (défaut de réparation de l'ADN, mutation génétique existante, espèces réactives de l'oxygène). Ces mutations, non réparées par la cellule, s'accumulent et mènent à la transformation irréversible de la cellule. Cette dernière se transforme et devient une cellule initiatrice de tumeur, caractérisée par une capacité proliférative infinie, y compris en l'absence de stimuli et indépendamment de son microenvironnement. Durant la transformation cellulaire, deux types de gènes peuvent être altérés : (a) les proto-oncogènes et (b) les gènes suppresseurs de tumeurs. Les proto-oncogènes représentent des gènes subissant une activation (mutation gain de fonction) devenant ainsi des oncogènes. Divers oncogènes ont été mis en évidence et codent pour des

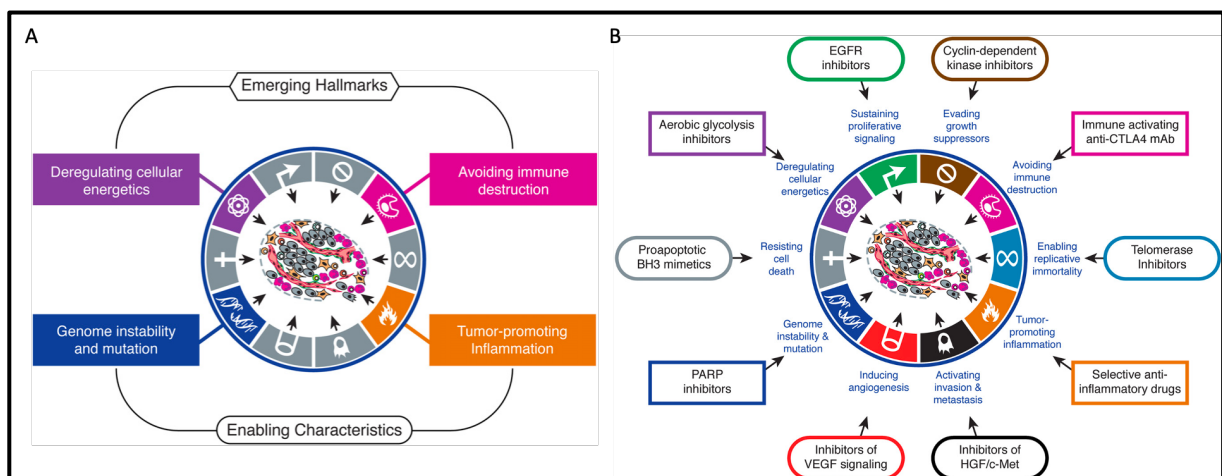
facteurs de croissance et leurs récepteurs, des facteurs de transcription ou encore des protéines initiant la prolifération cellulaire. A l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs subissent des mutations inhibitrices rendant le « frein » prolifératif inefficace. Le gène suppresseur de tumeur le plus connu est le gène TP53 (*Tumor Protein 53* codant pour la protéine P53), connu pour être le siège de mutations dans plus de 50 % des cancers, et rendant impossible la réparation de l'ADN, l'activation de l'apoptose ainsi que l'arrêt de la prolifération cellulaire (Lee et Muller 2010, Muller et Vousden 2013).

- La promotion : L'étape de promotion est considérée comme un processus long et réversible au cours de laquelle s'accumulent les cellules néoplasiques. Ces dernières prolifèrent pour commencer à former la tumeur primaire. La promotion représente la phase entre la lésion précancéreuse et le développement d'un cancer. Il est, par ailleurs, à noter que l'initiation et la promotion demeurent des étapes de la cancérisation pouvant être ralenties par des agents chimiopréventifs (Siddiqui *et al.* 2015).
- La progression : La progression représente la phase finale de la tumorigenèse. Lorsque la cellule est transformée, la prolifération incontrôlée (et incontrôlable) est maximale aboutissant ainsi à la formation d'une masse cellulaire : la tumeur primaire composée de cellules « jumelles » provenant d'une seule et même cellule initiale. Ce potentiel prolifératif est conféré aux cellules cancéreuses par leur autosuffisance vis-à-vis d'agents qualifiés de promoteurs de la cancérogenèse, parmi lesquels les facteurs de croissance. Ces agents moléculaires n'impactent aucunement l'intégrité génomique mais peuvent agir au niveau épigénétique. En effet, ils contribuent à moduler l'expression génique mais n'entraînent pas de mutations de gènes. Les œstrogènes représentent un exemple parfait de promoteur dans le cancer du sein (Sarkar *et al.* 2013). En outre, la tumorigenèse devient irréversible contrairement à l'initiation et la promotion. En effet, le développement du cancer (défini par les deux phases précédentes) est terminé. Au cours de l'étape de progression, les cellules composant la tumeur primaire peuvent acquérir de nouvelles fonctions pour transposer le caractère bénin de la tumeur en processus malin. Les cellules cancéreuses prolifèrent désormais de façon indépendante, échappant complètement à la régulation antiproliférative. La multiplication des cellules ajoute des aberrations génomiques de plus en plus nombreuses prodiguant de surcroît aux cellules cancéreuses un phénotype malin et agressif jusqu'à leur conférer une capacité métastatique (Sarkar *et al.* 2013).



**Figure 4 : La cancérogénèse suit trois étapes : l’initiation, la promotion et la progression.**  
(Siddiqui *et al.* 2015)

Durant les processus tumoraux, d’autres facteurs sont primordiaux. En 2011, Hanahan et Weinberg ont mis à jour leur modèle de caractérisation du cancer, auquel ils ont rajouté quatre caractéristiques (Hanahan et Weinberg 2011) : (1) une dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule, (2) une instabilité génomique, (3) un échappement à l’immunité anti-tumorale, et (4) un façonnement d’un environnement tumoral (**Figure 5**). Les deux dernières permettant d’intégrer une notion de microenvironnement tumoral (MET) régulant fortement les processus cancéreux.



**Figure 5 : Les quatre nouvelles caractéristiques du cancer.** A. Hanahan et Weinberg ont, en 2011, ajouté quatre caractéristiques à leur modèle de cancer développé en 2000. B. Cibles thérapeutiques proposées par Hanahan et Weinberg pour la thérapie contre les cancers. Modifié à partir de (Hanahan et Weinberg 2011)

### b. Migration et invasion cellulaires

Le cancer, sous sa forme la plus grave, n'est pas seulement une anomalie de la prolifération cellulaire mais également une altération des processus de migration et d'invasion cellulaires. Durant la progression de la maladie cancéreuse, les cellules acquièrent des propriétés agressives en vue de se propager à travers les tissus environnants et former des tumeurs secondaires : les métastases (Bravo-Cordero *et al.* 2012). Durant l'acquisition de ce processus, les cellules cancéreuses perdent leur fonction d'adhésion permanente à la matrice extracellulaire (MEC) leur permettant de se détacher et de développer des adhésions temporaires et dynamiques leur permettant de se mouvoir. Plusieurs modifications phénotypiques sont observées durant l'acquisition des processus migratoires et invasifs, notamment des modifications morphologiques et de polarité cellulaire associées à un remaniement du cytosquelette. De plus, les cellules cancéreuses subissent la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) facilitant leur diffusion au sein des tissus adjacents et dans l'organisme (Brabletz *et al.* 2018). La TEM est caractérisée par un changement de phénotype moléculaire impliquant les cadhérines, notamment une perte d'expression des cadhérines E associée à une surexpression des cadhérines N (Ribatti *et al.* 2020). Cette dernière est en partie responsable, avec les intégrines, de la dynamique d'adhésion des cellules à la MEC.

Par ailleurs, une surexpression de protéases spécialisées survient : Les métalloprotéases matricielles (MMP) et le plasminogène par l'intermédiaires de ses activateurs (uPA et tPA) sont responsables de la dégradation de la MEC facilitant la dissémination des cellules cancéreuses dans les tissus pour gagner la circulation sanguine (ou lymphatique) (Raffo *et al.* 2011, Heissig *et al.* 2021).

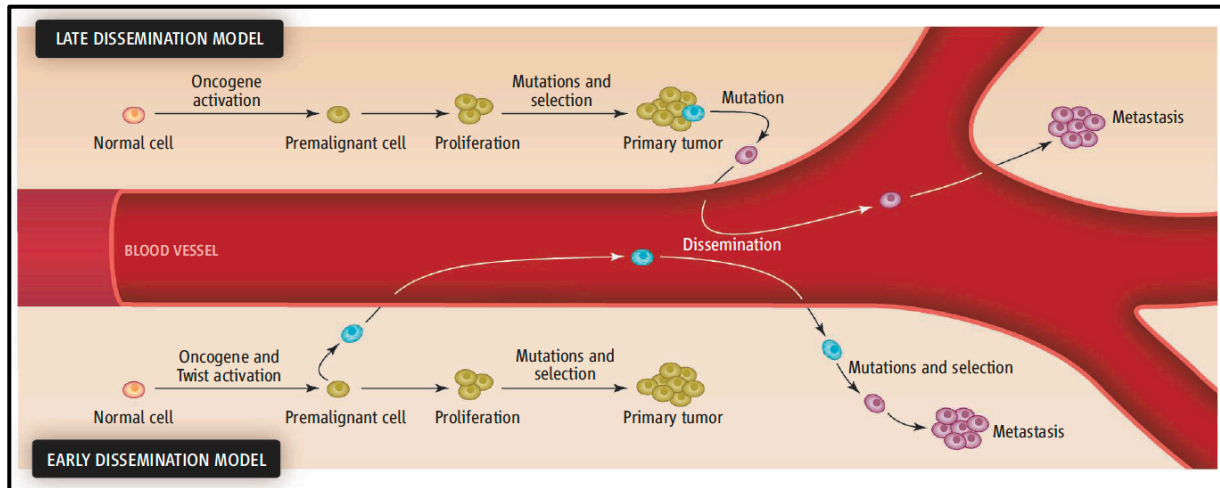
### c. Angiogenèse et formation de métastases

Durant la progression du cancer, la prolifération cellulaire importante entraîne une hypoxie tumorale. L'hypoxie environnante induit une production de nouveaux vaisseaux sanguins *via* la synthèse du facteur de croissance pro-angiogénique *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Bottaro et Liotta 2003). Le VEGF se fixe ensuite sur ses récepteurs présents sur la paroi des vaisseaux sanguins préexistants, induisant leur allongement et la formation de nouveaux vaisseaux (Nishida *et al.* 2006).

Les cellules tumorales migrantes trouvent *via* ces vaisseaux sanguins une porte d'entrée dans la circulation pour coloniser d'autres organes. Durant ce processus, les cellules migrent,



rompent la lame basale et pénètrent dans les vaisseaux sanguins par intravasation. Les cellules cancéreuses adhèrent ensuite à la paroi endothéliale puis s'échappent de la circulation par extravasation, pour faire le cheminement inverse, gagnant ainsi un nouvel organe pour proliférer et former une tumeur secondaire (Klein 2008). Ce processus est nommé la cascade métastatique (**Figure 6**).



**Figure 6 : La cascade métastatique.** Deux modèles ont été mis en évidence durant le processus métastatique. Le modèle de dissémination tardive durant lequel les cellules s'échappent après la formation de la tumeur primaire. Le modèle de dissémination précoce, quant à lui, consiste en l'échappement des cellules tumorales lors de leur transformation en cellules cancéreuses. (Klein 2008). Dans le cas du cancer du sein, il a été décrit plusieurs sites de métastases préférentiels : l'os, les poumons, le foie, le cerveau (Patanaphan *et al.* 1988, Pantel et Brakenhoff 2004).

### 3. Épidémiologie du cancer du sein

#### a. Incidence et mortalité

En 2018, chez la femme, le cancer du sein représentait le cancer le plus fréquent et le plus mortel en France d'après les chiffres de l'Institut National du Cancer (INCa), devant les cancers pulmonaires et colorectaux. Cette même année, il a été diagnostiqué 58 500 nouveaux cas avec un âge médian lors du diagnostic de 63 ans. Ce taux d'incidence, pour la période allant de 1990 à 2018 a doublé, passant de près de 30 000 nouveaux cas annuels en 1990 à plus de 58 000 nouveaux cas en 2018, soit une augmentation de l'incidence de 1,1 % chaque année. De plus,

toujours en 2018, 14 % des décès par cancers chez les femmes (8 % des décès par cancers tous sexes confondus) concernaient des cancers du sein avec 12 146 décès pour cette seule année (âge médian du décès = 74 ans). La baisse de la mortalité durant cette période (1990 – 2018) pourrait être liée à une meilleure prise en charge thérapeutique de la maladie et des campagnes de dépistage précoce.

#### b. Facteurs de risque

Malgré une méconnaissance de l'étiologie du cancer du sein d'un point de vue moléculaire, plusieurs facteurs de risques intrinsèques et environnementaux ont été identifiés comme favorisant le développement et la progression du cancer du sein. On retrouve parmi ces acteurs (Sun *et al.* 2017) :

- Certaines anomalies génétiques existantes : C'est le cas par exemple des gènes BRCA1 et 2 (*Breast Cancer 1/2*) qui confèrent à la femme porteuse un risque plus élevé de développer un cancer du sein et de façon plus précoce.
- L'âge : Le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge. Très peu de cancers surviennent avant 40 ans, tandis que l'incidence est maximale à partir de 65 ans.
- L'exposition aux œstrogènes : Hormones centrales dans le développement de la glande mammaire, les œstrogènes ont également été découverts comme principales hormones associées au développement du cancer du sein.
  - o Des menstruations précoces ou une ménopause tardive ont été rapportées comme facteurs de risque du cancer du sein.
  - o Les contraceptifs œstroprogestatifs oraux et les traitements hormonaux substitutifs post-ménopausiques accroissent le risque de développer un cancer du sein.
- Facteurs liés au mode de vie : la consommation d'alcool et de tabac, la nutrition et l'absence d'activité physique sont autant de facteurs impliqués dans l'augmentation du risque de développement du cancer du sein.

#### c. Classification des cancers du sein

##### i. Classification TNM

Système international de classification des tumeurs, l'acronyme TNM symbolise la propagation du cancer de la tumeur primitive (T), aux ganglions lymphatiques proches (N) et à distance

dans le cas de la formation de métastases (M). Chaque lettre est associée à un coefficient permettant la classification des cancers (Cserni *et al.* 2018, Sawaki *et al.* 2019) :

- T (pour *Tumor*) : Suivie d'un coefficient allant de 0 à 4, cette lettre décrit la taille de la tumeur ainsi que son éventuelle atteinte des tissus entourant la glande mammaire.
- N (pour *Node*, ganglion) : Allant de N0 à N3. N0 indique l'absence d'invasion ganglionnaire. N1 représentent respectivement l'envahissement de 1 à 3 ganglions lymphatiques. Le stade N2 indique l'envahissement de 4 à 9 ganglions, tandis que N3 représentent une atteinte de plus de 10 ganglions.
- M (pour Métastases) : Suivie de 0 ou 1 ; M fait référence à l'absence (0) ou la présence de métastases à distance (1).

#### *ii. Classification selon le grade histologique*

Il existe deux types de classifications histologiques : le grade Elston et Ellis et le grade de Scarff Bloom et Richardson (Howell *et al.* 1994, Stein 2007). Ces classifications permettent d'évaluer le taux de différenciation en évaluant et additionnant trois critères morphologiques : l'architecture tissulaire, les atypies cytonucléaires ainsi que la fréquence mitotique. On distingue 3 grades :

- Le grade 1 ou bas grade dans lequel sont classés les cancers dont les tissus présentent encore une différenciation
- Le grade 2 ou modéré
- Le grade 3 ou haut grade au cours duquel on observe une perte complète de la différenciation.

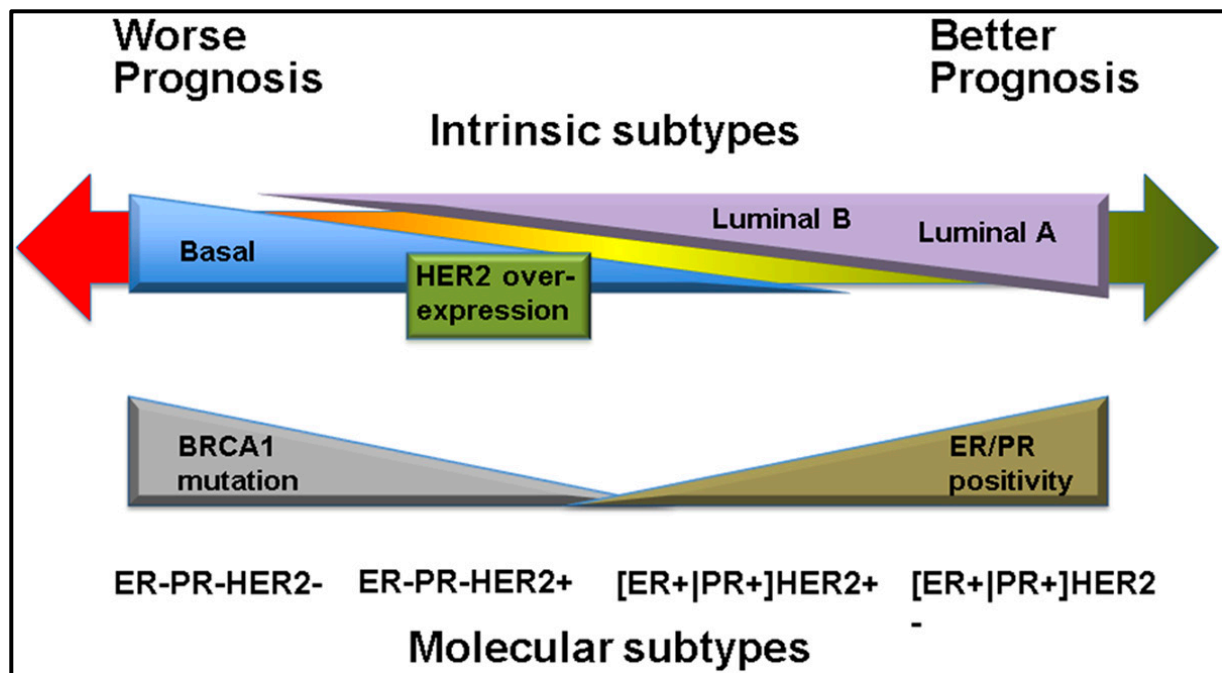
#### *iii. Classification moléculaire*

Une nouvelle classification, dite moléculaire, plus précise des cancers du sein s'est développée avec l'apparition de techniques de génomique avancée (*microarrays* et *gene expression profiling*) (Perou *et al.* 1999). Cette classification repose sur des caractéristiques tant tumorales que cellulaires (Eliyatkin *et al.* 2015, Al-Thoubaity 2020): le grade de la tumeur, le type cellulaire et histologique, l'atteinte ganglionnaire et la présence de marqueurs tumoraux spécifiques comme le récepteur aux œstrogènes (ER pour *Estrogen receptor*), le récepteur à la progestérone (PR pour *Progesterone Receptor*) ou le récepteur pour les facteurs de croissance épidermique HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*). Depuis la mise au point et l'avancée de cette classification, quatre types moléculaires de cancers du sein ont été identifiés (**Figure 7**) (Dai *et al.* 2015, Al-Thoubaity 2020) :

- Le phénotype luminal : Les tumeurs de type luminal, exprimant les récepteurs hormonaux ER et PR (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>) et présentant un profil d'expression génique rappelant la composante épithéliale luminale du sein, sont les tumeurs les plus courantes dans le cancer du sein. Deux sous-types ont été mis en évidence : (a) le sous-type luminal A (majoritaire) et (b) le sous-type luminal B. Le sous-type luminal A est caractérisé par une surexpression de ER et PR (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>) associée à une absence de surexpression de HER2 (HER2<sup>-</sup>). *A contrario*, le sous-type luminal B représente les tumeurs surexprimant les trois marqueurs ER, PR et HER2 (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>). Il est également à noter que les cellules cancéreuses lumineales A présentent une expression plus élevée des gènes liés au ER, un indice prolifératif, ainsi qu'un grade moins élevé que les cellules cancéreuses de sous-type luminal B. En général, les tumeurs lumineales A présentent un pronostic favorable, tandis que les tumeurs lumineales B ont un pronostic plus sombre que le type A. La réponse au traitement diffère selon le sous-type luminal. Selon un score de récurrence, qui résulte d'un modèle prédictif de l'expression de 16 gènes (la moitié d'entre eux étant des gènes liés au ER et à la prolifération cellulaire), les tumeurs présentant un score de récurrence faible sont de type luminal A tandis que celles ayant des scores de récurrence élevés sont catégorisées B. Ainsi, les tumeurs lumineales A, peu sensibles à la chimiothérapie, pourraient être traitées efficacement par une thérapie anti-hormonale, tandis que les tumeurs lumineales B, plus prolifératives, pourraient davantage bénéficier de la stratégie thérapeutique associant la chimiothérapie et un traitement anti-hormonal. D'autres approches, telles que la thérapie ciblée, ont été suggérées comme étant efficaces pour les tumeurs lumineales. Par exemple, il a été démontré, dans une cohorte comprenant 60 % de patientes ayant un cancer de type luminal, qu'une stratégie d'inhibition de la néo-angiogenèse par l'anticorps monoclonal anti-VEGF, le bevacizumab, améliore le pronostic et la survie du cancer du sein métastatique lorsqu'il est associé au paclitaxel (un agent chimiothérapeutique) (Tran et Bedard 2011, Gao et Swain 2018).
- Les cancers du sein exprimant HER2 (HER2<sup>+</sup>) : Ces cancers font référence aux cellules cancéreuses mammaires présentant une forte surexpression du seul marqueur HER2, identifiées par *microarray* et dont le phénotype est : ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>. Cependant, les tumeurs classées par ces deux systèmes ne sont pas équivalentes entre elles. En effet, toutes les tumeurs définies HER2<sup>+</sup> cliniquement parlant ne présentent pas de changements de HER2 au niveau transcriptionnel. Les tumeurs surexprimant HER2

peuvent également être caractérisées par la surexpression d'autres gènes tels que GRB7 (*Growth factor Receptor-Bound protein 7*) et PGAP3 (*Post-GPI Attachment to Proteins 3*). De plus, il a été rapporté que plus de la moitié de ces tumeurs héberge la mutation TP53 (*Tumor Protein 53* codant pour la protéine P53). Les tumeurs de surexpression de HER2 sont plus susceptibles d'être de grade 3. Bien que ce type de cancer ait longtemps été associé à un pronostic défavorable, les cellules cancéreuses HER2<sup>+</sup> sont sensibles à la chimiothérapie néo-adjuvante et répondent aux thérapies ciblées utilisant le trastuzumab (anticorps monoclonal anti-HER2). Le mauvais pronostic de ce type moléculaire semble provenir d'un risque de récurrence précoce chez les patients présentant une éradication incomplète des cellules cancéreuses après traitement (Engel et Kaklamani 2007).

- Le phénotype basal : Le sous-type basal, connu également sous le nom de cancer triple négatif et représentant 60 à 90 % des cancers triple négatifs. Il est caractérisé par des cellules cancéreuses n'exprimant pas, pour la majorité, ER, PR ou HER2 (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>) et présentant des profils d'expression génique imitant ceux des cellules épithéliales localisées dans d'autres régions de l'organisme. Les cellules cancéreuses basales sont également connues pour être les cellules les plus susceptibles d'abriter une mutation du gène TP53. Compte tenu de leur statut triple négatif, les tumeurs basales ne répondent pas à l'hormonothérapie ou aux thérapies ciblées, laissant la chimiothérapie comme seule option dans l'arsenal thérapeutique. Outre la chimiothérapie, de nombreuses études ont suggéré une nouvelle cible thérapeutique du fait d'un potentiel rôle de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) dans le développement de ce sous-type tumoral (Toft et Cryns 2011, Aysola *et al.* 2013).
- Le phénotype triple négatif : Les cancers triple négatifs n'expriment pas ER, PR et HER2 (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>) et représentent environ 15 % des cancers du sein diagnostiqués. Bien que la majorité des cancers triple négatifs font partie du phénotype basal, certains présentent toutefois une signature dans leur expression génique particulière comme par exemple une faible expression de la claudine (Foulkes *et al.* 2010).



**Figure 7 :** Classification des sous-types moléculaires de cancer du sein associé au pronostic. (Dai *et al.* 2015)

#### d. Traitements thérapeutiques

De par son hétérogénéité dans les multiples sous-types le caractérisant, le cancer du sein est la cible de traitements divers et propres à chacun des sous types (Maughan *et al.* 2010) :

- La chirurgie : L'ablation chirurgicale de la tumeur est le traitement de première intention et a pour intention de retirer les tissus cancéreux. Deux types d'actes chirurgicaux sont possibles : (a) la chirurgie conservatrice (ou tumorectomie) consistant à enlever la masse tumorale en préservant la glande mammaire et (b) la mastectomie qui consiste à retirer l'ensemble du tissu mammaire. En cas d'infiltration de la tumeur, des étapes, allant de l'exérèse du ganglion sentinelle (ablation des premiers ganglions les plus proches de la tumeur) au curage ganglionnaire au niveau axillaire, peuvent être nécessaires. De plus, la chirurgie est souvent associée à des traitements systémiques comme la chimiothérapie ou locaux par radiothérapie.
- La chimiothérapie : Non proposée de façon systématique aux patientes, la chimiothérapie est un traitement lourd faisant appel à des molécules hautement cytotoxiques ciblant la division cellulaire. La chimiothérapie peut être qualifiée de néo-adjuvante lorsqu'elle a pour but de diminuer la taille de la tumeur avant la chirurgie, ou d'adjuvante lorsqu'elle est proposée après la chirurgie chez les patientes présentant un risque de récurrence important.

- La radiothérapie : Elle consiste à diriger de façon locale des radiations (rayons X à haute énergie) sur la zone tumorale dans le but de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant du mieux possible les tissus et organes sains adjacents.
- L'hormonothérapie : Exclusivement réservée aux patientes présentant un cancer du sein hormonosensible, l'hormonothérapie consiste à contrecarrer l'action stimulante des hormones sexuelles féminines sur les cellules cancéreuses mammaires. Deux types d'hormonothérapies peuvent être proposées : (a) l'hormonothérapie médicamenteuse agissant de façon systémique et (b) l'hormonothérapie non médicamenteuse consistant à empêcher la production d'œstrogènes *via* une ovariectomie ou une radiothérapie.
- La thérapie ciblée : Intervenant en association avec la chimiothérapie et/ou la radiothérapie, ce traitement repose sur le ciblage spécifique d'une protéine exprimée fortement à la surface des cellules cancéreuses afin d'empêcher leur multiplication. La thérapie ciblée peut également cibler la formation de vaisseaux sanguins nourrissant les cellules cancéreuses.

## PARTIE 2 : MIGRATION CELLULAIRE

### 1. Introduction

Durant le développement de l'organisme et plus particulièrement durant l'embryogenèse, le processus de migration cellulaire permet d'organiser les tissus et les organes. De façon générale, les cellules migrent de manière collective durant la gastrulation permettant ainsi de former les trois feuilletts embryonnaires. Durant cette phase de développement, certaines cellules, comme par exemple les cellules germinales primordiales responsables de la formation des gonades, présentent également un phénotype migratoire à la différence près que ces cellules migrent de façon isolée. De plus, afin de former le réseau neuronal ou le système musculaire, certaines cellules de la crête neurale acquièrent des propriétés migratoires remarquables, lors de la fermeture de la crête neurale, afin de se disséminer en profondeur dans l'embryon et se différencier en neurones et myoblastes par exemple (Kurosaka et Kashina 2008).

La migration cellulaire est également un processus cellulaire primordial au maintien de l'intégrité de l'organisme. C'est le cas par exemple de l'inflammation, l'immunité ou encore la cicatrisation par exemple qui présente au sein de leur système des cellules dotées d'une capacité de migration extrêmement élevée. La migration cellulaire est donc un fondement essentiel pour les processus d'immunité et d'homéostasie. Ainsi, la moindre dérégulation des mécanismes de régulation de la migration cellulaire est néfaste pour l'organisme, par l'apparition de pathologies sévères et souvent fatales (immunodépression, défaut de cicatrisation, retards physiques et mentaux, mort précoce de l'embryon ... etc.) (Kurosaka et Kashina 2008).

### 2. Mécanismes généraux

#### a. Migration cellulaire individuelle : exemple de la migration mésenchymateuse

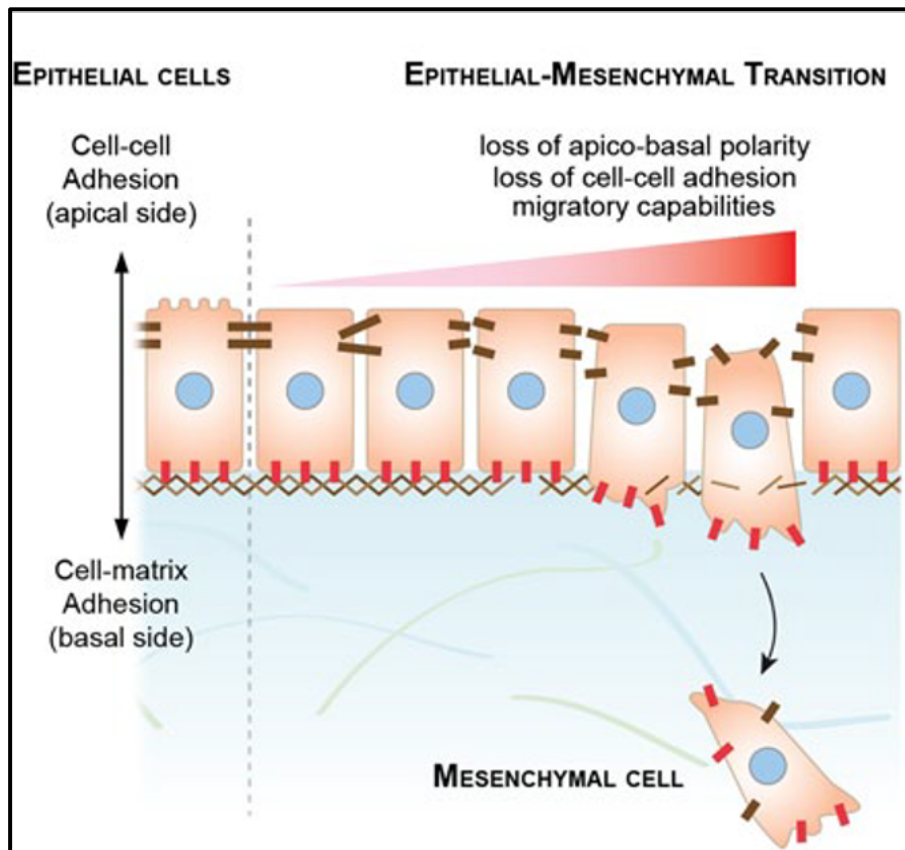
Se référant à la migration des cellules mésenchymateuses, telles que les fibroblastes, la migration dite mésenchymateuse constitue le mode de migration cellulaire le plus commun dans l'organisme adulte. D'un point de vue descriptif, une cellule adoptant un mode de migration mésenchymateux présente une forme allongée et polarisée lui permettant de se déplacer de façon unitaire *via* des interactions entre les molécules d'adhésion, présentes à la membrane plasmique, et la matrice extracellulaire (MEC) (Zamir *et al.* 2000, Piacentino *et al.* 2020). De plus, ce mode de migration, obtenu après le processus de TEM permet à la cellule d'acquérir une faculté supplémentaire consistant en la dégradation des tissus par l'intermédiaire de la sécrétion de protéases au front de migration : c'est l'invasion cellulaire (Non détaillée dans ce travail) (Son et Moon 2010).



D'un point de vue fonctionnel, les cellules mésenchymateuses et les cellules adoptant un mode de migration mésenchymateux migrent grâce à des étirements de leur membrane plasmique liés à une polymérisation intensive des filaments d'actine au front de migration. Ces étirements de la membrane plasmique sont nommés pseudopodes ou lamellipodes, pour une migration effectuée dans un environnement en trois dimensions ou sur une surface en deux dimensions respectivement (Condeelis 1993, Farooqui et Fenteany 2005, Innocenti 2018). Au front de ces projections cytoplasmiques, un autre type d'extensions cytoplasmiques peut être observé : les filopodes qui peuvent avoir d'autres rôles comme la perception du microenvironnement ou encore la formation d'interactions cellule – cellule (Friedl et Wolf 2010).

Afin d'acquérir une migration cellulaire directionnelle, les cellules doivent intrinsèquement être capables de se polariser, c'est-à-dire définir un avant et un arrière permettant la directionnalité du mouvement cellulaire (Rappel et Edelstein-Keshet 2017). D'un point de vue mécanique, la migration mésenchymateuse est modulée par un cycle d'étapes coordonnées se répétant dans le temps. Ce mécanisme débute par une déformation de la membrane plasmique qui se profile dans la direction du mouvement pour s'étendre et former le lamellipode. Par la suite, le lamellipode s'attache au substrat (la MEC, ou une matrice de collagène *in vitro* par exemple) via la formation de complexes d'adhésion focaux. Enfin, le détachement des points d'adhésion focaux présents à l'arrière de la cellule ainsi qu'une contraction du système d'actomyosine permet à la cellule de se rétracter pour avancer. Ainsi, plusieurs modifications intracellulaires doivent être opérées afin de permettre à la cellule de migrer, à commencer par une modification de l'architecture du cytosquelette associée à une modification de la morphologie cellulaire (Rappel et Edelstein-Keshet 2017). Les processus moléculaires sous-jacents à ces modifications de l'architecture cellulaires seront détaillés extensivement par la suite.

Durant l'apparition de pathologies et plus particulièrement les cancers, certaines cellules cancéreuses acquièrent des capacités migratoires aberrantes. En effet, les cellules cancéreuses, originellement non migratoires, réactivent les processus responsables de la migration cellulaire. Ainsi, les cellules épithéliales sont modifiées par TEM (processus clé dans la progression et la dissémination tumorale), s'individualisent pour présenter un phénotype mésenchymateux leur permettant d'envahir les tissus environnants dans un but métastatique (**Figure 8**). Lors de cet événement (TEM), il a été montré une dérégulation de l'expression et de l'activité de diverses protéines, généralement les protéines du cytosquelette et leurs régulateurs (Roche 2018).



**Figure 8 :** Rôle de la transition épithélio-mésenchymateuses dans la migration cellulaire. Les cellules subissant la TEM perdent leur polarité apico-basale et les adhésions entre les cellules, et acquièrent des capacités migratoires élevées. (Theveneau et Mayor 2013)

## b. Autres types de migration

### i. La migration collective

La migration collective de cellules a été observée durant plusieurs étapes développementales et physiologiques comme par exemple lors de la délamination de la crête neurale, l'organogenèse, la réparation tissulaire mais également durant la progression tumorale (formation des métastases). Physiologiquement, la migration collective garantit le transport de cellules incapables de migrer ou une distribution cellulaire optimale nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire par exemple (Rorth 2009).

D'un point de vue mécanique, l'efficacité de la migration collective repose sur l'association des cellules en une entité unique par une cohésion tant physiques (*via* les cadhérines) que physiologiques (par une organisation fonctionnelle complexe) (**Figure 9**). En effet, il a été montré que la migration collective s'effectue de manière polarisée avec à leur tête des cellules

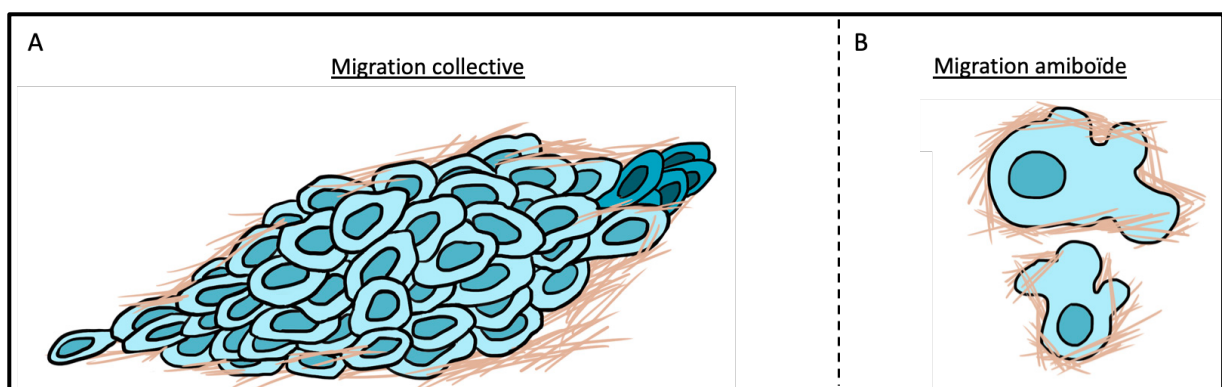
qualifiées de « meneuses » (propriétés adhésives extrêmement élevées) qui tractent les cellules « suiveuses » (Rorth 2009).

### *ii. La migration amiboïde*

La migration amiboïde est un processus migratoire complexe impliquant des cellules de morphologie arrondie et présentant une contractilité cellulaire élevée (**Figure 9**). Ces caractéristiques cellulaires sont conférées par une protrusion cellulaire hautement spécialisée : le « bleb ». Plusieurs étapes sont nécessaires à la génération de ce dernier pour permettre à la cellule de migrer (Keller et Egli 1998, Friedl et Wolf 2010) :

- Le cortex cellulaire, composé de myosine, exerce une pression hydrostatique au niveau de la membrane plasmique conférant à la cellule sa morphologie arrondie.
- La membrane plasmique et le cortex se dissocient ponctuellement pour former une brèche.
- Le cytoplasme s'engouffre dans la brèche sous la pression exercée par le cortex pour former le « bleb ».
- Le cortex se reforme pour générer un nouveau cycle.

Durant ce type de migration cellulaire, la cellule ne nécessite qu'une faible interaction avec le substrat pour se mouvoir. En effet, la cellule subit des déformations continues lui permettant de se faufiler à travers les protéines composant la MEC sans adhérer au substrat, et d'avancer à très haute vitesse (Friedl *et al.* 1998).



**Figure 9 : Modes de migration cellulaire.** A. La migration collective est caractérisée par le déplacement d'une entité, composée de plusieurs cellules, menées par un groupe de cellules « meneuses » en tête de groupe (cellules foncées). B. La migration amiboïde implique une

capacité de modifications morphologiques élevée permettant à la cellule de se faufiler à travers les mailles de la MEC. Modifié à partir de (Lintz *et al.* 2017)

### 3. Le cytosquelette : Focus sur les filaments d'actine

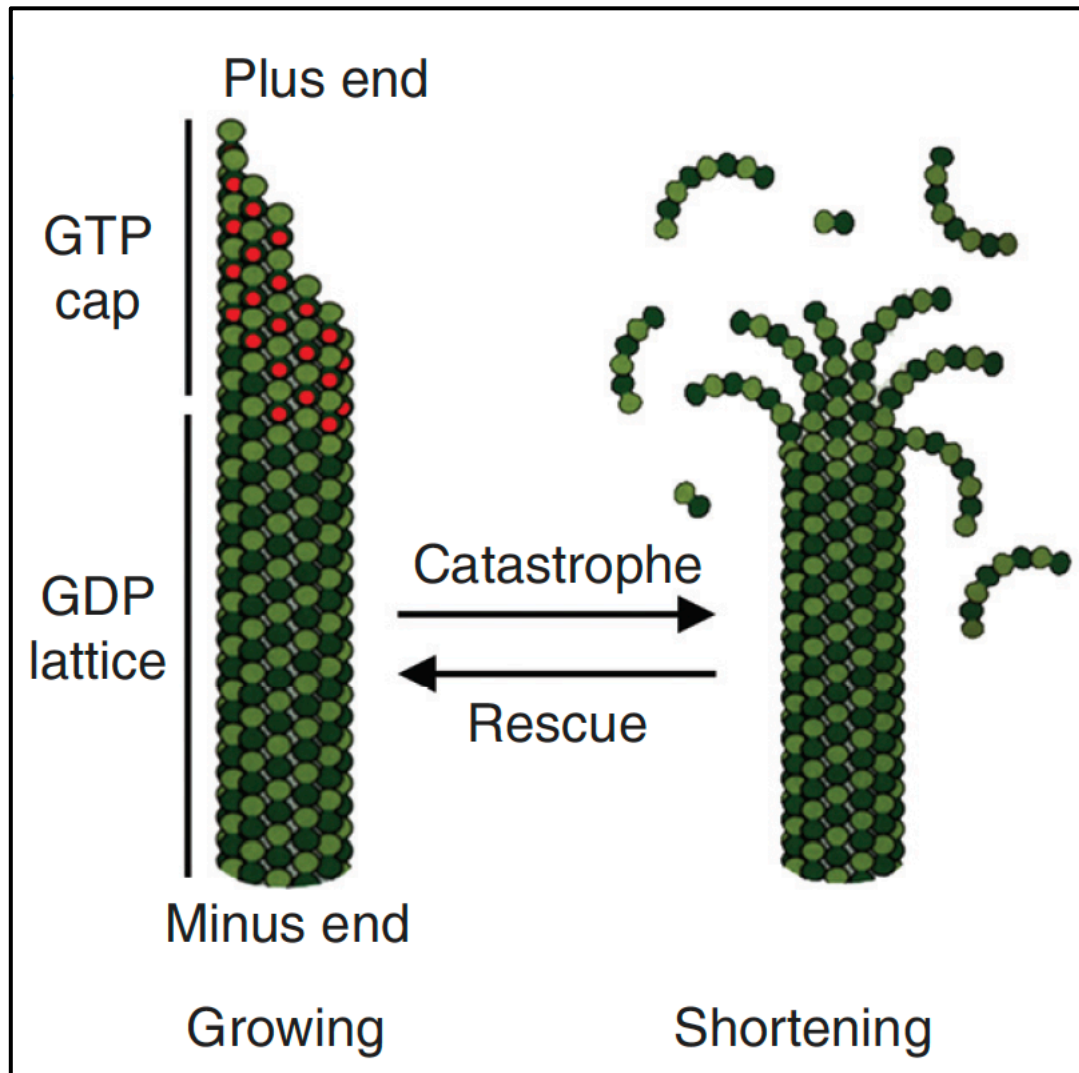
Le cytosquelette est défini comme un réseau intracellulaire organisé de l'agencement de trois grands groupes de macromolécules (les filaments d'actine, les filaments intermédiaires ainsi que les microtubules) conférant à la cellule une architecture propre (Weber et Osborn 1982). Cette architecture permet de maintenir et de réguler la morphologie cellulaire, de même que la mécanique de la cellule. Ainsi, le cytosquelette supporte l'organisation cellulaire et le maintien tissulaire en supportant plusieurs processus biologiques, en participant aux processus mitotiques, au trafic intracellulaire mais également à la contraction cellulaire et la formation de protrusions cellulaires essentielles à la migration des cellules (Fletcher et Mullins 2010).

#### a. Microtubules et filaments intermédiaires

Comme énoncé précédemment, le cytosquelette des cellules eucaryotes est composé de 3 classes de protéines filamentaires : l'actine (que nous étudierons au cours d'une autre partie), les microtubules et les filaments intermédiaires (Tang et Gerlach 2017, Rodat-Despoix *et al.* 2021).

Premièrement, les microtubules sont les protéines du cytosquelette les plus larges présentant un diamètre de 25 nanomètres (nm). Ils sont composés de tubuline, protéine de 50 kilodaltons (kDa) organisée en dimères. La tubuline est structurellement formée d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  (Mitchison et Kirschner 1984). La dimérisation de la tubuline permet l'association de 13 dimères (appelés protofilaments) afin de former le microtubule (Desai et Mitchison 1997). Ce processus est dynamique par ses cycles de polymérisation/dépolymérisation, et est dépendent de guanosine triphosphate (GTP) et guanosine diphosphate (GDP) (**Figure 10**). En effet, la liaison d'une molécule de GTP sur l'extrémité du microtubule permet la polymérisation. A l'inverse, l'hydrolyse de GTP entraîne la dépolymérisation du microtubule. D'autres molécules interagissant avec le microtubule, telles que les dynéines et les kinésines (filaments intermédiaires), ou encore les MAP (*Microtubule-Associated Protein*) sont nécessaires à sa stabilité (Vale *et al.* 1985, Goldstein 1991). Lorsque la polymérisation et la stabilité du microtubule sont complètes et qu'il est associé au cytosquelette d'actomyosine, le microtubule formé exerce son effet physiologique : maintien de la morphologie cellulaire (Lyle *et al.* 2012), participation au cycle cellulaire (Gonczy *et al.* 1999), transport polarisé des

vésicules (Schmoranzner *et al.* 2003), et participation à la motilité cellulaire (Kikuchi et Takahashi 2008).



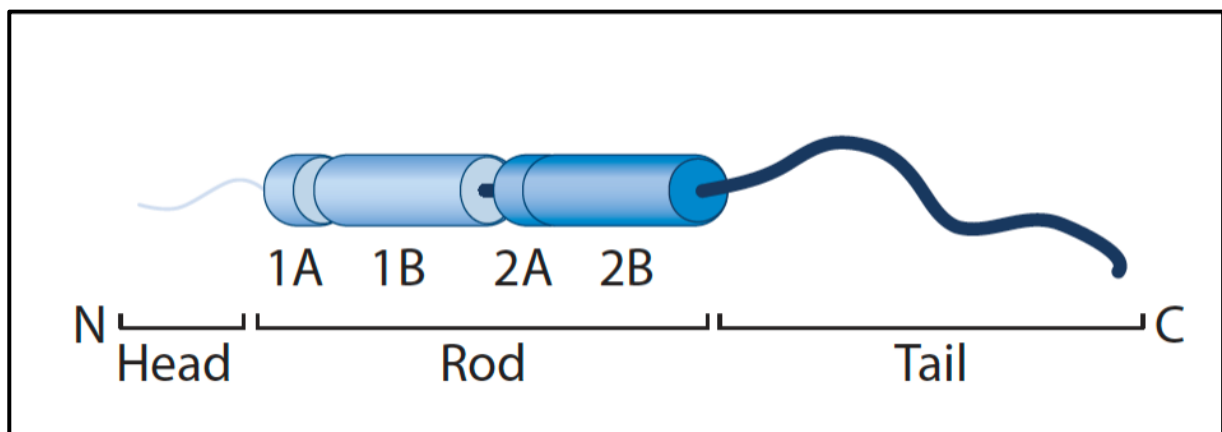
**Figure 10 : Dynamique d'assemblage des microtubules.** La présence de GTP assure au niveau de l'extrémité « plus » la polymérisation. A l'inverse, la perte de GTP entraîne la dislocation du microtubule connue sous le nom de catastrophe. (Goodson et Jonasson 2018)

Enfin, les filaments intermédiaires (d'un diamètre allant de 8 à 12 nm) sont une grande famille protéique comportant 6 sous-types, composés de différentes sous unités, parmi lesquelles : la vimentine, la kératine, la desmine, les lamines, ainsi que les neurofilaments (Herrmann et Aebi 2004, Szeverenyi *et al.* 2008, Leduc et Etienne-Manneville 2015). Ils confèrent, par association aux microtubules, un support à ces derniers et augmentent la stabilité du cytosquelette

nécessaire au maintien de la morphologie cellulaire. Les filaments intermédiaires présentent également la caractéristique d'être les protéines du cytosquelette les moins dynamiques dues à leur solidité (**Figure 11**) (Fletcher et Mullins 2010). L'ensemble des cellules d'un organisme expriment des filaments intermédiaires. En revanche, les sous-unités formant la protéine finale diffèrent, de même que la nature de celle-ci, en fonction du type cellulaire. Par exemple :

- Les neurofilaments sont exprimés spécifiquement dans les axones des neurones (Hoffman *et al.* 1987).
- Les filaments de desmine sont retrouvés pour la majorité dans les cellules musculaires et les kératines au niveau épithélial (Szeverenyi *et al.* 2008).
- Les lamines sont exprimées de façon ubiquitaire et permettent de renforcer la stabilité de l'enveloppe nucléaire, et donc la structure du noyau cellulaire, grâce à son maillage resserré (Lin et Worman 1997).
- La vimentine est principalement exprimée dans les cellules mésenchymateuses (Ivaska 2011).

Bien que leur rôle majeur soit mécanique, les filaments intermédiaires peuvent également acquérir une fonction moléculaire comme la participation dans les processus cellulaires migratoires. C'est le cas de la vimentine qui est reconnue comme un acteur central dans la migration des cellules cancéreuses mammaires, particulièrement lorsque celles-ci acquièrent un phénotype mésenchymateux, *via* le phénomène de TEM. En outre, il lui a été décrit un rôle dans la stabilité de la protéine FAK *via* l'activation de la voie de signalisation Rac1 dans le cancer pulmonaire.



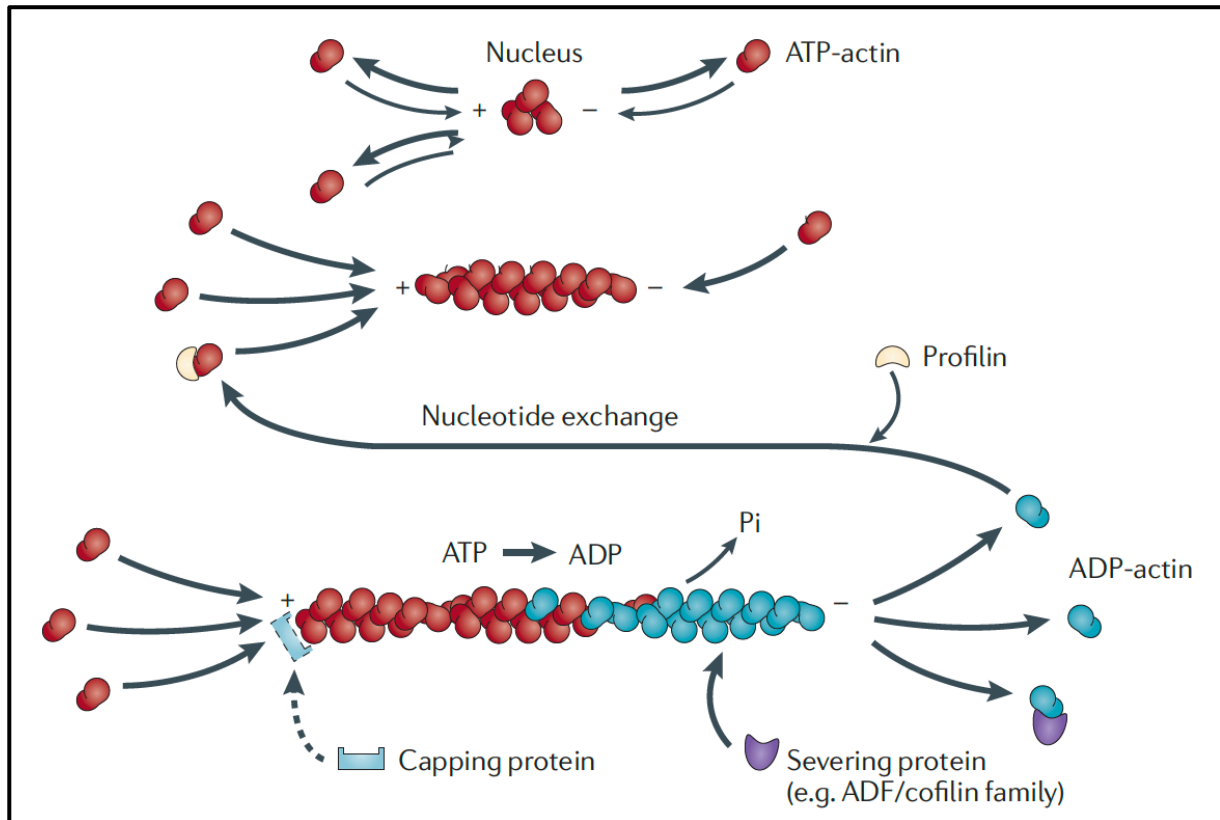
**Figure 11 : Structure schématique des filaments intermédiaires.** (Etienne-Manneville 2018)

b. Dynamique de l'actine

Protéine centrale du cytosquelette, l'actine est une protéine globulaire monomérique de 42 kDa et de faible diamètre (40 nm), et se liant à l'adénosine triphosphate (ATP) ou l'adénosine diphosphate (ADP). Abondante dans l'ensemble des cellules de l'organisme, l'actine a été mise en évidence dans les cellules musculaires squelettiques, où elle s'associe avec la myosine pour permettre la contraction musculaire. Dans les autres types cellulaires, l'actine apparaît moins organisée et la myosine nettement moins exprimée. Chez les vertébrés, l'actine nommée actine-G, est hautement conservée au cours de l'évolution et se décline en 3 isoformes :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Depuis des décennies, la recherche s'est concentrée sur l'étude structurale de l'actine mais également de son étude fonctionnelle (Holmes *et al.* 1990, Herman 1993, Bugyi et Carlier 2010).

Il est établi que l'actine agit dans de nombreux processus cellulaires *via* les interactions qu'elle élabore. Ces interactions ont lieu seulement lorsque l'actine vient à former des filaments. Ainsi formée, l'actine est appelée actine-F (Chou et Pollard 2019). Ces filaments d'actine-F sont le résultat d'une polymérisation de l'actine, connue pour se produire rapidement *in vitro* lorsque les paramètres cellulaires physiologiques sont réunis. En revanche, l'initiation même de cette polymérisation est un phénomène lent, imputable à la faible affinité entre les monomères d'actine et à une instabilité des dimères d'actine formés (Wegner et Isenberg 1983). L'addition d'un troisième monomère permet de révéler un noyau trimérique stable, réaction nommée nucléation enclenchant ainsi l'élongation du filament d'actine (Pring *et al.* 2003). Lors de leur polymérisation, les filaments d'actine se polarisent. L'élongation du filament est permise par une association entre une molécule d'actine-G et une molécule d'ATP se polymérisant à l'extrémité barbée (+) du filament d'actine formé. Par ailleurs, la polymérisation de l'actine s'effectue par un mécanisme de type « tapis roulant » ou encore « *treadmilling* ». En effet, l'ajout d'un complexe actine-G/ATP sur l'extrémité barbée est compensé par la dissociation du complexe actine-G/ADP de l'extrémité pointue (-) suite à l'hydrolyse de l'ATP. Ainsi, le filament d'actine s'allonge lorsque la vitesse de polymérisation à l'extrémité barbée est plus élevée que la vitesse de dépolymérisation de l'actine à l'extrémité opposée (**Figure 12**) (Pollard *et al.* 2000). De plus, cette dynamique de l'actine est potentialisée par l'association de protéines partenaires (la myosine (Makowska *et al.* 2015), la gelsoline (Fujita *et al.* 1997), la profiline (Pollard et Cooper 1984), l' $\alpha$ -actinine (Honda *et al.* 1998), les protéines de coiffe (Isenberg *et al.* 1980) ou encore la cofiline (Rogers *et al.* 2003)) permettant ainsi un fonctionnement

cellulaire optimal (**Figure 12**). De plus, les filaments d'actine peuvent s'assembler pour former des fibres de stress impliquées dans l'adhésion cellulaire (Sugawara *et al.* 2016) via les complexes d'adhésion focaux, régulant ainsi de façon importante les processus migratoires, la morphologie cellulaire et le trafic cellulaire.



**Figure 12 : La dynamique de l'actine.** La dynamique de l'actine est composée de trois étapes : la nucléation, l'élongation du filament et le recyclage des monomères d'actine G. (Nurnberg *et al.* 2011)

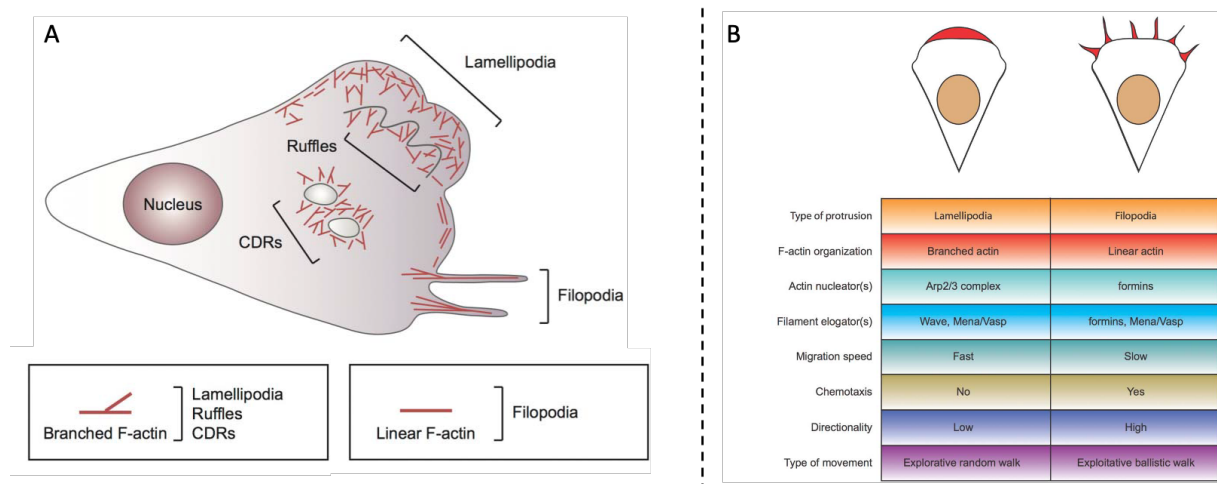
### c. Protrusions cellulaires et morphologie

D'un point de vue moléculaire, la migration cellulaire est médiée par l'action de molécules dites « chimio-attractantes », qui lors de leur fixation à leur récepteurs spécifiques, déclenchent des cascades de signalisation à l'origine de la réorganisation du cytosquelette (Mattila et Lappalainen 2008). C'est la mise en place de la polarité cellulaire. Cette succession d'évènements entraîne la mise en place de protrusions cellulaires, suite au remaniement du cytosquelette d'actine. Les filaments d'actine polymérisés à l'avant de la cellule s'ancrent au



substrat *via* les complexes d'adhésion focaux (adhésion cellulaire) tandis que la contraction des filaments actiniques et la rupture d'ancrage des points d'adhésion focaux à l'arrière permet la rétraction de la cellule (Sheetz *et al.* 1999). Quatre types de protrusions cellulaires hautement spécialisées sont observées dans la cellule :

- Les podosomes et invadopodes, impliqués dans les processus d'invasion cellulaires (Augoff *et al.* 2020).
- Les lamellipodes et filopodes sont, quant à eux, responsables de la migration cellulaire (**Figure 13**).
  - Les lamellipodes pilotent la motilité cellulaire en coordonnant les forces adhésives par l'ancrage des points d'adhésion focaux. Au sein de cette structure, l'actine est hautement polymérisée à son extrémité barbée, permettant la conduite de la migration des cellules avec l'assistance de protéines partenaires (la myosine II, le complexe Arp2/3, les formines, la profiline, l' $\alpha$ -actinine) (Sheetz *et al.* 1999, Innocenti 2018).
  - Les filopodes sont des structures très fines, formées au front de migration par la polymérisation des filaments d'actine. Contrairement aux lamellipodes, les filaments d'actine sont polymérisés par le mécanisme de type « tapis roulant » que nous avons évoqué précédemment (Mattila et Lappalainen 2008).



**Figure 13 : Protrusions cellulaires : les lamellipodes et filopodes.** A. Structure schématique du réarrangement de l'actine dans la formation des lamellipodes et filopodes. B. Caractéristiques moléculaires propres aux lamellipodes et filopodes. Modifié à partir de (Innocenti 2018)

## 4. Complexes d'adhésion focaux

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les protrusions cellulaires, et plus généralement les lamellipodes, représentent des structures cellulaires hautement spécialisées dans l'adhésion cellulaire. Cette dernière est un processus cellulaire indissociable de la migration. En effet, la formation des complexes focaux permet, lors de leur activation, l'adhésion des cellules au substrat (Burrige et Chrzanowska-Wodnicka 1996). Ces formations protéiques sont constituées de plusieurs protéines partenaires qui assurent plusieurs fonctions cellulaires primordiales :

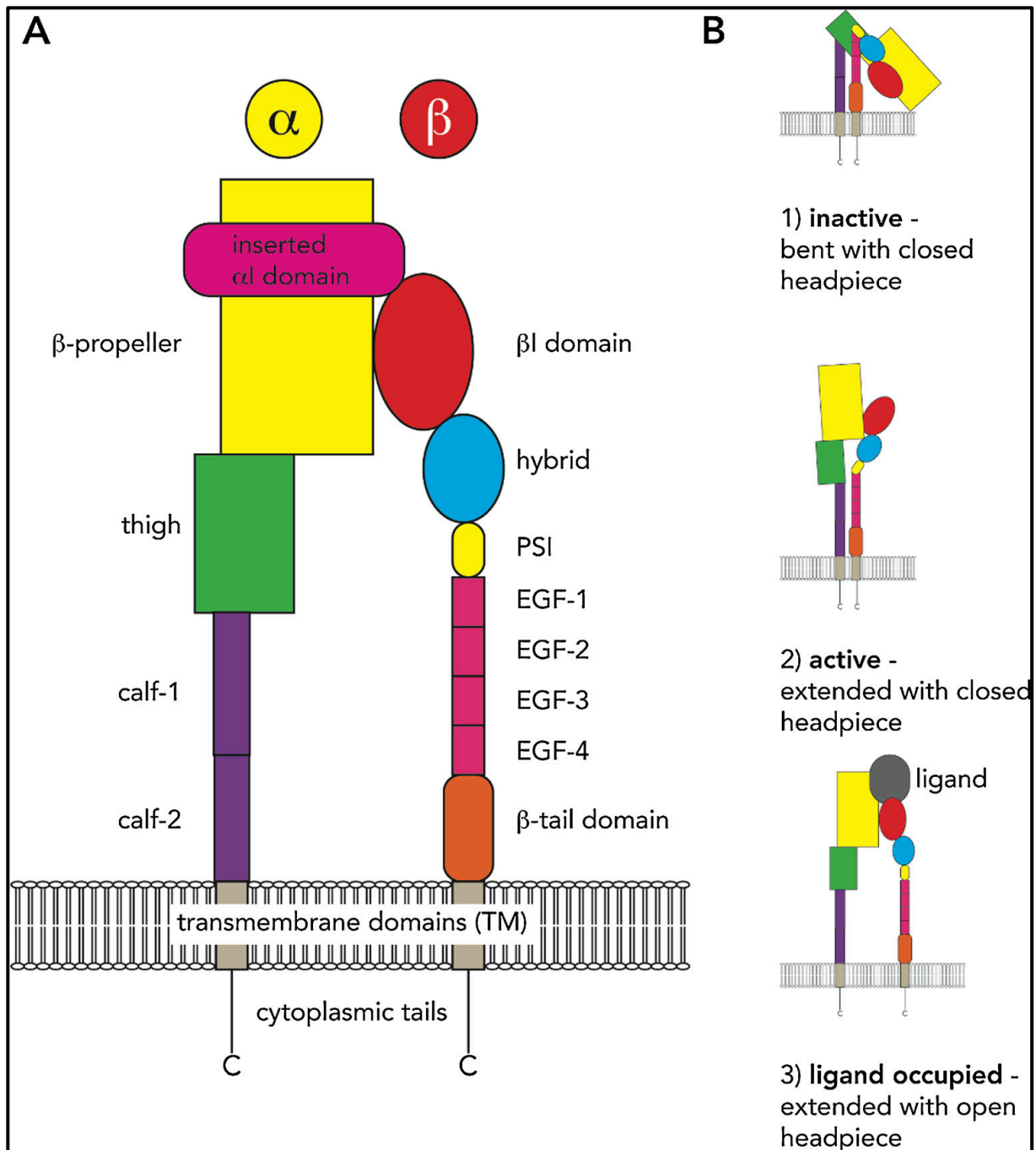
- Exécution et coordination des processus d'adhésion cellulaire.
- Transduction du signal permettant l'activation de la migration cellulaire.

### a. Formation des complexes d'adhésion focaux

#### *i. Les intégrines : Focus sur l'intégrine $\beta 1$*

Aux côtés des cadhérines et des sélectines, les intégrines font partie de l'immense famille protéique responsable des processus d'adhésion des cellules. De par leur rôle de chef d'orchestre, les intégrines s'imposent comme le socle de l'adhésion cellulaire à la MEC. Outre leur fonction adhésive, les intégrines présentent également une fonction de transduction des signaux responsables de divers événements cellulaires dépendants de la MEC : survie, différenciation et migration cellulaires (Anderson *et al.* 2014).

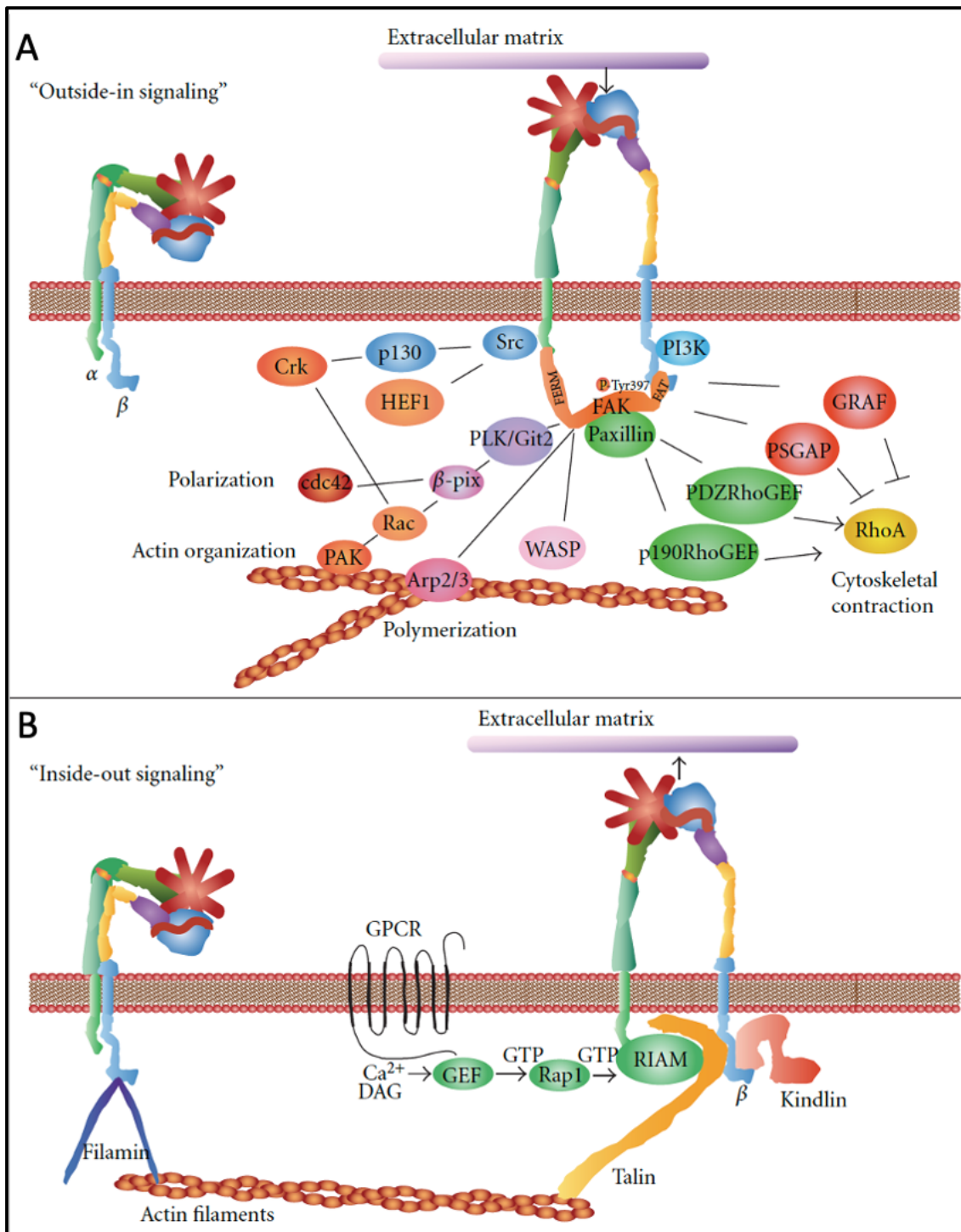
Structurellement parlant, les intégrines se présentent sous la forme d'hétérodimères composés d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$  (**Figure 14**). Chez l'être humain, il a été mis en évidence 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  permettant l'assemblage de 24 hétérodimères fonctionnels (Xiao *et al.* 2004).



**Figure 14 : Structure et mode d'activation des intégrines.** A. Structure des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  des intégrines. B. Modèle d'activation des intégrines par liaison d'un ligand (Anderson *et al.* 2014)

Exprimée à la membrane sous forme inactive, les intégrines s'activent par changement conformationnel au sein de leur domaine extracellulaire lors du recrutement et de l'interaction à des protéines intracellulaires, comme la protéine taline (activation selon le mécanisme

« *inside-out* ») (**Figure 15**) (Hynes 1992, Takagi *et al.* 2001, Vinogradova *et al.* 2002). Cette activation des intégrines favorise leur interaction aux constituants de la MEC. Un autre mécanisme d'activation des intégrines existe : « *outside-in* » (**Figure 15**) (Kim *et al.* 2003). Durant cette activation, l'association des intégrines à la MEC entraîne un regroupement des intégrines sous forme d'amas protéique favorisant le recrutement de protéines adaptatrices au domaine extracellulaire des intégrines (Arnaout *et al.* 2005, Cluzel *et al.* 2005, Chen *et al.* 2006). C'est ainsi que les points d'adhésion focaux se forment permettant ainsi l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que l'activation de processus biologiques tels que l'adhésion et la migration cellulaires ou encore l'expression de gènes cibles.



**Figure 15 : Activation des intégrines selon le mode *outside-in* et *inside-out*.** A. La liaison aux éléments de la MEC entraîne un changement conformationnel des intégrines activant la protéine FAK. L'activation *outside-in* est caractérisée par une signalisation cellulaire d'origine extracellulaire. B. L'activation selon le mode *inside-out* repose sur l'interaction de la protéine taline au domaine C-ter des intégrines. Cette activation renforce les forces d'adhésion à la MEC. Modifié à partir de (Menter et Dubois 2012)

Dans un contexte de cancer, diverses intégrines ont été mises en évidence comme participant à la progression tumorale. C'est par exemple le cas dans le mélanome, le glioblastome ainsi que les cancers du sein, de la prostate, du pancréas, de l'ovaire, du poumon, et colorectal. Lors de la progression de la maladie cancéreuse, l'intégrine  $\beta 1$  a été longuement décrite comme participant dans les mécanismes de migration cellulaire due à sa fonction primaire : la formation de complexes d'adhésion focaux entre la cellule et la MEC (Mostafavi-Pour *et al.* 2003). Il a par exemple été mis en évidence que la sous-unité  $\beta 1$  est capable de s'hétérodimériser avec différentes sous-unités  $\alpha$  (parmi lesquelles  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$  et  $\alpha 5$ ). Cette association est le fondement du processus métastatique des cellules cancéreuses mais également de la capacité des cellules cancéreuses à survivre dans leur environnement (échappement à l'apoptose) à proliférer de manière incontrôlée (Esposito et Kang 2014, Paul *et al.* 2015, Wang *et al.* 2015). Par ailleurs, l'expression des intégrines, et plus particulièrement des intégrines  $\beta 1$ , a été corrélée à un pronostic faible chez les patients dans le cancer de la prostate (Lee *et al.* 2013), le mélanome (Danen *et al.* 1994), le cancer gastrique (Matsuoka *et al.* 2000) et le cancer de l'oropharynx (carcinome à cellules squameuses) (Hong *et al.* 2014). En revanche, dans le cancer du sein, les études conduites sur le pronostic présentent des conclusions contradictoires.

L'expression et l'activité des intégrines et particulièrement des intégrines  $\beta 1$  ont été signalées dans plusieurs pathologies incluant les cancers. En effet, il est établi que les intégrines  $\beta 1$  sont surexprimées dans les cellules de tumeurs solides par rapport au cellules saines. De plus, les intégrines ont également été étudiées comme cibles thérapeutiques sur des modèles tumoraux précliniques, établissant ainsi leur potentiel et leur rôle dans la cancérogenèse. Les intégrines  $\beta 1$  et autres intégrines sont responsables de l'activation de plusieurs cascades de signalisation menant aux divers processus caractérisant les cancers (**Figure 16**) :

- Prolifération cellulaire : TP53, muté dans plus de 50 % des cancers, est le gène suppresseur de tumeurs le plus connu. Il régule la plupart des processus biologiques et plus particulièrement la prolifération cellulaire et l'apoptose (Ciriello *et al.* 2013). Depuis plusieurs années, une multitude d'études ont défini les intégrines comme régulateurs de P53. En effet, il a été montré que les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  altèrent l'activation de P53 par les agents chimiothérapeutiques (Martinkova *et al.* 2010, Janouskova *et al.* 2012, Martin *et al.* 2012). De plus, il a également été rapporté que la perte d'expression

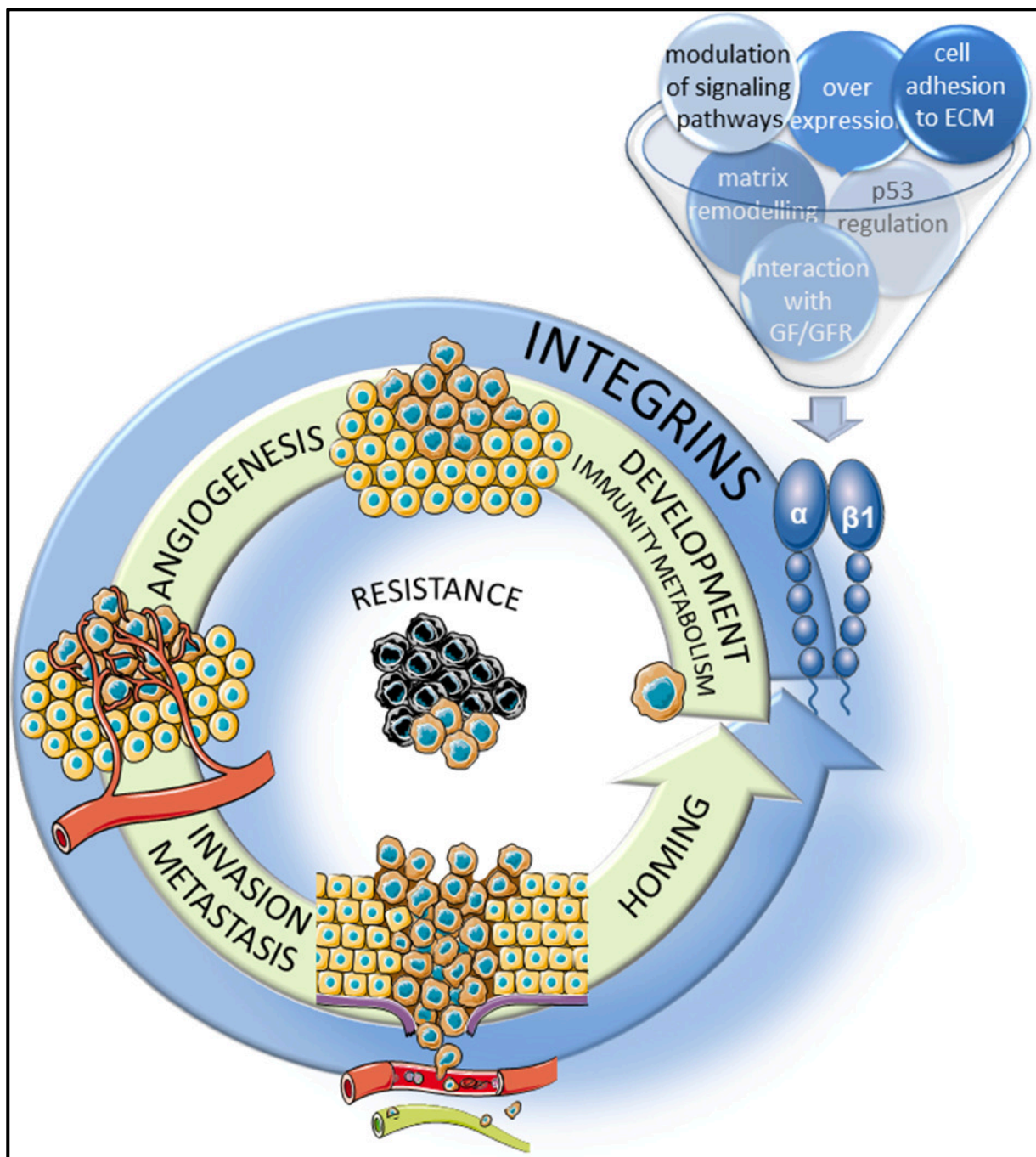
de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  est associée à une augmentation de l'expression de P53 dans les carcinomes mammaires (Morozevich *et al.* 2012).

- Résistance à l'apoptose : Les intégrines sont le point de départ d'un type d'apoptose nommée l'anoïkose (Griffiths *et al.* 2011, Vachon 2011). En effet, lors de la perte d'interaction entre les intégrines et la MEC, plusieurs voies de signalisation mènent à la mort de la cellule. L'apparition d'une résistance à l'anoïkose a été corrélée à une modification dans l'expression et la fonctionnalité des intégrines. Par exemple, dans les cellules de mélanome, il a été découvert que TIMP1 (membre des TIMP) forme un complexe avec les intégrines  $\beta 1$  et la protéine CD63 (pour *Cluster of Differentiation 63*) menant à la résistance à l'anoïkose (Toricelli *et al.* 2013).
- Migration et invasion cellulaires : L'adhésion des cellules à la MEC est un processus pivot dans la migration et l'invasion cellulaires, qui implique de façon prépondérante les intégrines (détaillé dans le chapitre précédent). En effet, il est connu que les intégrines régulent l'expression et l'activité des MMP favorisant la dégradation et le remodelage de la MEC (Borrirukwanit *et al.* 2014, Missan *et al.* 2015, Schlomann *et al.* 2015). De plus, certaines protéines ont été découvertes comme régulant l'activité des intégrines dans l'invasion cellulaire. Il a, par exemple, été montré que l'expression de la profiline (protéine liant l'actine) est corrélée à l'infiltration tumorale et l'atteinte métastatique des ganglions lymphatique. Par ailleurs, la perte d'expression de la profiline par les cellules réduit l'expression des intégrines  $\beta 1$  et prévient l'activation de FAK (Cheng *et al.* 2015).
- Néo-angiogenèse : Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  ont été mises en évidence pour leurs propriétés pro-angiogéniques associées à une augmentation de leur expression dans les vaisseaux sanguins tumoraux néoformés. De plus, il a été montré que l'inactivation des intégrines  $\beta 1$  par siARN bouleverse la résistance des cellules de glioblastome au Bevacizumab (anticorps monoclonal contre le VEGF) (Robinson *et al.* 2009, Stupp *et al.* 2010, Schaffner *et al.* 2013, Steri *et al.* 2014).
- Modification du métabolisme énergétique : La reprogrammation du métabolisme énergétique au sein d'une cellule cancéreuse est bien connue. En effet, la cellule cancéreuse génère son énergie par une glycolyse extrêmement élevée comparée aux cellules saines (effet Warburg). Il est admis que le facteur de transcription Twist est activé par la voie de signalisation Intégrine  $\beta 1$ /PI3K/Akt/mTOR (Akt = Protéine kinase B ; mTOR = *mechanistic Target Of Rapamycin*). De plus, il a été démontré que la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire active la migration et l'invasion

cellulaires par une modulation de la voie de signalisation dépendante des intégrines  $\beta 1$  (Yang *et al.* 2014, Nunes *et al.* 2015, Yang *et al.* 2015, Yang *et al.* 2015).

- Évasion à l'immunité anti-tumorale : L'association des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  et la ténascine C (un autre constituant de la MEC) à la surface des lymphocytes T permet aux cellules cancéreuses d'échapper aux cellules immunitaires en empêchant la réorganisation des filaments d'actine nécessaire à l'activation des lymphocytes T (Jachetti *et al.* 2015).



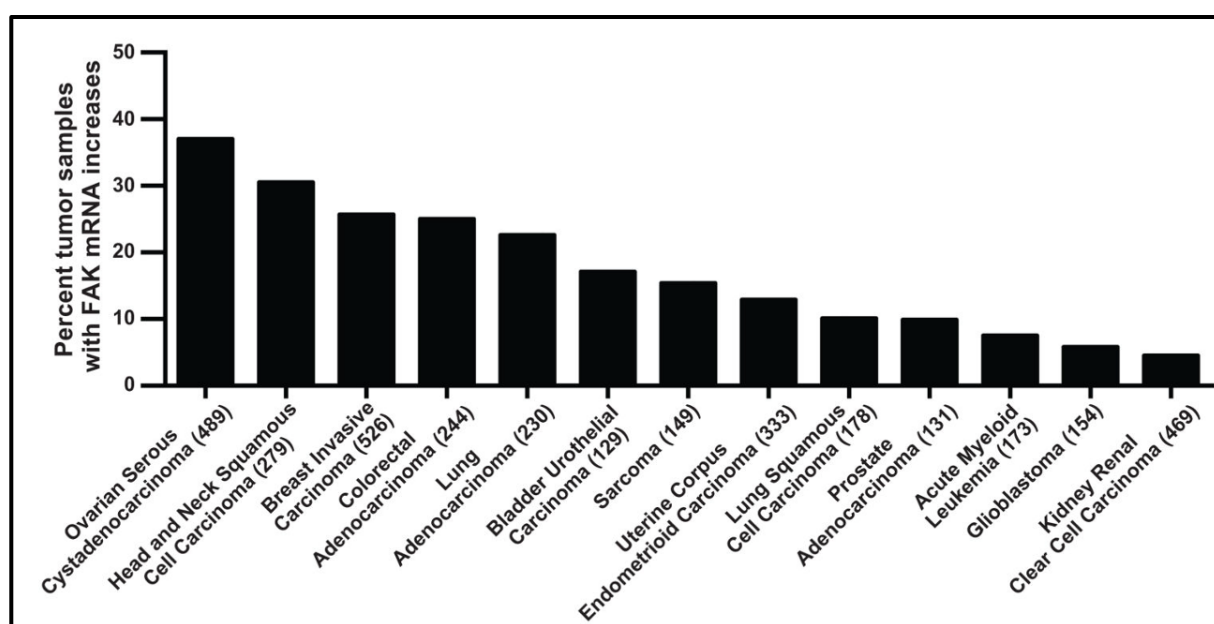


**Figure 16 : Implication des intégrines dans les processus cancéreux.** Les intégrines  $\beta 1$  régulent une multitude de processus caractéristiques du cancer allant de la prolifération cellulaire à l'évasion à l'immunité anti-tumorale. (Blandin *et al.* 2015)

*ii. La protéine Focal Adhesion Kinase (FAK)*

La protéine *Focal Adhesion Kinase* (FAK), découverte en 1992, est une protéine cytosolique et exprimée de façon ubiquitaire au niveau des complexes protéiques impliqués dans l'adhésion

cellulaire (Burrige et Chrzanowska-Wodnicka 1996, Horwitz et Parsons 1999). Essentielle à l'homéostasie cellulaire, FAK a été retrouvée comme aberrante dans plusieurs cancers, tant dans son expression que son activité. En effet, il a été montré rapporté une surexpression ainsi qu'une phosphorylation aberrante de FAK dans plusieurs cancers (**Figure 17**) : colorectal, ovarien, cervical, hépatocellulaire, pulmonaire, prostatique ... etc. (Sulzmaier *et al.* 2014). De plus, il a été montré que l'activité de FAK est associée à l'agressivité du cancer mammaire (Andisha *et al.* 2019). Ainsi, d'après ces données, le rôle de FAK dans la progression tumorale et plus spécifiquement dans les processus adhésifs et migratoires est évident.

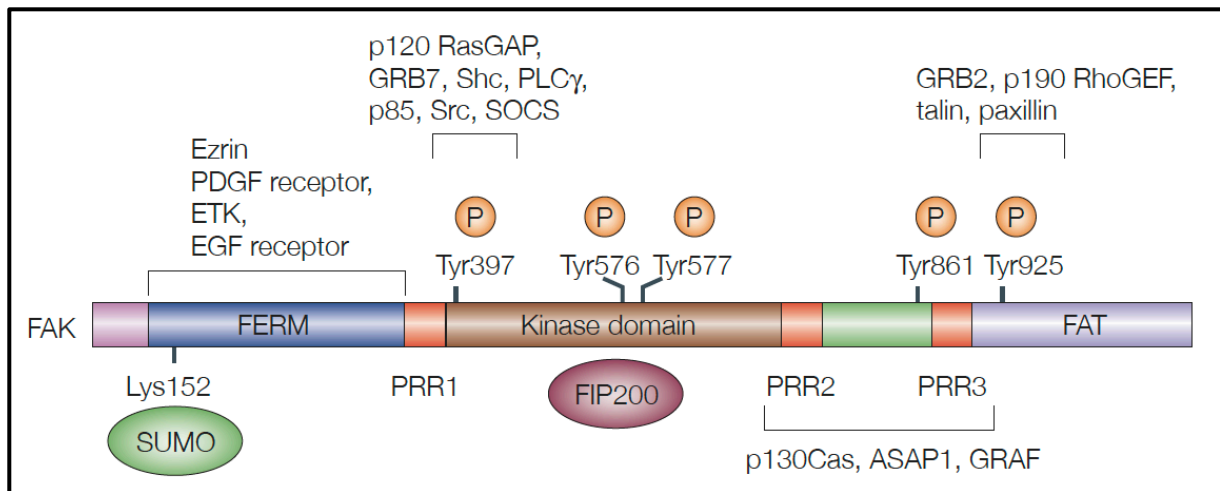


**Figure 17** : Pourcentage de tumeurs présentant une surexpression transcriptionnelle de FAK dans les cancers. Modifié à partir de (Sulzmaier *et al.* 2014)

En réponse à l'activation des intégrines lors de leur interaction à la MEC, plusieurs protéines adaptatrices, parmi lesquelles FAK, sont recrutées au sein du complexe d'adhésion focal. FAK représente une protéine élémentaire dans la transduction des signaux relayés par les intégrines participant ainsi à plusieurs processus cellulaires tels que la migration et la survie cellulaires. Protéine de 125 kDa et structurellement hautement conservée au sein des espèces, FAK reste un acteur important dans la régulation des processus migratoires en intégrant divers signaux menant à la migration des cellules (Schaller *et al.* 1992, Girault *et al.* 1999). Cette fonction de régulation s'initie par l'activation de FAK. Plusieurs éléments permettent d'activer FAK

**(Figure 18)** : (a) les intégrines, (b) les facteurs de croissance et (c) les hormones (Shen et Schaller 1999). L'activation de FAK par ces éléments débute par une autophosphorylation sur le résidu tyrosine en position 397 (Y397) (Schaller *et al.* 1994). La phosphorylation sur Y397 déclenche la libération d'un site de liaison pour les protéines contenant un domaine de type SH2. Le recrutement de kinases telles que c-Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) et Fyn (*proto-oncogene tyrosine-kinase Fyn*) entraînent à leur tour des cascades de phosphorylation principalement au niveau du site catalytique et de la région C-ter de FAK (Y407, Y576, Y577, Y861 et Y925) (**Figure 18**) (Calalb *et al.* 1995, Eide *et al.* 1995, Slack *et al.* 2001).

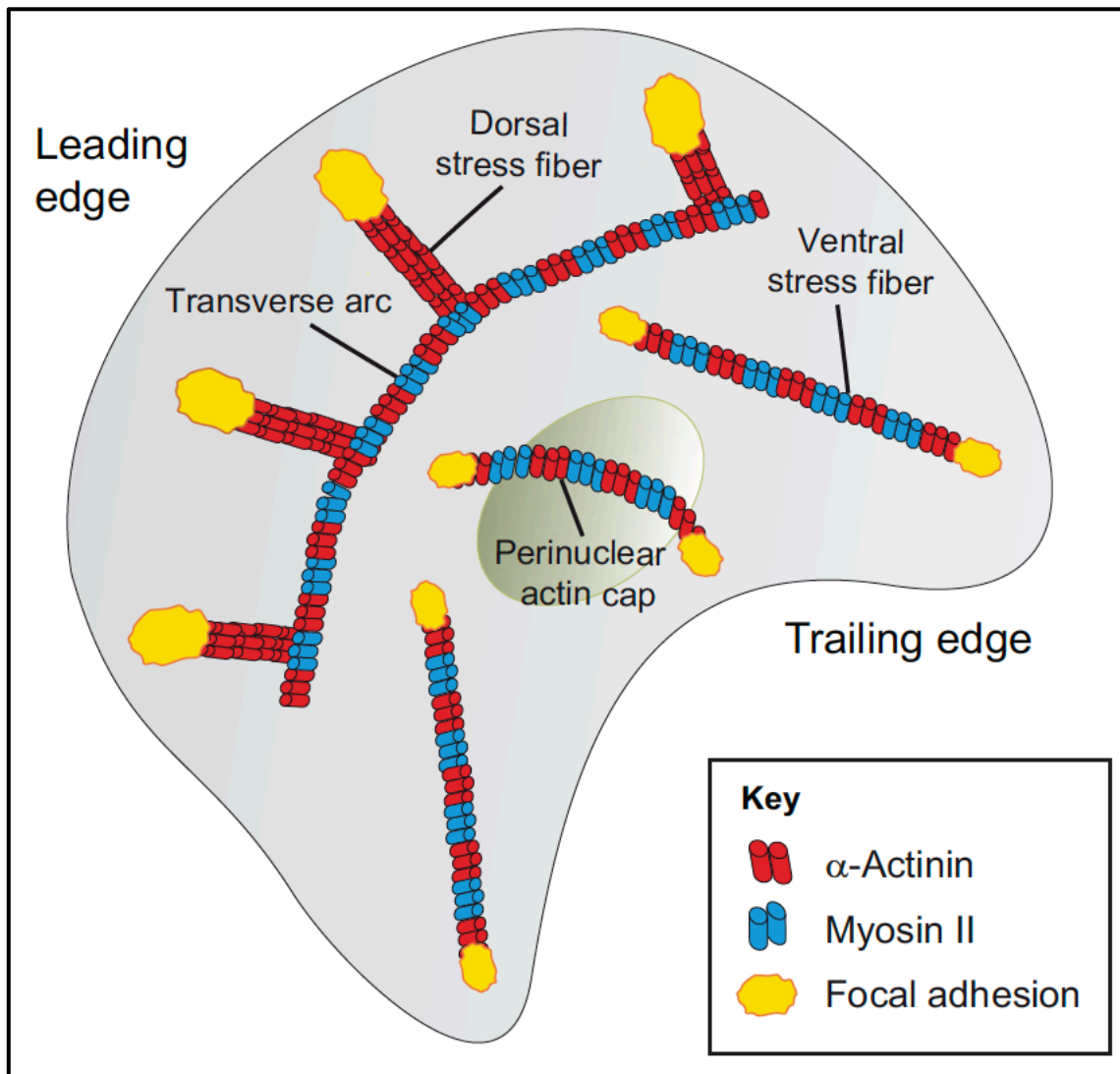
L'activation complète de FAK déclenche la transduction des signaux de signalisations impliqués dans les processus cellulaires *via* des interactions protéiques diverses suite à la libération de plusieurs sites de liaison permettant le recrutement de plusieurs protéines formant le complexe d'adhésion focal. Ainsi, les protéines taline et paxilline se fixent à FAK pour former un complexe protéique auquel viennent s'associer l'actine, la *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI<sub>3</sub>K) et P130CAS (représente *Crk-associated substrate*) permettant de consolider l'assemblage du point d'adhésion focal (Polte et Hanks 1995, Reiske *et al.* 1999). Par ailleurs, d'autres protéines spécialisées dans la signalisation cellulaire peuvent également s'arrimer au complexe : Phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ), GTPase de la famille Rho (GTPase pour *GTP-binding protein*) et *Rho GTPase-activating protein* (Schaller 2001). Ces dernières protéines en s'activant permettent la modulation du cytosquelette d'actine et de l'activité de FAK (**Figure 18**).



**Figure 18 : Structure, sites de phosphorylation et partenaires d'interaction de FAK.**  
(Mitra *et al.* 2005)

### iii. L'actine

Durant les processus migratoires, l'actine tient une place de choix. En effet, les complexes d'adhésion focaux permettent une interaction indirecte des filaments d'actine et la MEC assurant ainsi la modulation des forces mécaniques impliquées dans la migration des cellules. Comme exposé précédemment, les filaments d'actine participent dans plusieurs réarrangements de la morphologie aboutissant à la formation des lamellipodes et filopodes. Au sein de ces structures, l'actine s'associe à la myosine II et l' $\alpha$ -actinine afin de former les fibres de stress (Lehtimaki *et al.* 2021). Pendant longtemps, le rôle des fibres de stress dans la migration des cellules n'a pas toujours été évident, bien qu'il soit largement admis que celles-ci présentent un rôle fondamental dans la migration. En effet, les fibres de stress sont largement observées dans les cellules migrantes mais leur expression augmente également dans les cellules non migrantes cultivées sur une surface solide. De plus, les études rapportant que les cellules non migrantes, comme les leucocytes, migrent plus rapidement lorsqu'elles n'expriment pas de fibres de stress, ont permis de cultiver le doute quant au rôle de ces dernières dans la migration cellulaire (Burrige 1981, Vallenius 2013). Par la suite, il a été largement admis que le rôle des fibres de stress est différent dans les cellules migrantes et stationnaires.



**Figure 19 : Les différentes fibres de stress.** Représentation schématique du réseau actinique composant les fibres de stress. Modifié à partir de (Tojkander *et al.* 2012)

Durant les processus de migration et d'adhésion, l'actine sous forme de fibres de stress est exprimée en trois sous-types majeurs (**Figure 19**) :

- Les fibres de stress ventrales permettent l'adhésion, assurent la rétractation de la cellule lors de la migration des cellules, et régule l'axe de polarité front de migration – queue de rétractation (Naumanen *et al.* 2008, Burnette *et al.* 2014).
- Les fibres de stress transverses harmonisent les forces de tensions au niveau de l'adhésion du front de migration (Burnette *et al.* 2014, Senger *et al.* 2019).

- Les fibres de stress dorsales régulent l'adhésion cellulaire au front de migration et promeuvent la migration cellulaire en association avec la myosine II (Hotulainen et Lappalainen 2006, Tee *et al.* 2015, Tojkander *et al.* 2015).

La capacité des cellules eucaryotes à réguler leur morphologie et leurs propriétés d'adhésion est très dépendante de l'organisation du cytosquelette d'actine. Depuis près de trois décennies, il est bien établi que les petites GTPases de la famille Rho sont impliquées dans la dynamique de l'actine en régulant la formation des fibres de stress (Nobes et Hall 1995), et ainsi dans les processus tels que la régulation de la morphologie, de la polarité, la formation des complexes d'adhésion focaux et la migration cellulaire (Nobes et Hall 1995).

Le rôle des GTPases, dans la polymérisation de l'actine, a d'abord été décrit dans un modèle de fibroblastes (Tapon et Hall 1997). En effet, il a été mis en évidence dans les fibroblastes que (Hall 1994) :

- Cdc42 participe à la formation des filopodes.
- Rac1 participe à la régulation des lamellipodes.
- RhoA régule la formation des fibres de stress.

Les filaments d'actine s'organisent au sein de structures primordiales aux processus migratoires tels que les filopodes et les lamellipodes ou encore forment les fibres de stress (Bugyi et Carlier 2010, Tojkander *et al.* 2012). Ces dernières permettent de relier les cellules à la MEC *via* les complexes d'adhésion focaux (Burrige et Guilluy 2016). De plus, il a été mis en évidence que la formation des fibres de stress dépendante de RhoA induit l'accumulation d'intégrines qui à leur tour stimulent la formation des complexes d'adhésion focaux et la phosphorylation de protéines d'adhésion (Burrige et Chrzanowska-Wodnicka 1996). Par ailleurs, protéines Rho, Rac et Cdc42 présentent un rôle nécessaire aux processus migratoires dépendants du cytosquelette d'actine :

- Cdc42 régule la polarité cellulaire (Etienne-Manneville et Hall 2001).
- Rac joue un rôle prépondérant dans l'initiation de la migration (Allen *et al.* 1997).
- RhoA permet la rétractation des cellules *via* la régulation des points d'adhésion focaux (Allen *et al.* 1997).

Par ailleurs, il a été suggéré que l'activation des Rho GTPases joue un rôle dans la régulation de la formation de fibres de stress par FAK (Katoh 2017). En effet, les fibroblastes n'exprimant pas FAK (FAK<sup>-/-</sup>) étaient de forme elliptique et présentaient un nombre réduit de fibres de stress. L'activation de la kinase Rho (ROCK II) dans les cellules FAK<sup>-/-</sup> a augmenté de manière

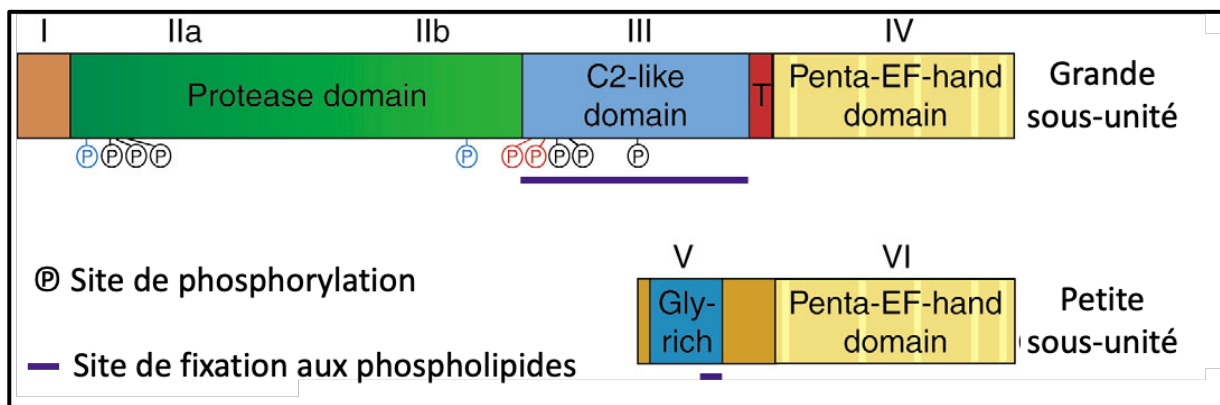
transitoire les filaments d'actine au centre de la cellule, mais ceux-ci n'ont pas formé de fibres de stress épaisses typiques (Katoh 2017). De plus, l'introduction d'un gène FAK exogène marqué à la GFP dans les cellules FAK<sup>-/-</sup> a entraîné une augmentation du nombre de fibres de stress qui ont montré une morphologie typique des fibroblastes (Katoh 2017).

### b. Régulation du recyclage des complexes d'adhésion focaux : Focus sur la calpaïne

La migration cellulaire est un phénomène dynamique requérant une interaction via le cytosquelette entre la cellule et la MEC. L'adhésion des cellules est médiée par plusieurs protéines composant le complexe d'adhésion focal, permettant d'assurer la traction et la genèse des forces mécaniques nécessaires au mouvement de la cellule (Lauffenburger et Horwitz 1996). Précédemment, nous avons aussi bien décrit sa structure que son activité. En revanche, son recyclage reste à mentionner. En effet, durant les processus migratoires, le processus de dé-adhésion est aussi indispensable que l'adhésion. A la fin des années 1990, une famille de protéine, les calpaïnes, ont été rapportées comme ayant un rôle conséquent dans la migration et l'adhésion cellulaires (Huttenlocher *et al.* 1997, Potter *et al.* 1998, Croce *et al.* 1999).

#### i. Structure des calpaïnes et régulation de leur activité

Les calpaïnes désignent une famille de protéases intracellulaires exprimées chez les mammifères à partir de seize gènes différents. Plusieurs isoformes des calpaïnes ont été retrouvées exprimées ubiquitairement, dont les plus connues : la calpaïne 1 ( $\mu$ -calpaïne) et la calpaïne 2 (m-calpaïne) (Goll *et al.* 2003, Suzuki *et al.* 2004).



**Figure 20 :** Représentation de l'architecture moléculaire de la calpaïne. Modifié à partir de (Franco et Huttenlocher 2005)

Les calpaïnes 1 et 2 sont constituées de sous-unités distinctes de 80 kDa complexées à une sous-unité de 30 kDa (Sorimachi et Suzuki 2001). L'association de ces 2 sous-unités (grande et petite) permet la formation d'une structure « tore » renfermant 5 domaines (**Figure 20**) (Hosfield *et al.* 1999, Strobl *et al.* 2000, Pal *et al.* 2003) :

- Le domaine I (au sein de l'hélice N-ter) interagit avec la petite sous-unité lors de l'hétérodimérisation et peut subir une autolyse durant l'activation de la calpaïne.
- Le domaine II subdivisé en sous-domaines (IIa et IIb) constitue le centre catalytique de la protéine.
- Le domaine III abrite des sites sujets à phosphorylation et de liaison aux phospholipides par un domaine C2 en son sein.
- Le domaine IV est impliqué dans la fixation du calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et la liaison à la petite sous-unité. Cinq domaines *EF-hand* composent le domaine IV de la grande sous-unité. Concernant la petite sous-unité, le domaine IV est disposé de façon similaire. Quatre domaines *EF-hand* sont spécialisés dans la fixation au  $\text{Ca}^{2+}$  tandis que le cinquième contribue à la dimérisation des deux sous-unités.
- Le domaine V est un domaine présent au sein de la petite-unité et renferme une région riche en résidus glycine conférant une flexibilité à la protéase formée.

*In vivo*, l'activité de la calpaïne est régulée par une multitude de mécanismes. Le mécanisme le mieux étudié est l'activation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Guroff 1964). En effet, *via* les sites *EF-hand* du domaine IV de la calpaïne, le  $\text{Ca}^{2+}$ , à des concentrations de l'ordre du micromolaire ( $\mu\text{M}$ ), est à l'origine de l'activation de la protéase (Suzuki *et al.* 1981). De plus, des études sur la fonctionnalité de la calpaïne ont montré que le domaine II présente une activité catalytique dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  et que les sites de fixation du calcium (hors *EF-hand*) agissent comme un commutateur pour activer la protéase suite à la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  aux sites *EF-hand* du domaine IV. Cependant, certaines données structurales suggèrent que les changements conformationnels causés par la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sont insuffisants pour aligner les résidus responsables de l'activité catalytique (Hata *et al.* 2001). Ce paradoxe a permis l'émergence de la théorie selon laquelle la calpaïne est activée par d'autres mécanismes parmi lesquels :

- L'autolyse du domaine I : elle permet la dislocation de la liaison des deux sous-unités en position N-ter, entraînant ainsi une modification de l'architecture du site catalytique activant alors la protéase par la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  en faible quantité. Néanmoins, ce phénomène n'est pas essentiel à l'activation de la calpaïne suggérant que sa fonction



réside majoritairement dans le maintien de l'activation plutôt que son initiation (Baki *et al.* 1996, Elce *et al.* 1997, Guttman *et al.* 1997).

- L'interaction avec les phospholipides réduit les quantités de  $Ca^{2+}$  requises à l'activation de la calpaïne. Cependant le rôle des phospholipides dans cette activation demeure vague (Arthur et Crawford 1996, Melloni *et al.* 1996, Tompa *et al.* 2001).
- La phosphorylation de résidus sérine et thréonine : la phosphorylation des résidus sérine 50 par Erk (pour *Extracellular signal-Regulated Kinases*) permet l'activation de la calpaïne. En revanche, la phosphorylation des résidus sérine 369 et thréonine 370 par la Protéine Kinase A (PKA) entraîne son inhibition (Shiraha *et al.* 2002, Glading *et al.* 2004).
- La calpastatine : Protéine inhibitrice de la calpaïne *via* une interaction physique (Wendt *et al.* 2004).

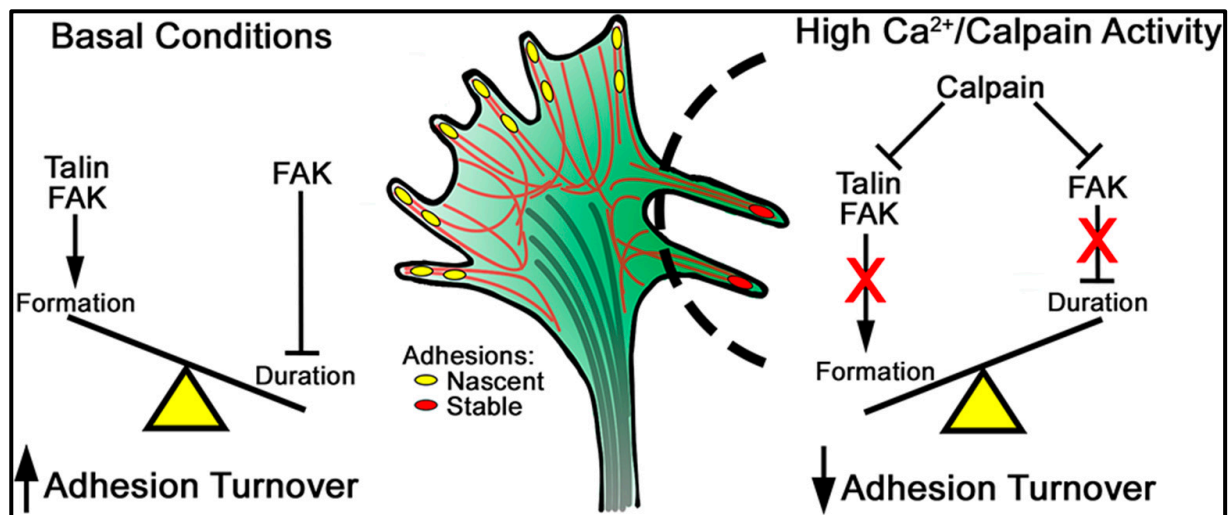
#### *ii. Rôle des calpaïnes dans l'adhésion et la migration cellulaires*

Malgré son activité de protéase conduisant à d'importantes dégradations protéiques, la calpaïne peut également hydrolyser partiellement certaines protéines afin de les activer ou de leur conférer une fonction supplémentaire. A ce jour, plus d'une centaine de protéines, impliquées dans de nombreux processus biologiques, ont été révélées comme substrat de la calpaïne (**Tableau 1**), parmi lesquelles : des facteurs de transcription, des récepteurs transmembranaires, des enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire et des protéines du cytosquelette (Tompa *et al.* 2004).

Depuis deux décennies, de nombreux indices ont été rapportés quant à la façon dont la calpaïne affecte la motilité cellulaire du fait de ses nombreux substrats présents au sein des complexes d'adhésion focaux (Glading *et al.* 2002). A la fin des années 1990, les premières expériences sur la calpaïne ont permis d'évoquer un rôle de la calpaïne dans les processus cellulaires migratoires. En effet, l'inhibition pharmacologique de la calpaïne permettait de réduire la migration cellulaire médiée par les intégrines. De plus, en 2001, Dourdin et ses collaborateurs ont démontré que l'invalidation moléculaire et fonctionnelle de la petite sous-unité de la calpaïne, dans les fibroblastes embryonnaires provenant de souris *Capn4<sup>-/-</sup>* (*knock-out* d'une petite sous-unité de la calpaïne), a montré une diminution de la protéolyse de plusieurs composants des complexes d'adhésions focaux : FAK, paxilline, cortactine et taline (Arthur *et al.* 2000, Dourdin *et al.* 2001). Par ailleurs, l'avènement de la technologie des ARN interférence (siARN) a permis de préciser le rôle de la calpaïne dans le recyclage des points d'adhésion focaux. En effet, il a été découvert l'implication de l'isoforme 2 de la calpaïne dans la protéolyse

des quatre protéines citées précédemment contrairement à son homologue (calpaïne 1) (Franco *et al.* 2004). Cependant, des études complémentaires ont abouti à la conclusion que la famille protéique des calpaïnes régule divers aspects liés à la migration :

- Formation des protrusions membranaires : Plusieurs études ont suggéré un rôle des calpaïnes dans la modulation de l'architecture du cytosquelette d'actine et de la morphologie cellulaire. En effet, l'inhibition de la calpaïne par son inhibiteur physiologique, la calpastatine, résulte en la formation de lamellipodes et filopodes aberrants. De la même façon, les fibroblastes de souris *Capn4<sup>-/-</sup>* présentent des défauts morphologiques caractérisés par de très fines projections membranaires. Par ailleurs, la calpaïne présente un substrat, la cortactine, impliqué dans l'inhibition de la polymérisation de l'actine au niveau des protrusions cellulaires (Potter *et al.* 1998, Dourdin *et al.* 2001, Franco *et al.* 2004, Franco et Huttenlocher 2005).
- Chimiotactisme : La calpaïne régule négativement les protrusions membranaires dans les neutrophiles. En effet, une forte activité de la calpaïne est observée dans les neutrophiles au repos et l'inhibition de l'activité protéasique promeut la formation de protrusions membranaires, de même qu'un déclenchement d'un mouvement cellulaire aléatoire supportant l'idée que la calpaïne régule les mouvements chimiotactiques (Lokuta *et al.* 2003).
- Régulation des complexes d'adhésion focaux (**Figure 21**) : Étant donné le statut majeur de l'adhésion dans la migration cellulaire, les mécanismes par lesquels la dynamique des complexes d'adhésion focaux régule la motilité des cellules, sont des points clés. Bien que l'implication de la calpaïne dans le désassemblage des points d'adhésion focaux (hydrolyse des protéines les composants) est bien connue, le rôle de la calpaïne dans la genèse de ceux-ci l'est dans une moindre mesure. Durant ce processus, les calpaïnes ont été révélées comme actrices dans la formation de complexes d'intégrines ainsi que dans la protéolyse de MARCKS (pour *actin-binding protein Myristoylated Alanine-Rich protein C-Kinase Substrate*) impliquée dans la formation des complexes d'adhésion focaux. Par ailleurs, il a également été établi que la protéolyse, par les calpaïnes, de la protéine taline-1 permet la dislocation des complexes d'adhésions focaux mais également son interaction aux intégrines  $\beta$  impliquée dans la formation de ceux-ci. Cependant, le mécanisme sous-jacent demeure incertain (Calderwood *et al.* 1999, Yan *et al.* 2001, Dedieu *et al.* 2003, Calderwood 2004).



**Figure 21 : Régulation de l'adhésion cellulaire par la calpaïne.** A l'état basal, les protéines taline et FAK permettent aux cellules d'adhérer à la MEC par l'intermédiaire des intégrines. Lors d'une élévation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, les protéines responsables de l'adhésion cellulaire subissent une protéolyse par la calpaïne, entraînant ainsi le détachement cellulaire (Kerstein *et al.* 2017).

**Tableau 1 : Substrats de la calpaïne dans le processus de migration cellulaire**

<b><u>Substrat de la calpaïne</u></b>	<b><u>Rôle dans la migration cellulaire</u></b>	<b><u>Références</u></b>
$\alpha$ -actinine	Association à l'actine et formation des fibres de stress	(Goll <i>et al.</i> 1991)
Intégrines $\beta$	Adhésion <i>via</i> l'interaction à la MEC	(Du <i>et al.</i> 1995)
Caténines $\beta$	Adhésion cellulaire	(Rios-Doria <i>et al.</i> 2004)
Cadhérine	Adhésion cellulaire	(Covault <i>et al.</i> 1991)
Cortactine	Régulation de la polymérisation de l'actine (inhibition)	(Huang <i>et al.</i> 1997)
FAK	Protéine kinase centrale dans l'adhésion cellulaire, transduction du signal	(Carragher <i>et al.</i> 1999)
Filamines	Stabilisation de la structure de l'actine	(Huff-Lonergan <i>et al.</i> 1996)
MARCKS	Formation des complexes d'adhésion focaux	(Dedieu <i>et al.</i> 2003)
Paxilline	Association aux intégrines, adhésion cellulaire	(Carragher <i>et al.</i> 1999)
RhoA	Formation des fibres de stress, contractilité de l'ensemble actomyosine	(Kulkarni <i>et al.</i> 2002)
Src	Phosphorylation de FAK	(Oda <i>et al.</i> 1993)
Taline	Protéine de connexion entre les intégrines et le cytosquelette	(Carragher <i>et al.</i> 1999)

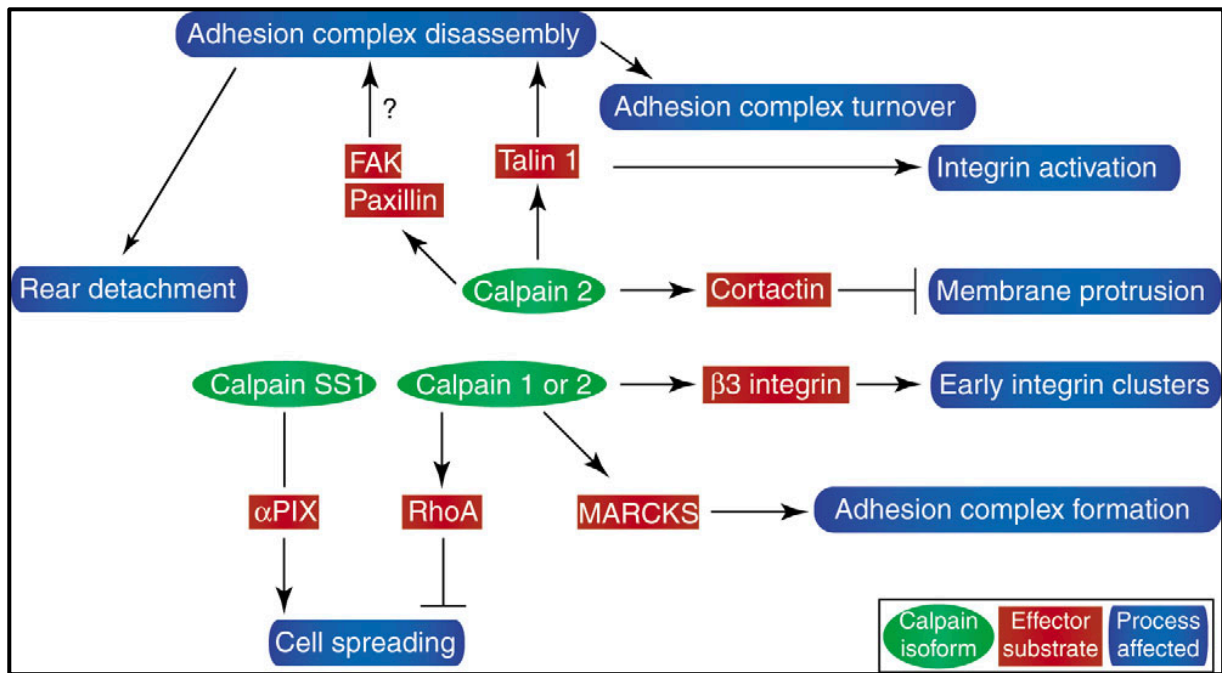
*iii. Calpaïnes et cancer du sein*

L'expression et l'activité aberrantes de la calpaïne ont été mis en évidence dans plusieurs pathologies : la dystrophie musculaire des ceintures 2A (également appelée calpaïnopathie)

(Gallardo *et al.* 2011), la neurodégénérescence, les diabètes ainsi que les cancers (Vosler *et al.* 2008, Storr *et al.* 2011, Pandurangan *et al.* 2014).

Depuis quelques années, il a été mis en avant un certain nombre de rôles de la calpaïne favorisant la progression des cancers, et plus particulièrement la progression du cancer du sein :

- Migration et invasion cellulaires (**Figure 22**) : L'implication de la calpaïne dans les processus migratoires a été décrite précédemment. Par ailleurs, durant l'invasion cellulaire, il a été découvert que la calpaïne permet la formation d'invadopodes, protrusions cellulaires similaires aux lamellipodes dans leur structure et spécialisés dans l'invasion cellulaire (Cortesio *et al.* 2008). De plus, il est à noter que les calpaïnes interagissent avec les métalloprotéases matricielles (MMP2 et MMP9) impliquées dans la dégradation des composants de la MEC (Popp *et al.* 2003).
- Survie cellulaire, apoptose et autophagie : La calpaïne est également connue pour son implication dans les processus apoptotiques, bien que son rôle semble dépendre du stimulus apoptotique et de la localisation intracellulaire de la protéase (Tan *et al.* 2006). Durant les processus de survie cellulaire, il a été démontré que la calpaïne peut cliver la protéine P53, empêchant ainsi l'apoptose dépendante de P53 (Kubbutat et Vousden 1997). De plus, la calpaïne présente également la capacité d'activer le facteur de transcription NF $\kappa$ B *via* le clivage de son inhibiteur I $\kappa$ B en réponse à plusieurs facteurs tels que le facteur de nécrose tumorale et l'activation de HER2 (Han *et al.* 1999, Pianetti *et al.* 2001). La calpaïne permet également le clivage de plusieurs protéines effectrices de l'apoptose (caspases, Bax, Bcl-2, JNK et Jun) (Hirai *et al.* 1991, Wood *et al.* 1998, Chua *et al.* 2000, Gil-Parrado *et al.* 2002). Par ailleurs, il a été rapporté un clivage de certaines cyclines, comme la cycline E (responsable de la transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire), en une forme hyperactive (Wang *et al.* 2003).
- Autres processus cellulaires : Les calpaïnes présentent également un rôle dans les processus cellulaires dépendants de l'hypoxie et dans les voies de signalisation menant à la réparation de l'ADN (McGinnis *et al.* 1999, Zheng *et al.* 2014).



**Figure 22 : Processus impliqués dans l'adhésion et la migration cellulaires régulés par la calpaïne.** (Franco et Huttenlocher 2005)

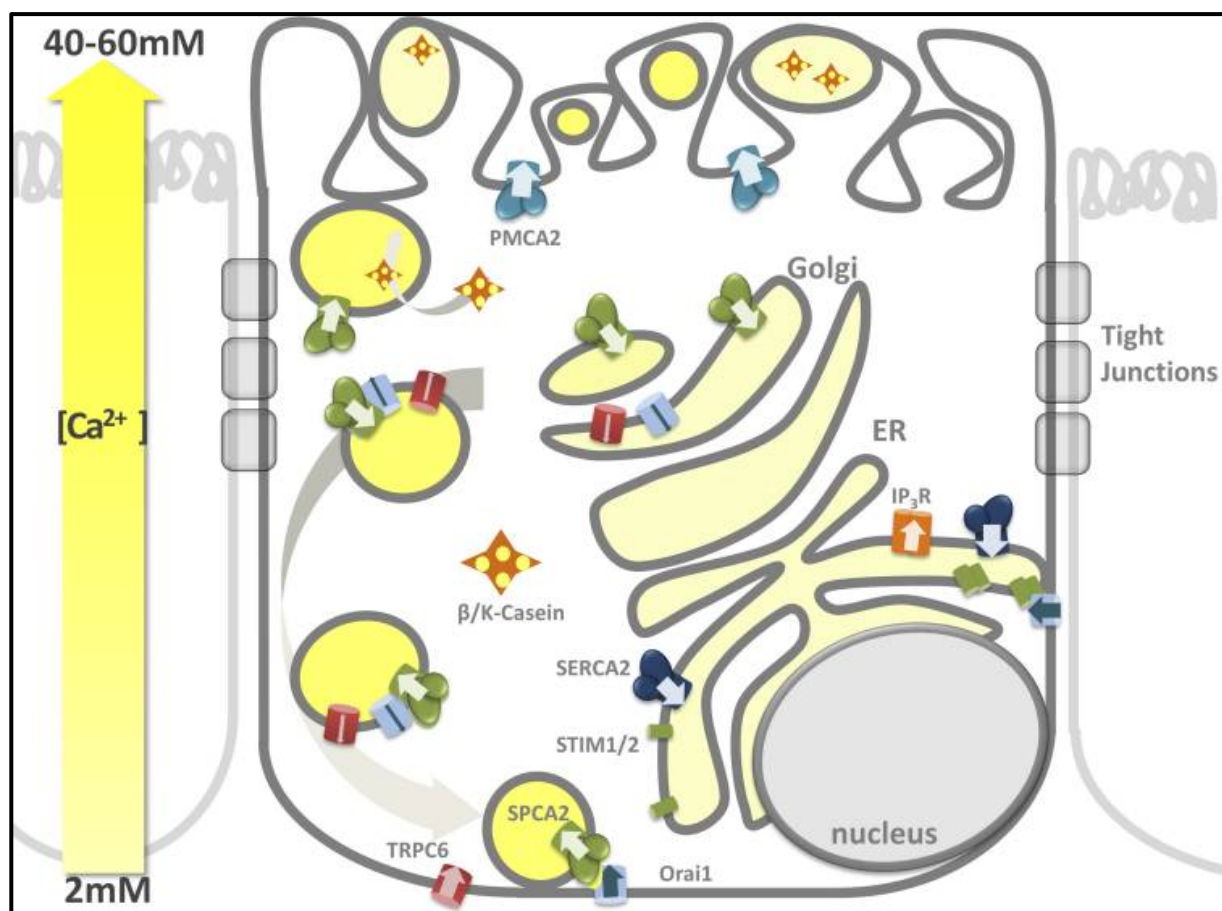
## PARTIE 3 : Signalisation calcique et canaux ORAI3

### 1. Le calcium

#### a. Définition

Le calcium est un élément fondamental au fonctionnement des êtres vivants et l'un des éléments les plus abondants dans un organisme pluricellulaire. Il est très largement disséminé dans l'organisme et régule considérablement divers processus physiologiques. Le calcium est présent sous plusieurs formes dans l'organisme. Tout d'abord, 99 % du calcium est contenu dans les os, sous forme d'hydroxyapatite par son association avec le phosphate mais n'est pas disponible pour exercer ses fonctions physiologiques. A l'opposé, le calcium sous sa forme ionique ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est présent au niveau plasmatique, interstitiel et cellulaire. Dans le plasma, seulement 50 % du  $\text{Ca}^{2+}$  est présent sous sa forme libre et peut ainsi participer à la signalisation cellulaire, l'autre partie étant liée aux protéines plasmatiques. Enfin, dans l'interstitium et les cellules, le  $\text{Ca}^{2+}$  est disponible majoritairement sous sa forme libre pour une utilisation quasiment instantanée par les cellules (Berridge *et al.* 2003, Berridge 2007, Monteith *et al.* 2007).

Sous sa forme ionique, le  $\text{Ca}^{2+}$  est depuis longtemps, caractérisé de second messager intracellulaire universel car il participe à la régulation de différents processus cellulaires : de la fécondation à la mort cellulaire par apoptose, en passant par les processus de prolifération, différenciation, contraction, phosphorylation des protéines, sécrétion et migration cellulaires (Carafoli *et al.* 2001). Le calcium permet la régulation de la prolifération et la différenciation, ainsi que l'apoptose des cellules épithéliales mammaires (Vandewalle *et al.* 1993, Borowiec *et al.* 2014). L'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lactation est également bien connue (**Figure 23**). Durant la lactation, l'activité conjointe des pompes calciques PMCA2b et SERCA2 ainsi que des canaux ioniques TRPC6 et ORAI1 assurent le transport transépithélial de  $\text{Ca}^{2+}$  du pôle basolatéral au pôle apicale des cellules mammaires sécrétrices (Cross *et al.* 2014). Durant ce processus, l'activation d'ORAI1 par SPCA2 (pompe localisée au niveau de l'appareil de Golgi) ainsi que l'activation de TRPC6 permettent un influx calcique intracellulaire au niveau de la membrane plasmique en position basolatérale. Le  $\text{Ca}^{2+}$  forme se complexe ensuite aux caséines dans les vésicules sécrétrices de lait. La pompe PMCA2b, localisée au niveau apical, permet d'extruder le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le lumen afin d'augmenter la concentration calcique du lait maternel (**Figure 23**) (Cross *et al.* 2014). Par ailleurs, l'expression de PMCA2b et SPCA2 augmente durant la grossesse, qui diminue à la fin de la période de lactation (Roberts-Thomson *et al.* 2010, Cross *et al.* 2013).



**Figure 23 : Transport du  $\text{Ca}^{2+}$  par les transporteurs calciques au cours de la lactation.**

(Cross *et al.* 2014)

Tout déséquilibre de la concentration calcique intracellulaire conduit au développement de sévères pathologies. Une concentration calcique trop élevée entraîne une cascade d'événements nocifs pour l'organisme comme par exemple une atteinte lipidique des membranes ou une agrégation nucléaire et protéique (Case *et al.* 2007). Par conséquent, la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est très finement régulée par diverses protéines apparues très tôt durant l'évolution : les transporteurs calciques (canaux ioniques, échangeurs et ATPases) et les protéines tampons. La concentration extracellulaire de calcium est particulièrement stable, avoisinant 1 – 2 mM. En revanche, grâce aux acteurs calciques cités précédemment, la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  est maintenue proche de 100 nM pouvant parvenir à 1 voire 2  $\mu\text{M}$  suite à une stimulation (Berridge *et al.* 2000). C'est cette augmentation de la concentration



calcique intracellulaire qui est responsable de multiples processus cellulaires dépendants du calcium. L'augmentation de la concentration cellulaire est permise par deux principales voies :

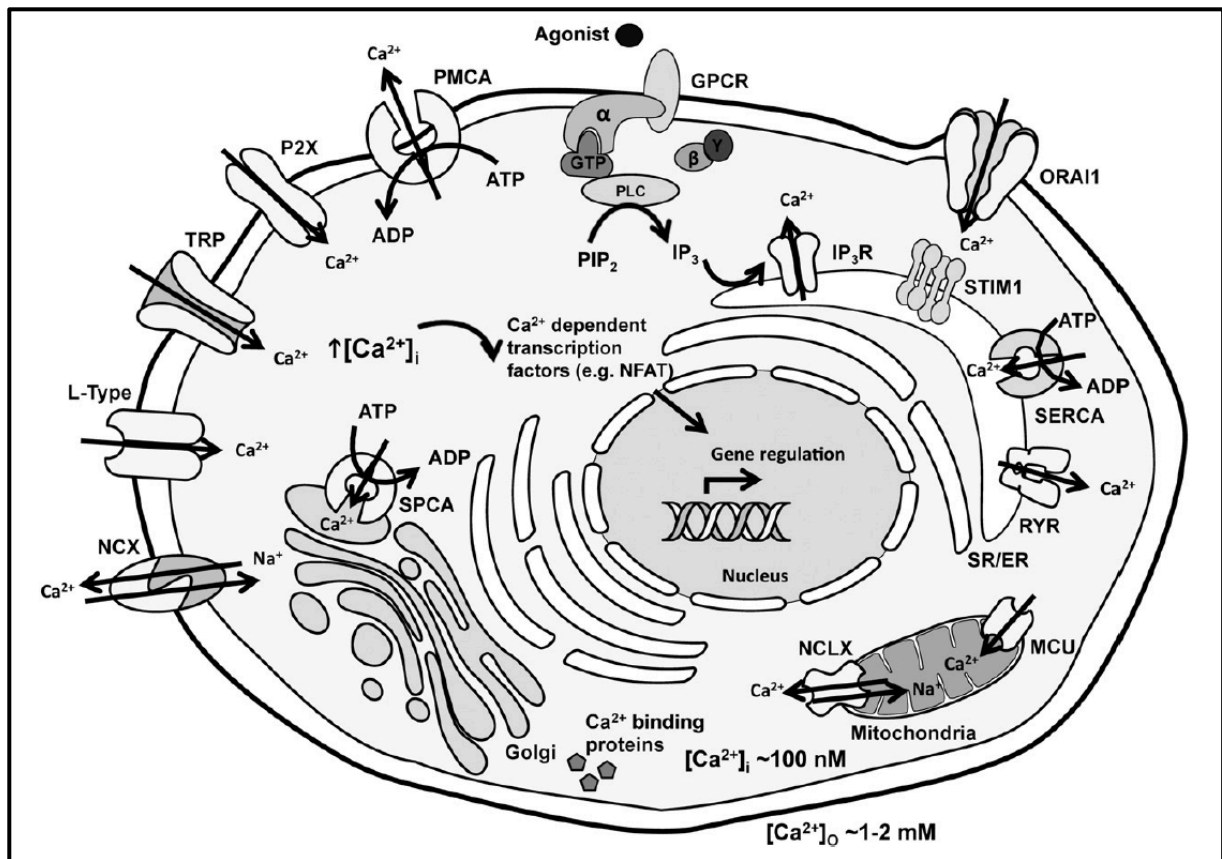
- L'entrée de calcium extracellulaire par des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  et des échangeurs.
- La libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique (RE) ou sarcoplasmique (RS), agissant comme une réserve calcique intracellulaire majeure, via des récepteurs-canaux comme les récepteurs à l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) ou encore les récepteurs à la ryanodine (RyR).

Ces deux voies permettent d'activer ou d'inhiber des voies de signalisation spécifiques à un processus cellulaire donné. La durée, l'amplitude ou encore la fréquence du signal calcique permet une régulation spatio-temporelle des processus cellulaires activés.

#### b. Homéostasie calcique

Comme énoncé précédemment, dans une cellule non excitable saine, la concentration calcique intracellulaire optimale est maintenue autour de 100 nM. Ce phénomène porte le nom d'homéostasie calcique, maintenue de façon dynamique par plusieurs protéines responsables du transport de  $\text{Ca}^{2+}$  et de la régulation de la concentration calcique intracellulaire (**Figure 24**) :

- Les canaux calciques et récepteurs ionotropiques calciques se trouvant majoritairement au niveau de la membrane plasmique, de la membrane du RE et les canaux enchâssés dans la membrane mitochondriale assurent respectivement un influx calcique dans la cellule, une vidange du calcium du RE et la recharge de la mitochondrie en  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Les pompes (ATPases) permettent à la fois l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule et le stockage de  $\text{Ca}^{2+}$  au sein d'organites intracellulaires tels que le RE et l'appareil de Golgi.
- Les échangeurs calciques permettant de réguler la concentration calcique intracellulaire en utilisant le gradient électrochimique d'une autre espèce ionique tel que le sodium ( $\text{Na}^+$ ). Ils sont présents au niveau de la membrane plasmique mais également au niveau mitochondrial ou ils assurent la décharge du  $\text{Ca}^{2+}$  contenu dans la mitochondrie.
- Les protéines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  comme les protéines tampons et les protéines activées par la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 24 :** Représentation schématique des protéines responsables de l'homéostasie calcique. On retrouve les canaux ioniques, les transporteurs, les échangeurs et les protéines sensibles au calcium (Stewart *et al.* 2015)

### *i. Canaux calciques transmembranaires*

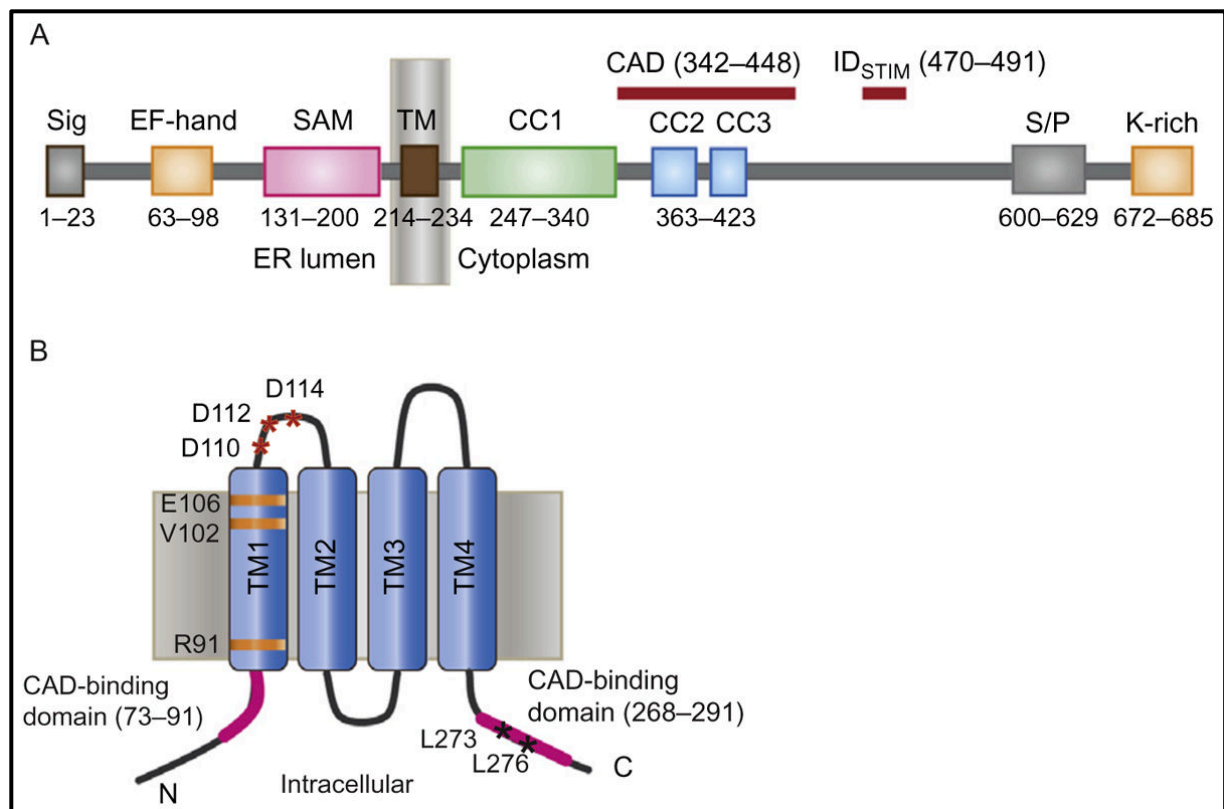
L'une des principales sources de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible pour la cellule représente le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. L'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule s'effectue par l'activation de canaux ioniques transportant le  $\text{Ca}^{2+}$  en suivant un gradient électrochimique. Différentes voies d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, présentant des propriétés différentes, peuvent être sollicitées :

- Les canaux calciques dépendants du voltage (VGCC pour *Voltage-Gated Calcium Channels*) sont présents à la membrane de l'ensemble des cellules excitables et sont modulés par les changements du potentiel membranaire. Une dépolarisation du potentiel de membrane les active, permettant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules activant des voies de signalisation diverses menant à la transcription de gènes, l'exocytose et la transmission du message nerveux ainsi qu'à la contraction. Ces canaux ont été classés

en 6 types différents. Les VGCC de type L, N, P, Q et R sont des canaux activés par une puissante dépolarisation membranaire (potentiel de membrane allant de -40 mV pour le type R à -10 mV pour le type L) tandis que les VGCC de type T, activés de façon transitoire, s'activent lorsque le potentiel membranaire est supérieur à -70 mV. Ils sont composés de 5 sous-unités :  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\beta_{1-4}$  et  $\gamma$ . La sous-unité  $\alpha_1$  renferme le pore du canal. Cette sous-unité, composée de 6 segments transmembranaires, présente la particularité d'exhiber un senseur de voltage au sein du segment S4 assurant la détection de la dépolarisation membranaire entraînant l'activation du canal et l'ouverture du pore canalaire (Herlitze *et al.* 2003).

- Les canaux calciques activés par des seconds messagers (SMOC pour *Second Messenger-Operated Channels*) présentent la caractéristique d'être activables par l'action de seconds messagers intracellulaires qui permet l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. C'est le cas, par exemple, du canal ARC (pour *Arachidonate-Regulated Calcium*), formé par l'association de sous-unités ORAI1, ORAI3 et STIM1 (*Stromal Interaction Molecule 1*), activé par l'acide arachidonique et permettant une entrée sélective de  $\text{Ca}^{2+}$ , indépendamment de la déplétion des stocks calciques réticulaires. Certains canaux TRP sont également activés par des second-messagers comme par exemple le diacylglycérol (DAG) (Trebak *et al.* 2003, Trebak *et al.* 2003, Shuttleworth 2009).
- Les récepteurs ionotropiques calciques (ROC pour *Receptor-Operated Channel*) sont activés par un stimulus extracellulaire de nature chimique. Ils présentent la particularité d'être pourvus d'un pore canalaire au sein de leur structure leur permettant un influx calcique dans la cellule. Par exemple, les récepteurs canaux NMDA (*N-Methyl-D-Aspartate*) et  $\text{P}_2\text{X}$  (récepteurs purinergiques) sont activés par le glutamate et l'ATP respectivement (Fischer et Krugel 2007, Shen et Yakel 2009).
- Les canaux TRP (*Transient Receptor Potential*) représentent une large famille de canaux cationiques non sélectifs exprimés majoritairement à la membrane plasmique, et capables de former des homo- ou hétéro-tétramères activés par un large éventail de stimuli. Les canaux TRP sont regroupés en 7 groupes : TRPA (*Ankyrin*), TRPC (*Canonical*), TRPM (*Melastatin*), TRPML (*Mucolipin*), TRPN (nompC ou *No-mechanoreceptor potential C*), TRPP (*Polycystin*) et TRPV (*Vanilloid*) (Venkatachalam et Montell 2007, Samanta *et al.* 2018).
- Les canaux calciques activés par la déplétion des stocks calciques réticulaires (SOC pour *Store-Operated Channels*) présentent une sélectivité élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 25**)

(Prakriya et Lewis 2015). L'entrée calcique par les canaux SOC, nommée SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*) est stimulée par la vidange des stocks calciques réticulaires, impliquant les IP<sub>3</sub>R et RyR, et constitue la principale source de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules non excitables, et plus particulièrement les cellules épithéliales (Prakriya et Lewis 2015). L'entrée SOCE représente un mécanisme à deux composantes : (a) l'activité des protéines réticulaires STIM (*Stromal Interaction Molecule*), senseurs du Ca<sup>2+</sup> réticulaire et (b) l'entrée de calcium induite par l'activation des canaux ORAI. D'un point de vue moléculaire, deux isoformes des protéines STIM (STIM1 et STIM2) sont exprimées dans la cellule (Grabmayr *et al.* 2020). Les canaux ORAI, quant à eux, figurent sous trois isoformes (ORAI1, ORAI2 et ORAI3) et sont en majorité impliqués dans le courant I<sub>CRAC</sub> (*Ca<sup>2+</sup> Release-Activated Ca<sup>2+</sup>*) représentant un influx calcique (Feske *et al.* 2006, Vig *et al.* 2006). Les protéines STIM sont largement distribuées dans le RE, et présentent un domaine *EF-hand*, capable de lier les ions Ca<sup>2+</sup> et donc de déceler les changements de concentration calcique du RE se produisant lors de sa déplétion. Lors de cette vidange du Ca<sup>2+</sup> du RE, les protéines STIM subissent un réarrangement structurel leur permettant de se complexer aux canaux ORAI présents à la membrane plasmique et ainsi les activer (Soboloff *et al.* 2012). Il est, également, à noter que certains canaux TRP (TRPC1, TRPC3, TRPC6 et TRPV6) se comportent aussi comme des canaux SOC *via* une activation de ceux-ci par STIM1. En revanche, leur sélectivité pour le Ca<sup>2+</sup> est moins élevée ORAI (Trebak *et al.* 2003, Vanden Abeele *et al.* 2004).



**Figure 25 : Représentation schématique des canaux SOC et de STIM1 responsables de l'entrée calcique de type SOCE.** A. Structure de STIM1. B. Structure des canaux ORAI. (Prakriya 2013)

### *ii. Canaux calciques intracellulaires*

Plusieurs organites intracellulaires agissent comme stocks calciques pouvant répondre rapidement aux besoins de la cellule en  $\text{Ca}^{2+}$ . Outre leurs fonctions principales, l'appareil de Golgi et les mitochondries ont également la capacité de stocker transitoirement le  $\text{Ca}^{2+}$  grâce à des pompes, canaux et échangeurs présents à la surface de leur membrane. Néanmoins, le stock de  $\text{Ca}^{2+}$  majeur dans la cellule est le RE renfermant une grande quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  dont la concentration se situe entre 100 et 800  $\mu\text{M}$ . Du RE, deux acteurs majoritaires régulent la libération de calcium : les récepteurs  $\text{IP}_3\text{R}$  et RyR (Mikoshiya 2007, Van Petegem 2012). D'homologie de séquences similaire, ces deux types de récepteurs présentent des modalités d'activation différentes. Les  $\text{IP}_3\text{R}$ , présents sous trois isoformes ( $\text{IP}_3\text{R1}$ ,  $\text{IP}_3\text{R2}$  et  $\text{IP}_3\text{R3}$ ) sont principalement activés par l'inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) en diacylglycérol (DAG) et  $\text{IP}_3$ . D'autre part, les RyR, dont trois isoformes sont connus (RyR1, RyR2 et RyR3), sont activés par de faibles

concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) ou de ryanodine (un alcaloïde végétal absent chez les animaux). Cependant, une forte concentration de ces deux éléments inhibent les RyR afin d'éviter une surcharge calcique cytosolique. Dans le muscle squelettique, il a été rapporté un couplage fonctionnel entre les RyR1 et les VGCC de type L au cours duquel les canaux de type L agissent comme senseurs du voltage pour contrôler la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire par les RyR (Rios et Brum 1987). A l'inverse, les RyR1 émettent un signal rétrograde permettant de modifier l'activité des VGCC de type L (Nakai *et al.* 1996). Ce couplage RyR-VGCC de type L a également été observé dans les neurones (Chavis *et al.* 1996).

L'uniport MCU est présent au niveau de la membrane de la mitochondrie et est activé par le potentiel membranaire mitochondrial. Il permet de limiter l'excès de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol pour lequel il ne présente qu'une faible affinité. Par son activité liée au potentiel de membrane mitochondrial, le canal MCU se charge de transporter le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers la matrice mitochondriale où il sera stocké de façon transitoire. Son action permet d'empêcher l'activation des processus cellulaires menant à l'apoptose liée à une surcharge  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Marchi et Pinton 2014).

### *iii. Pompes et échangeurs calciques*

Les pompes et échangeurs sont des acteurs primordiaux dans le maintien de la concentration calcique intracellulaire au repos. En effet, lors de l'extinction du signal calcique, les pompes et échangeurs permettent l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule, la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitochondrie ou encore le remplissage du RE. L'activité des pompes et échangeurs suit des voies spécifiques du type cellulaire et des processus cellulaires activés. Plusieurs pompes et échangeurs participant à l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule ont été caractérisés :

- La pompe PMCA (*Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) exprimée au niveau de la membrane plasmique (Krebs 2017).
- La pompe SERCA (*Sarco/Endoplasmic Reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase*) enchâssée dans la membrane du RE (Periasamy et Kalyanasundaram 2007).
- La pompe présente au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi : *Golgi-Associated Secretory  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase* (SPCA) (Vandecaetsbeek *et al.* 2011).
- L'échangeur NCX ou  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exprimé au niveau de la membrane mitochondriale et de la membrane plasmique (Khananshvili 2014).

Les pompes PMCA et SERCA sont deux ATPases, présentant une forte homologie de séquences entre elles et dotées d'une fonction commune : la réduction de la concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  vers un niveau basal physiologique. De très haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , la pompe PMCA extrude le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol vers le compartiment extracellulaire tandis que la pompe SERCA assure le remplissage du RE. Il est à noter que leur particularité dans la régulation de l'homéostasie calcique réside dans leur mode d'activation qui nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'adénosine triphosphate (ATP) pour un ion  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cas de la PMCA ou deux ions  $\text{Ca}^{2+}$  pour la SERCA.

De la même façon, la pompe SPCA permet de contrecarrer l'excès de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique en le transportant dans l'appareil de Golgi. La pompe SPCA partage une homologie structurelle et fonctionnelle avec les pompes PMCA et SERCA par sa dépendance à l'hydrolyse de l'ATP dans le transport du  $\text{Ca}^{2+}$ . En outre, la pompe SPCA permet également de transporter les ions manganèse ( $\text{Mn}^{2+}$ ) afin d'éviter toute toxicité cellulaire due à ceux-ci.

L'échangeur NCX, quant à lui, supporte l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  en suivant le gradient électrochimique du  $\text{Na}^+$  et selon le potentiel de membrane. Il permet d'échanger de façon bidirectionnelle un ion  $\text{Ca}^{2+}$  pour trois ions  $\text{Na}^+$ . L'activité de l'échangeur NCX est connu pour être modulée par la fixation  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (activation) ou de  $\text{Na}^+$  (inhibition) sur celui-ci. Selon le gradient électrochimique, l'échangeur NCX peut également fonctionner selon un mode dit inverse. Durant ce phénomène, NCX permet l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule selon les mêmes modalités de transport que décrites précédemment.

#### *iv. Protéines et processus dépendants du calcium*

D'autres acteurs protéiques, autres que les transporteurs, échangeurs et canaux calciques sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique. Lors de modifications de la concentration calcique intracellulaire, le calcium se fixe à des protéines spécifiques (*Ca<sup>2+</sup>-binding proteins*), modulant ainsi le signal calcique et assumant la transduction du signal calcique en processus physiologiques. Ces protéines ont la caractéristique d'exprimer un domaine structurel *EF-hand* formant un site de fixation de haute affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces protéines spécifiques s'activent lorsque la concentration calcique intracellulaire augmente (de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) afin de réguler la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire, mais également pour assurer l'activation des voies de signalisation menant aux réponses cellulaires (Kretsinger et Nockolds 1973, Ikura 1996). C'est ainsi qu'elles ont été classifiées en deux familles : (a) les protéines tampons et (b) les protéines effectrices.

Présentant des profils d'expression et des cinétiques de fixation et affinités au  $\text{Ca}^{2+}$  propres à chacune, les protéines tampons permettent de baisser la quantité de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible contribuant ainsi à réguler l'amplitude et le décours spatio-temporel du signal calcique. De par leurs spécificités, certaines protéines tampons sont exprimés au niveau cytosolique (calbindine et calrétinine par exemple), d'autres au niveau réticulaire (calnexine et calréticuline par exemple). Structurellement parlant, la fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  sur les protéines tampons n'entraîne aucun changement conformationnel de celles-ci contrairement aux protéines effectrices. En effet, la liaison d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  sur une protéine effectrice sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  (comme la calmoduline (CaM)) modifie l'architecture conformationnelle de la celle-ci modulant ainsi des voies diverses de signalisation (Ikura 1996).

### c. Calcium et cancer

#### *i. Généralités dans les cancers : Focus sur le cancer du sein*

Depuis de nombreuses années, le  $\text{Ca}^{2+}$  fait l'objet de nombreuses études concernant sa participation dans différents processus pathologiques notamment le cancer. Capable d'être une plaque tournante dans la régulation des fonctions cellulaires physiologiques, il participe également à l'ensemble des processus tumoraux, de l'initiation tumorale à la formation de métastases. En effet, une dérégulation, d'au moins un des acteurs du panel protéique modulateur de l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$ , est souvent associée à des processus tumoraux. Par ailleurs, le développement notamment des fluorochromes calciques, tels que le Fura-2, a permis de mieux comprendre la dynamique du signal calcique dans les cellules saines et pathologiques.

De nombreuses études ont démontré des altérations au niveau de l'expression et/ou l'activité des acteurs protéiques impliqués dans la signalisation calcique dans le contexte du cancer :

- Une surexpression de plusieurs canaux TRP (TRPC1, TRPC6, TRPM7, TRPM8 et TRPV6) lors d'un cancer du sein a été rapportée par notre laboratoire. Il a également été précisé que l'expression des canaux TRPC1, TRPM7 et TRPM8 est corrélée à la taille de la tumeur et un Ki67 (index prolifératif) élevé (Dhennin-Duthille *et al.* 2011). En revanche, TRPV6 est corrélé à l'agressivité du cancer mammaire exprimant ER (Dhennin-Duthille *et al.* 2011). D'autre part, il a été montré que l'activité calcique de TRPM7 régule la prolifération des cellules cancéreuses mammaires non invasives exprimant ER (Guilbert *et al.* 2009). Par contre, TRPM7 régule la migration, des cellules



cancéreuses mammaires invasives et n'exprimant pas ER, *via* son domaine kinase, et non par son activité canalaire (Guilbert *et al.* 2013).

- Les canaux ORAI1 et ORAI3 ont aussi été retrouvés surexprimés dans les cellules de cancer du sein :
  - ORAI1 dans les lignées cancéreuses mammaires de type basal où il régule la migration des cellules MDA-MB-231 *via* son association avec les protéines STIM1 (Yang *et al.* 2009). Durant cette étude, il a été démontré que la SOCE médiée par le couplage entre ORAI1 et STIM1 régule la dynamique des points d'adhésion focaux (Yang *et al.* 2009). Il a également été montré un rôle dans la migration indépendamment des protéines STIM. Durant ce processus, Orail permet une entrée calcique constitutive et fonctionne en partenariat avec deux canaux potassiques, Kv10.1 et SK3, dont l'activité permet de maintenir le gradient électrochimique du Ca<sup>2+</sup> (Hammadi *et al.* 2012, Chantome *et al.* 2013).
  - En 2010, Motiani et ses collaborateurs ont décrit l'implication d'ORAI1 et ORAI3 dans l'entrée SOC en fonction du phénotype du cancer du sein (Motiani *et al.* 2010). ORAI1 module la SOCE dans les lignées cancéreuses mammaires basales (Motiani *et al.* 2010). Alors qu'ORAI3 supporte la SOCE dans les lignées cellulaires de type luminal ER<sup>+</sup> (Motiani *et al.* 2010). ORAI3 régule la prolifération et la survie cellulaire des cellules cancéreuses luminales ER<sup>+</sup> (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013). De plus, la surexpression de ORAI3 dans ces lignées cancéreuses mammaires luminales conduit à une résistance aux agents chimiothérapeutiques *via* la voie de signalisation P53 (Hasna *et al.* 2018).
- L'ATPase PMCA2 présente une expression plus importante dans les lignées cancéreuses mammaires par rapport aux lignées mammaires saines (Reinhardt *et al.* 2004, VanHouten *et al.* 2010).
- Les pompes SPCA1 et SPCA2 régulent également les processus cellulaires au cours de la progression tumorale (Badaoui *et al.* 2018, Dang *et al.* 2019, Peretti *et al.* 2019).

Par ailleurs, il a également été proposé de cibler les canaux ioniques dans la thérapie contre les cancers, notamment les cancers de l'ovaire, du sein, de la prostate et de l'œsophage. Ainsi, par les multiples rôles des canaux dans la cancérogenèse, il a été proposé de qualifier les cancers d'onco-canalopathies (Prevarskaya *et al.* 2018).

## *ii. Calcium, migration cellulaire et organisation du cytosquelette*

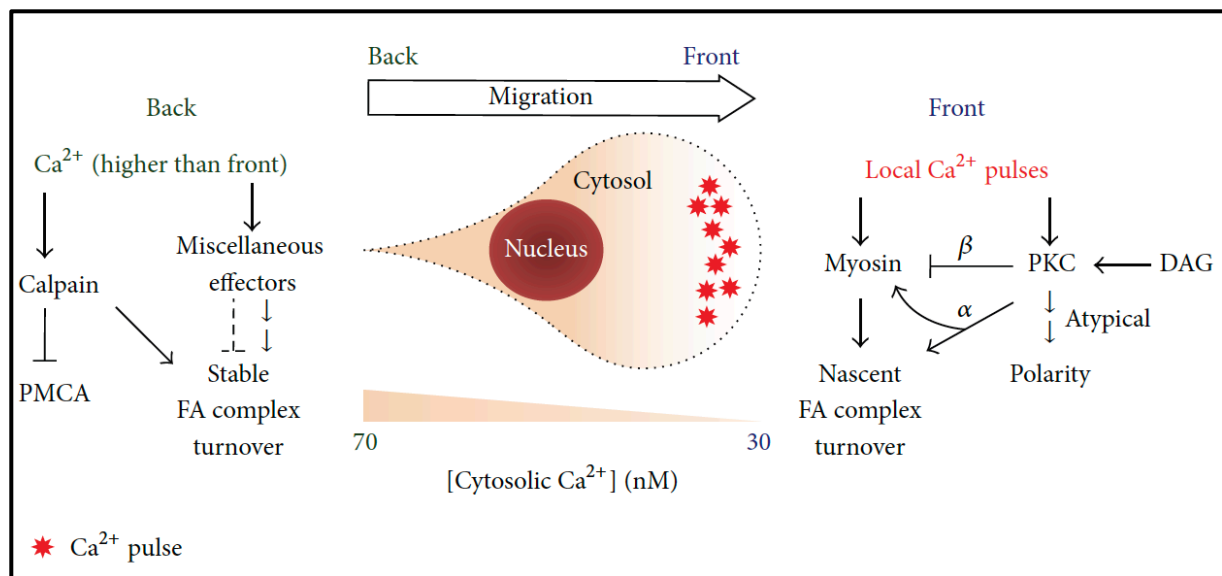
Depuis 1991 et la première démonstration du rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la migration des éosinophiles (Brundage *et al.* 1991), les études portant sur l'agressivité des cancers ont apporté beaucoup de précisions quant à l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la migration cellulaire. Durant son étude sur les éosinophiles, Brundage et ses collaborateurs ont montré que lors de la motilité cellulaire, il existe une polarité spatiale du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules : (a) une faible concentration calcique au front de migration, et (b) une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de la queue de rétractation (Brundage *et al.* 1991). Wei et ses collaborateurs ont ensuite apporté une notion de temporalité dans le signal calcique lors de la migration (Wei *et al.* 2009). En effet, au cours de la migration des fibroblastes, ils ont observé l'apparition de domaines calciques (les « *flickers* ») au front de migration médiés par le TRPM7 et le récepteur  $\text{IP}_3\text{R}2$ . Ainsi, il a été conclu que le signal calcique présente une spatio-temporalité nécessaire aux processus migratoires.

Par ailleurs, l'homéostasie du  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait être maintenue pendant les processus de signalisation activant la migration cellulaire. Il a été mis en évidence que l'activité des protéines STIM1 et des canaux SOC est finement régulée de manière spatio-temporelle afin de maintenir la motilité cellulaire (MacLennan et Kranias 2003, Liou *et al.* 2005, Brandman *et al.* 2007). Au cours, de la déplétion du RE, la protéine STIM1 s'active et est transportée à la périphérie cellulaire par les microtubules et transloquée à la jonction entre le RE et la membrane plasmique, activant les canaux ORAI (Grigoriev *et al.* 2008, Honnappa *et al.* 2009). Étant donné le rôle majeur de STIM1 et ORAI1 dans l'entrée SOCE, de nombreuses études ont confirmé leur rôle significatif dans la migration cellulaire et les métastases cancéreuses. Bien qu'il soit établi que ces protéines régulatrices de  $\text{Ca}^{2+}$  affectent la migration cellulaire, le mécanisme moléculaire n'est toujours pas totalement élucidé. En revanche, des études récentes ont montré que STIM1 participe au renouvellement des complexes d'adhésion focaux, de sorte que l'entrée SOCE aide à la migration cellulaire en maintenant les *flickers* (mentionnés précédemment) à l'avant de la cellule (Chen *et al.* 2011, Tsai *et al.* 2014). Lors du mouvement cellulaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant localement active la déplétion du RE au front de migration activant ainsi STIM1. STIM1 est ensuite transloquée vers la membrane plasmique au niveau du front de migration durant la migration cellulaire (Tsai *et al.* 2014). De plus, STIM1 est également colocalisée avec EB1, une protéine du système microtubulaire (Grigoriev *et al.* 2008, Honnappa *et al.* 2009).

Comme décrit ci-dessus, le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est régulé localement et globalement pour maintenir la migration cellulaire. D'un point de vue moléculaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  affecte également la dynamique de l'actine. Bien que le  $\text{Ca}^{2+}$  ne se lie pas directement à l'actine, il affecte les activités

de plusieurs protéines régulatrices de l'actine. Tout d'abord, le  $\text{Ca}^{2+}$  active la protéine kinase C (PKC) et les *Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein Kinases* (CaMK), interagissant toutes deux avec l'actine et affectant ainsi sa dynamique (Ohta *et al.* 1986, Larsson 2006, Hoffman *et al.* 2013). De plus, la signalisation calcique régule les Rho GTPases, qui sont indispensables à la polymérisation de l'actine au niveau des lamellipodes, des complexes d'adhésion focaux et des filopodes (Ridley *et al.* 2003, Evans et Falke 2007). En outre, l'activité de la cofiline, protéine impliquée dans la dépolymérisation de l'actine, dépend également du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Guan *et al.* 2007, Huang *et al.* 2011). Enfin, la myosine, l'une des principales protéines régulatrices de l'actine, est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  pour son activité (Tsai et Meyer 2012). Par conséquent, bien que n'étant pas un régulateur direct de la dynamique actinique, le  $\text{Ca}^{2+}$  module l'actine *via* de multiples voies de signalisation.

Par ailleurs, le  $\text{Ca}^{2+}$  affecte également la migration cellulaire *via* l'activité de la calpaïne. En tant que protéase intracellulaire dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , la calpaïne est impliquée dans le renouvellement des complexes d'adhésion focaux, particulièrement au niveau de la queue de rétraction des cellules migrantes. Il a été révélé que la calpaïne clivait plusieurs composants des complexes d'adhésion focaux, y compris la protéine taline, la paxilline et FAK (**Figure 26**) (Franco *et al.* 2004, Chan *et al.* 2010, Cortesio *et al.* 2011). Ce constat est compatible avec la notion, que nous avons introduit précédemment, indiquant que l'afflux de  $\text{Ca}^{2+}$  à l'arrière des cellules migrantes facilitait la rétraction et le détachement à leurs extrémités postérieures. Outre l'adhésion cellulaire, la calpaïne dégrade également la pompe PMCA (James *et al.* 1989). Étant donné le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  entre l'avant et l'arrière de la cellule, une diminution de la quantité de PMCA au niveau de la queue de rétraction peut résulter d'une concentration calcique et d'une activité de la calpaïne plus élevées qu'au front de migration (**Figure 30**) (Tsai *et al.* 2014, Tsai *et al.* 2015).



**Figure 26 : Rôle de la signalisation calcique dans la migration cellulaire.** Au niveau de la queue de rétractation, la concentration élevée de calcium maintient l’activation de la calpaïne permettant une dé-adhésion et un recyclage des points d’adhésion focaux optimal. A l’inverse, au front de migration, il règne une faible concentration calcique intracellulaire. Le maintien de la cellule au substrat est permis par des entrées calciques très localisées responsables de l’activité des protéines adhésives. (Tsai *et al.* 2015)

## 2. Le canal ORAI3

### a. Généralités sur les canaux ORAI

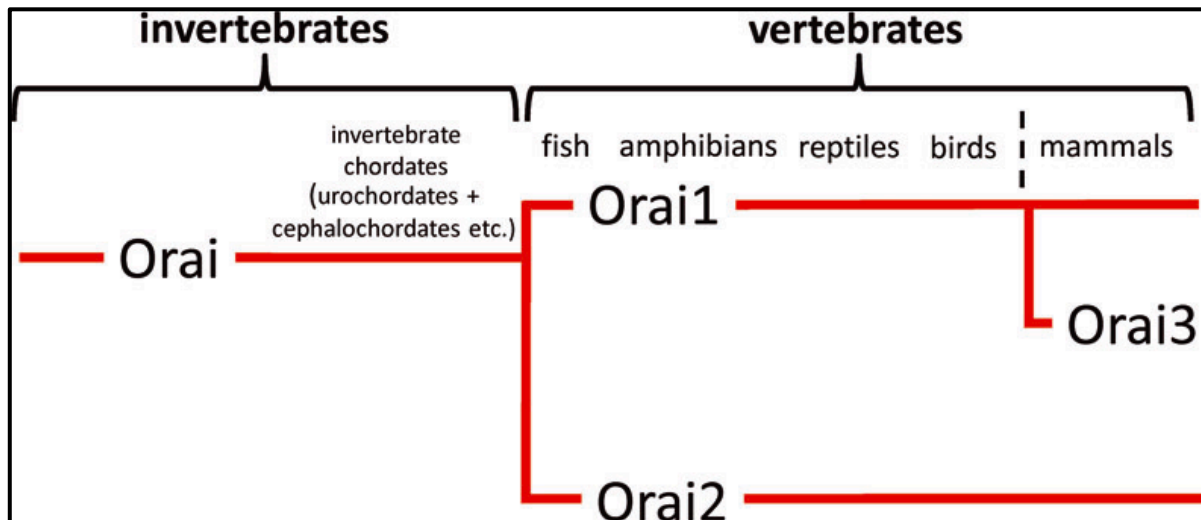
#### i. Découverte et classification des différents types d’isoformes

C’est en 2006, lors d’une étude sur les mécanismes moléculaires du déficit immunitaire combiné sévère (DICS), que les trois isoformes composant les canaux ORAI ont été mises en évidence. Le DICS est la conséquence d’un défaut d’activation des lymphocytes T consécutive à l’absence du courant  $I_{CRAC}$ , aboutissant à une inactivation du facteur de transcription NFAT (Feske *et al.* 2005). Lors de cette étude, ayant pour but d’identifier les partenaires protéiques impliqués dans cet influx calcique, Feske et ses collaborateurs, par des techniques de criblage moléculaire, ont mis en évidence une mutation non-sens en position 91 (R91W) au sein du gène codant pour une protéine inconnue qu’ils ont nommé ORAI1 (Feske *et al.* 2006). Durant ce travail, il a été démontré que cette mutation abolissait l’entrée calcique de type CRAC, son absence étant à l’origine du SCID. De plus, Feske et ses collaborateurs ont également identifié deux autres isoformes de cette protéine : ORAI2 et ORAI3 (Feske *et al.* 2006). Presque

simultanément, deux autres équipes menées par Vig et ses collaborateurs (Vig *et al.* 2006), ainsi que Zhang et ses collaborateurs (Zhang *et al.* 2006) ont révélé l'existence du gène CRACM1 (*CRAC Modulator 1* – découverte de son homologue CRACM2 également) codant pour une protéine responsable de l'entrée de type CRAC dans les cellules Jurkat et HEK293 (Vig *et al.* 2006). Ces deux appellations font référence à la même protéine, bien qu'ORAI soit la nomenclature la plus utilisée.

### *ii. Structure : Focus sur le canal ORAI3*

Chez l'être humain, et les autres mammifères, la famille protéique Orai est composée de 3 homologues : ORAI1, ORAI2 et ORAI3, qui sont codés par les gènes FLJ14466, C7orf19 et MGC13024 respectivement (Feske *et al.* 2006) ; provenant d'une protéine commune, la protéine ORAI, apparue initialement chez les invertébrés au cours de l'évolution (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Aedes*). La transition évolutive des métazoaires invertébrés aux Vertébrés a été associée à l'apparition des isoformes ORAI1 et ORAI2. Plus tard, lors de l'apparition des mammifères, la protéine ORAI3 a dérivé de son homologue ORAI1, pour former une protéine à part entière (**Figure 27**) (Shuttleworth 2012). Dans sa revue publiée en 2007, Cai écrit « *Lineage-specific expansion of protein families is believed to be the one of the primary means of adaptation and bringing new biological functions in organisms subject to diverse environmental selective pressure* » (Cai 2007), ce qui peut se transposer aux différents membres des canaux ORAI. Ainsi, d'un point de vue phylogénétique, ORAI1, ORAI2 et ORAI3 seraient apparus durant l'évolution afin d'accomplir des fonctions propres à chacun consenties par des propriétés biophysiques et physiologiques propres (Shuttleworth 2012).

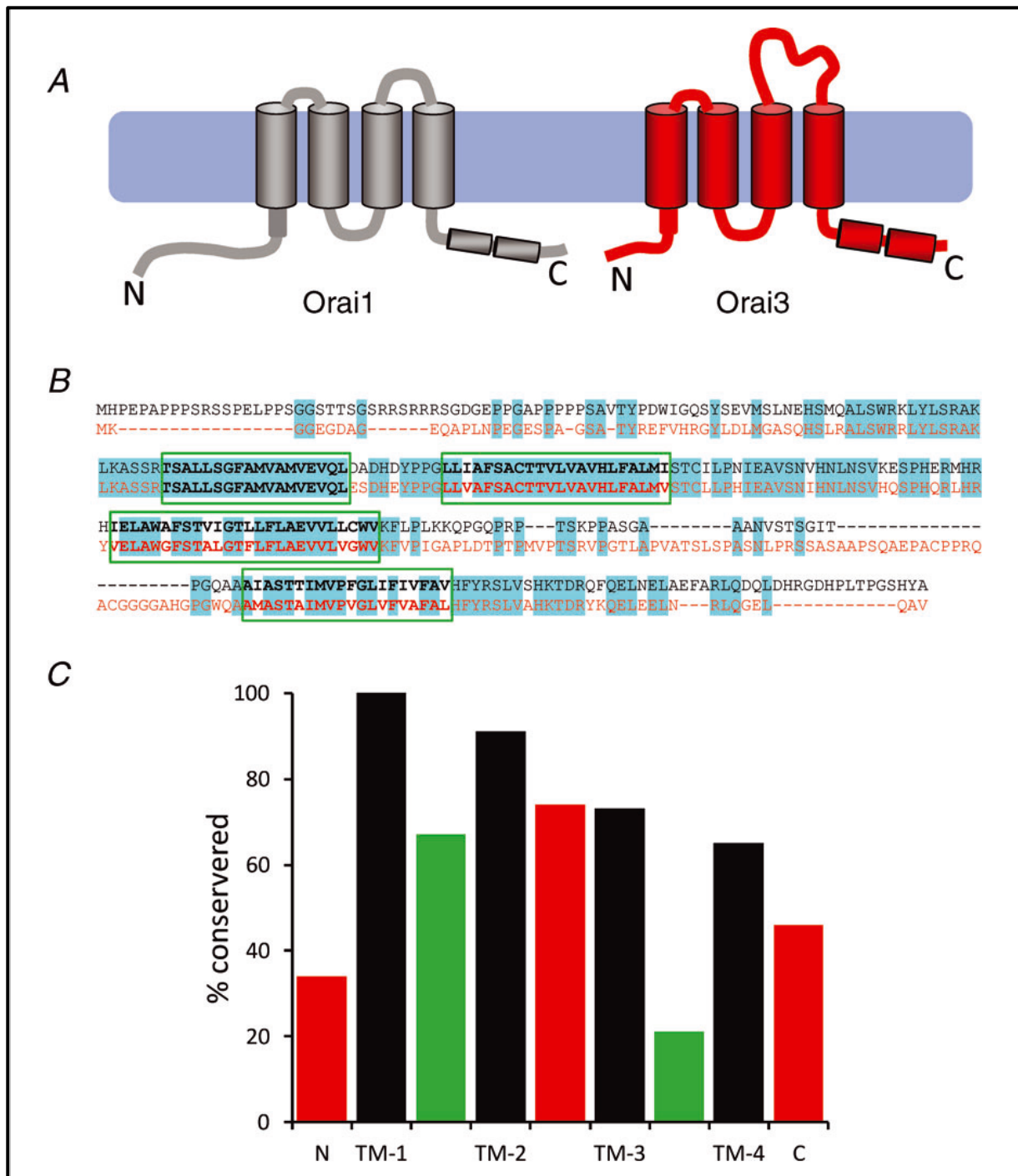


**Figure 27 :** Les différentes isoformes des canaux ORAI au cours de l'évolution. (Shuttleworth 2012)

D'autre part, de par leur ancêtre commun, les isoformes des canaux ORAI partagent une homologie de séquence, et par conséquent fonctionnelle, hautement élevée. D'un point de vue structurel, ils partagent aussi des ressemblances dans leur structure protéique (Shuttleworth 2012). Ainsi, les canaux ORAI sont composés de :

- Quatre domaines transmembranaires (TM1, TM2, TM3 et TM4) (Shuttleworth 2012).
- Un domaine protéique nommé « *coiled-coil region* » en position carboxy-terminale (C-ter) essentiel à l'interaction avec les protéines réticulaires STIM les activant lors d'une déplétion des stocks calciques réticulaires (Li *et al.* 2007, Muik *et al.* 2008, Frischauf *et al.* 2009).
- Un domaine de fixation à la CaM au niveau de l'extrémité amino-terminale (N-ter), permettant la régulation de l'activation des canaux ORAI (Mullins *et al.* 2009).
- ORAI1 peut être discriminé de ses deux homologues par une région N-ter riche en proline et arginine. ORAI3 se distingue par une boucle extracellulaire TM3 et TM4 plus allongé que ses homologues (Frischauf *et al.* 2008).

Se focalisant sur ORAI3, il a été mis en évidence que cette isoforme partage 63,2 % d'identité de séquence avec ORAI1 et 66,4 % avec ORAI2. Cependant, cette identité peut être différente en fonction des domaines protéiques comparés. Ainsi, les domaines transmembranaires d'ORAI3 partagent une identité de séquence presque parfaite (> 90 %) avec ORAI1 et ORAI2 (**Figure 28**) (Hewavitharana *et al.* 2007, Shuttleworth 2012).

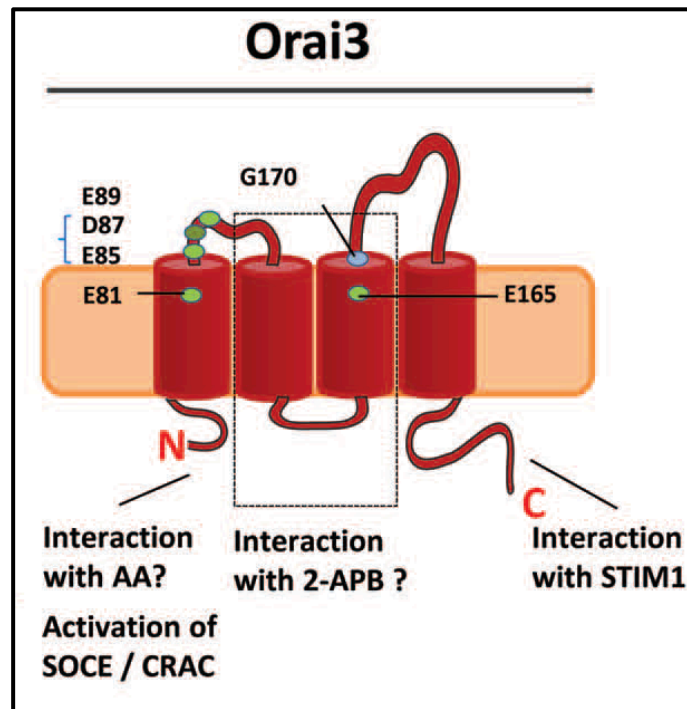


**Figure 28** : Comparaison structurelle des séquences des canaux ORAI1 et ORAI3. A. Représentation schématique des structures des canaux ORAI1 et ORAI3. B. Alignement des séquences protéiques de ORAI1 (noir) et ORAI3 (rouge). Les résidus conservés apparaissent en bleu. C. Graphique représentant le degré d'identité de séquences au sein des différentes régions d'ORAI1 et ORAI3. Les domaines cytosoliques sont en rouge, les domaines transmembranaires (TM-1-4) en noir et les domaines extracellulaires sont en vert. (Shuttleworth 2012)

D'un point de vue structurel, les domaines TM1 et TM3 d'ORAI3 présente la particularité de présenter des acides aminés spécifique conférant à ORAI3 une sélectivité élevée au  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, les résidus E81 et E165 situés respectivement dans TM1 et TM3 ainsi que les résidus E85, D87 et E89 présents dans la boucle extracellulaire entre TM1 et TM2 sont responsable de la sélectivité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 29**). En outre, il a été récemment mis en évidence le rôle du domaine TM3 et de la boucle extracellulaire entre le domaine TM3 et TM4 dans la régulation de l'ouverture du canal (Tiffner *et al.* 2021). En effet, deux acides aminés de ORAI1 et ORAI3, présents dans le domaine TM3, sont requis pour le maintien de la fermeture du pore canalaire mais également pour le changement conformationnel à l'origine de l'ouverture du canal (Tiffner *et al.* 2021).

Par ailleurs, contrairement aux canaux ORAI1, ORAI3 ne présente pas de sites de glycosylation. En effet, les protéines ORAI1 sont glycosylées au niveau du résidu N223 situé entre les domaines TM3 et 4, tandis que ORAI3 ne possède pas ce site consensus de la N-glycosylation (Gwack *et al.* 2007). De plus, ORAI1 est phosphorylée par la PKC au niveau des résidus S27 et S30. Cette modification post-traductionnelle est impliquée dans la régulation de la fonction canalaire des protéines ORAI1 (Kawasaki *et al.* 2010). Les protéines ORAI3, quant à elles, possèdent des sites de phosphorylation par la PKC bien qu'ils ne soient pas encore étudiés.





**Figure 29 : Structure du canal ORAI3.** Les canaux ORAI3 sont constitués de quatre segments transmembranaires. Les segments TM1 et TM3 ainsi que la boucle extracellulaire entre TM1 et TM2 présentent des acides aminés conférant la sélectivité élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (vert). Modifié à partir de (Motiani *et al.* 2013)

### *iii. Activation et régulation des canaux ORAI : Focus sur le canal ORAI3*

Fonctionnellement parlant, les canaux ORAI partagent également des traits fondamentaux communs :

- Indépendance vis-à-vis du voltage (Feske *et al.* 2006, Vig *et al.* 2006).
- Une sélectivité très élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  conférée par la présence au sein du domaine TM1 du résidu E81 (pour ORAI3), site de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ . Les résidus R91 et V102, au sein de TM1, sont également responsables de la perméabilité de  $\text{Ca}^{2+}$  par leur fonction de charnière du pore canalaire (étude menée sur ORAI1). En revanche, en présence de cations monovalents et absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , il a été rapporté que ORAI3 présentait un courant sodique plus élevé que ORAI1 et ORAI2 (McNally *et al.* 2009).
- Grand courant entrant à -80 millivolts (mV) (Shuttleworth 2012).
- Relation intensité/tension (Courbe I/V) à forte rectification entrante (conductance unitaire faible) (Prakriya *et al.* 2006).

### **Pharmacologie des canaux ORAI.**

A ce jour, aucune molécule pharmacologique n'a prouvé une efficacité absolue, par sa spécificité propre à chaque isoforme, sur les canaux ORAI. Néanmoins, certaines molécules ont montré une action (activation ou inhibition) bien qu'elles ne soient pas fondamentalement spécifiques. Parce qu'ils sont hautement sélectifs au  $\text{Ca}^{2+}$ , les canaux ORAI sont sujet à une inhibition de leur courant par les lanthanides tels que le  $\text{La}^{3+}$  (50 – 100  $\mu\text{M}$ ) et le  $\text{Gd}^{3+}$  (1 – 5  $\mu\text{M}$ ) par leur fixation au niveau des boucles extracellulaires des canaux ORAI, bien que ces éléments soient capables d'inhiber d'autres canaux calciques (McNally *et al.* 2009, Hou *et al.* 2012, Hou *et al.* 2018).

D'autres molécules non spécifiques peuvent être ajoutées à cette liste d'inhibiteurs :

- SKF96365, ML-9 (inhibiteur de la *Myosin Light-Chain Kinase*, MLCK), RO2959 (Smyth *et al.* 2008, Varnai *et al.* 2009, Tian *et al.* 2016).
- BTP2 (dérivé du bistrifluorométhyl-pyrazole) et GSK7975A : inhibe complètement ORAI1 et ORAI2, et partiellement ORAI3 à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  (Zitt *et al.* 2004, Zhang *et al.* 2020).

- IA65 (10  $\mu\text{M}$ ) : Potentialise considérablement les courants ORAI1 et légèrement les courants ORAI3 et inhibe les courants ORAI2. De façon intéressante, les courants médiés par les dimères ORAI1-ORAI1, ORAI1-ORAI3 et ORAI2-ORAI3 sont potentialisés. En revanche, IA65 réduit légèrement les courants médiés par le dimère ORAI1-ORAI2 suggérant ainsi que le profil pharmacologique d'ORAI2 est dominant par rapport à celui d'ORAI1 lors de l'hétérodimérisation d'ORAI1 et ORAI2 (Zhang *et al.* 2020).
- Synta66 (10  $\mu\text{M}$ ) inhibe les courants ORAI1 et potentialise les courants ORAI2. En revanche, la Synta66 n'a aucun effet sur les courants ORAI3. Dans le cas de dimères ORAI1-ORAI1, ORAI1-ORAI2, ORAI1-ORAI3, la Synta66 inhibe les courants médiés par ces dimères. Tandis que le dimères ORAI2-ORAI3 est insensible au traitement (Zhang *et al.* 2020).

Le composé qui a été le plus étudié est le 2-APB (2-aminoethoxydiphenyl borate). En effet, le 2-APB agit différemment sur les trois isoformes. Tandis que son action sur les isoformes ORAI1 et ORAI2 se limite à une potentialisation de l'entrée calcique à faible concentration ( $< 10 \mu\text{M}$ ) et une profonde inhibition à des concentrations supérieures (DeHaven *et al.* 2008, Peinelt *et al.* 2008). En effet, il a été démontré que le 2-APB à faible concentration se présente comme un agoniste des canaux ORAI1 et ORAI2 lors l'activation de ces derniers par STIM1. A l'inverse, il bloque l'activation des canaux ORAI1 et ORAI2 à forte concentration en changeant l'architecture du pore canalaire (Peinelt *et al.* 2008). De façon intéressante, il a été démontré que le mécanisme d'activation d'ORAI3 par le 2-APB réside dans l'augmentation de la taille du pore canalaire d'ORAI3 de 3,8 Å (angström) à 5,3 Å (Schindl *et al.* 2008). Le 2-APB interagit avec ORAI3 au niveau du résidu glutamate E165. En effet, la modification de ce résidu en un résidu glutamine Q inhibe la réponse au 2-APB (Schindl *et al.* 2008). De plus, les domaines transmembranaires TM2 et TM3 du canal ORAI3 ont été rapportés comme étant primordiaux dans cette interaction (**Figure 29**) (Zhang *et al.* 2008). Cette potentialisation des canaux ORAI3 par le 2-APB a été décrite comme étant réalisable à haute concentration (30 – 50  $\mu\text{M}$ ) (Lis *et al.* 2007). En revanche, les canaux ORAI3 activés par le 2-APB présentent une sélectivité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  amoindrie et accrue pour les cations monovalents (Schindl *et al.* 2008). De la même façon, il a également été démontré que le canal ORAI3 est formé d'un dimère ORAI3-ORAI3 lors de son activation par le 2-APB, bien qu'il ne présente plus sa sélectivité élevée pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Demuro *et al.* 2011). De plus, il a été montré la modification du profil pharmacologique du 2-APB en fonction des sous-unités formant les canaux ORAI (Kappel *et*

al. 2020). En effet, il a été démontré que l'insertion d'au moins deux sous-unités ORAI3 dans un canal ORAI formé d'un hétéromultimère ORAI1-ORAI3 permet d'augmenter les courants induits par le 2-APB indépendamment de la déplétion des stocks calciques réticulaires ou de l'interaction avec STIM1 (Kappel *et al.* 2020). En revanche, le canal ORAI1-ORAI3 présentant une seule sous-unité ORAI3 ne peut être activé par le 2-APB (Kappel *et al.* 2020).

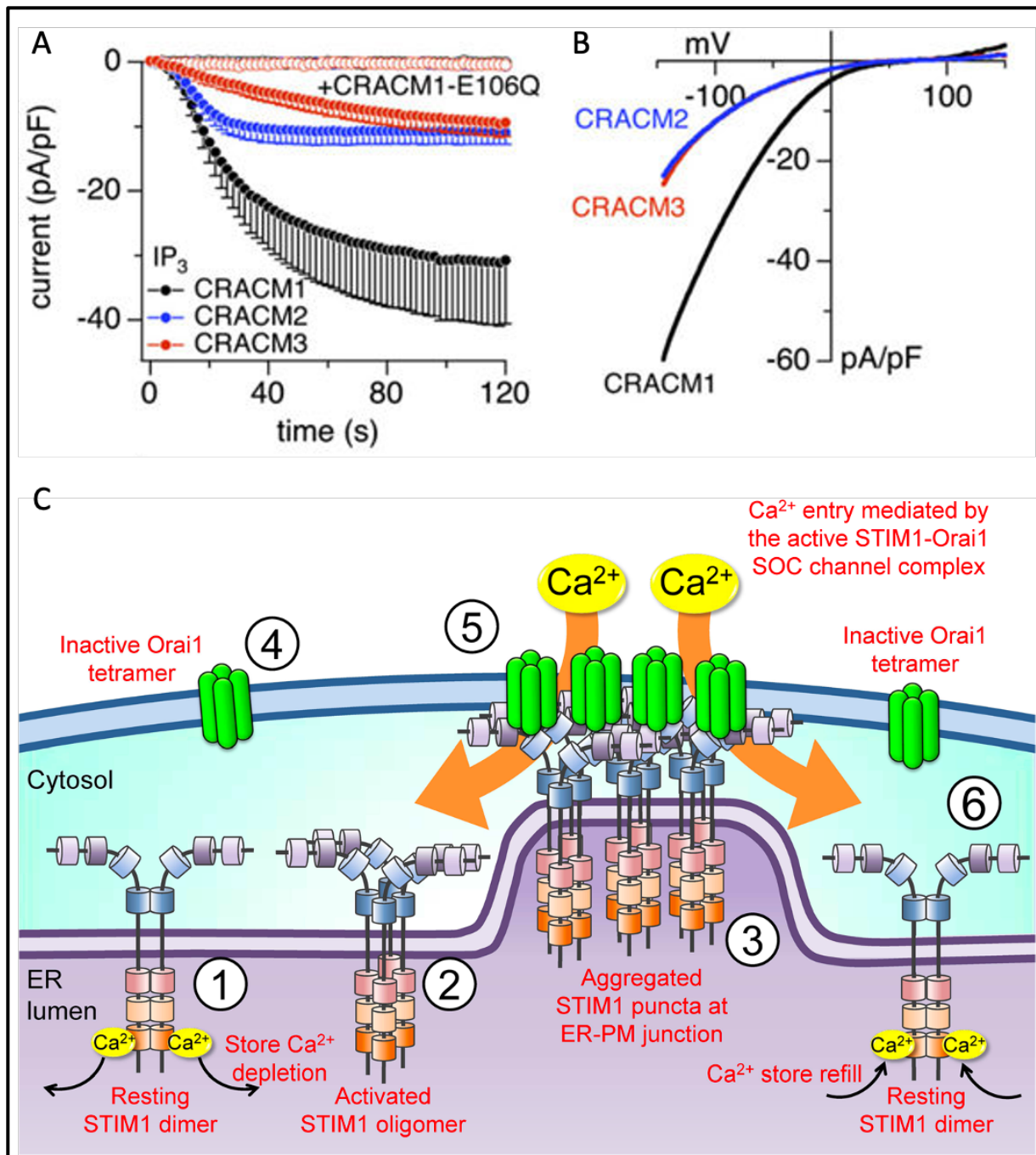
Toutefois, l'action pharmacologique du 2-APB ne se résume pas seulement aux canaux ORAI. Il a été caractérisé initialement comme un inhibiteur des IP<sub>3</sub>R (Maruyama *et al.* 1997, Prakriya et Lewis 2001), puis par la suite comme modulant l'activité de divers membres de la famille TRP (Voets *et al.* 2001, Trebak *et al.* 2002, Hu *et al.* 2004, Li *et al.* 2006), et de la pompe SERCA (Missiaen *et al.* 2001, Peppiatt *et al.* 2003).

### **L'entrée calcique dépendante de la vidange calcique du RE (SOCE).**

L'entrée de type SOCE (SOCE) est la voie majeure d'entrée du Ca<sup>2+</sup> dans la cellule épithéliale. Le mécanisme précis de cet influx calcique a été largement étudié et repose sur un mécanisme protéique d'origine réticulaire. En effet, lors de la déplétion des stocks calciques du RE, les protéines STIM détectent la diminution de la quantité de calcium réticulaire (par leur dissociation des ions Ca<sup>2+</sup> (implication d'un domaine *EF-hand*) et s'oligomérisent (*via* leur domaine SAM pour *Sterile Alpha Motif*). Cette agrégation des protéines STIM permet une redistribution de STIM en structures nommées *puncta* primordiales dans l'activation des canaux ORAI. L'extrémité C-ter des agrégats de STIM se dissocient ensuite pour dévoiler les domaines *coiled-coil region* et CAD/SOAR (*CRAC-Activating Domain* et *Stim1 Orai-Activating Region*) responsables de l'interaction avec le domaine *coiled-coil region* à l'extrémité C-ter des canaux ORAI entraînant leur activation (**Figure 30**). A la suite du remplissage du RE (reformation des stocks calciques), la fixation des ions Ca<sup>2+</sup> au domaine *EF-hand* des protéines STIM entraîne leur dissociation avec les protéines ORAI résultant en une inactivation de l'influx calcique médié par les canaux ORAI (Li *et al.* 2007, Frischauf *et al.* 2008, Muik *et al.* 2008). Moléculairement parlant, un dimère de protéines STIM interagit et active une sous-unité des canaux ORAI (**Figure 30**) (Palty *et al.* 2017, Zhou *et al.* 2017). Durant ce processus, les deux molécules STIM1 formant le dimère agissent de concert pour activer ORAI1 de façon maximale (Palty *et al.* 2017). De plus, il a également été mis en évidence, qu'à l'état activé, les canaux ORAI sont associés selon une stœchiométrie en hexamère (Hou *et al.* 2012, Cai *et al.* 2016, Hou *et al.* 2018). Ainsi, douze dimères de STIM1 seraient nécessaires à l'activation maximale

du canal ORAI1 (Palty *et al.* 2017). Par ailleurs, Cai et ses collaborateurs ont également démontré l'implication de l'ensemble des sous-unités constituant l'hexamère dans la fonction du canal (Cai *et al.* 2016). En effet, ils ont montré que l'insertion d'une sous-unité présentant une mutation dans le domaine codant le pore canalair décroît l'entrée de calcium, et cela peu importe la position de la sous-unité en question dans l'hexamère (Cai *et al.* 2016).

En 2017, il a été rapporté par Palty et ses collaborateurs que le domaine activateur SOAR de STIM1 se fixe à ORAI1 pour l'activer de façon séquentielle (Palty *et al.* 2017). En effet, les domaines SOAR du dimère de STIM1 se fixe à une sous-unité ORAI1, l'activant ainsi partiellement. Puis, séquentiellement, les autres dimères se fixent de la même façon aux autres sous-unités formant l'hexamère ORAI1 les uns à la suite des autres pour activer ORAI1 complètement (Palty *et al.* 2017). Par ailleurs, en 2020, il a été révélé un nouveau mécanisme par lequel l'hétéromérisation des canaux ORAI influx le signal calcique (Yoast *et al.* 2020). Durant ce processus, les canaux ORAI2 et ORAI3 peuvent s'hétéromériser avec ORAI1 permettant ainsi de moduler les signaux calciques dépendants d'une activation de divers récepteurs, reflétant une amélioration de la liaison des protéines STIM1 aux canaux ORAI ainsi qu'une inactivation dépendante du  $Ca^{2+}$  élevée (Yoast *et al.* 2020). Au cours de leur étude, les auteurs ont mis en évidence que la SOCE est essentielle au maintien d'oscillations calciques intracellulaires et que ces dernières sont dépendantes d'ORAI2 et ORAI3 lors de leur activation par STIM1 (Yoast *et al.* 2020). Par ailleurs, il a été découvert que les canaux CRAC sont formés d'hétéromultimères composés de différentes sous-unités ORAI (Yoast *et al.* 2020). Les canaux ORAI sont également inhibés lors de leur hétéromérisation avec d'autres sous-unités ORAI1 (Yoast *et al.* 2020). En effet, l'invalidation fonctionnelle d'ORAI2 et ORAI3 augmente la SOCE. Ainsi, il a été conclu que l'interaction d'ORAI2 et ORAI3 avec ORAI1 permet une inactivation dépendante du  $Ca^{2+}$  du canal ORAI formé (Yoast *et al.* 2020).



**Figure 30 : Mécanismes d'activation des canaux ORAI par STIM1.** A. Amplitude de la densité de courant suite à la déplétion des stocks calciques réticulaires induite par l'IP<sub>3</sub>. B. Courbes I/V correspondantes à l'amplitude de courant. CRACM1, CRACM2 et CRACM3 représentant ORAI1, ORAI2 et ORAI3 respectivement. C. Activation des canaux ORAI1 dépendante de STIM1. Modifié à partir de (Lis *et al.* 2007, Chen *et al.* 2013)

En 2015, Holzmann et ses collaborateurs avait déjà rapporté la possible hétéro-multimérisation des sous-unités ORAI1 et ORAI3, pour former des canaux qu'ils ont nommés  $I_{CRAC}$  modifiés (Holzmann *et al.* 2015). En utilisant le profil de sensibilité différentielle aux ROS (Espèces Réactives de l'Oxygène) d'ORAI1 par rapport à ORAI3 (ORAI3 n'ayant pas de résidu cystéine sensible aux ROS qui fait d'ORAI1 un canal sensible aux ROS – remplacé par un résidu glycine (**Figure 29**)). De façon intéressante, les auteurs ont démontré durant leur étude que les cellules cancéreuses de la prostate étaient plus sensibles aux ROS par rapport aux cellules épithéliales prostatiques saines (Holzmann *et al.* 2015).

### **L'influx calcique indépendant de la déplétion des stocks calciques intracellulaires (SICE).**

Certaines études ont montré une modulation de l'entrée calcique par ORAI1, nommée SICE (pour *Store-Independent Calcium entry*), qui ne dépend pas des stocks calciques réticulaires. En effet, en 2010, Feng et ses collaborateurs ont démontré un autre mode d'activation des canaux ORAI1. Dans les cellules cancéreuses mammaires lumineales ER<sup>+</sup>, ORAI1 s'active indépendamment de STIM1, et régule l'entrée basale du Ca<sup>2+</sup> et l'homéostasie du Ca<sup>2+</sup> (Feng *et al.* 2010). Ce mécanisme fait intervenir la pompe SPCA2 située dans l'appareil de Golgi. Il a été démontré que SPCA2 *via* son extrémité N-ter interagit physiquement avec ORAI1 au niveau de la membrane plasmique, entraînant ainsi son activation par son extrémité C-ter et permettant une augmentation de la concentration basale de Ca<sup>2+</sup>. Fait intéressant, le couplage SPCA2/ORAI1 a également été montré dans un modèle cellulaire de lactation (Cross *et al.* 2013). En effet, SPCA2 et ORAI1 ont été retrouvés colocalisés dans les cellules épithéliales mammaires murines sécrétrices de lait lors de la lactation. Ce couplage, permettant la SICE, intervient dans le processus d'enrichissement calcique du lait. La SICE induit par le couplage ORAI1/SPCA2 a également été montré dans la lignée cellulaire cancéreuse MCF-7 (de type lumineale ER<sup>+</sup>), où elle régule la prolifération cellulaire (Feng *et al.* 2010). De plus, notre équipe a rapporté que SPCA2 constitue également un complexe avec les canaux potassiques dépendants du voltage Kv10.1 dans cette lignée cellulaire et permet leur trafic du Golgi vers la membrane plasmique (Peretti *et al.* 2019). Les extrémités N-ter et C-ter de SPCA2 sont toutes deux impliquées dans ce trafic (Girault *et al.* 2021). En effet, SPCA2 régule la localisation et l'activité des canaux Kv10.1 et ORAI1, régulant ainsi la SICE. L'entrée SICE, d'une part, permet le trafic intracellulaire des canaux Kv10.1 et ORAI1 au niveau de la membrane plasmique, et d'autre part active Erk1/2 favorisant ainsi la survie des cellules ensemencées sur

une matrice composée de collagène de type I (Badaoui *et al.* 2018, Peretti *et al.* 2019, Girault *et al.* 2021).

Dans les cellules cancéreuses mammaires de type basal, ORAI1 forme un complexe fonctionnel ou physique avec les canaux potassiques. L'activité des canaux potassiques permet l'efflux des ions potassium ( $K^+$ ) qui induit l'hyperpolarisation du potentiel membranaire, augmentant ainsi la force électromotrice du  $Ca^{2+}$  qui favorise son entrée dans la cellule (Schwab *et al.* 2008). Le canal Kv10.1 et le canal potassique activé par le  $Ca^{2+}$  SK3 se sont avérés fonctionner en partenariat avec ORAI1. En effet, ces canaux  $K^+$ , en modulant le gradient électrochimique du  $Ca^{2+}$ , favorisent l'entrée du  $Ca^{2+}$ . Pour ces deux canaux, il a été constaté qu'ORAI1 était le principal acteur de l'entrée constitutive du  $Ca^{2+}$ . En effet, Kv10.1 et SK3 régulent fonctionnellement l'entrée de  $Ca^{2+}$  *via* ORAI1 régulant ainsi la migration cellulaire. De plus, Kv10.1 et ORAI1 sont surexprimés dans les tumeurs mammaires invasives et dans les cellules cancéreuses qui ont envahies les ganglions lymphatiques (Hammadi *et al.* 2012). D'autre part, il a été démontré que l'inhibition de SK3 inhibe les métastases osseuses. Ce processus s'explique par le fait que, dans la lignée cellulaire basale MDA-MB-435S, ORAI1 est recrutée avec SK3 au niveau des radeaux lipidiques. Une entrée de  $Ca^{2+}$  est observée ensuite, suite à l'hyperpolarisation dépendante de SK3 qui augmente le gradient électrochimique du  $Ca^{2+}$  (Chantome *et al.* 2013). De plus, la même équipe a montré une implication de la protéine SigmaR1 dans l'activité et la localisation de SK3 et ORAI1 dans les radeaux lipidiques (Gueguinou *et al.* 2017). La SICE *via* le couplage ORAI1/SK3/SigmaR active la calpaïne conduisant la migration cellulaire dans la lignée cellulaire MDA-MB-435S (Chantome *et al.* 2013).

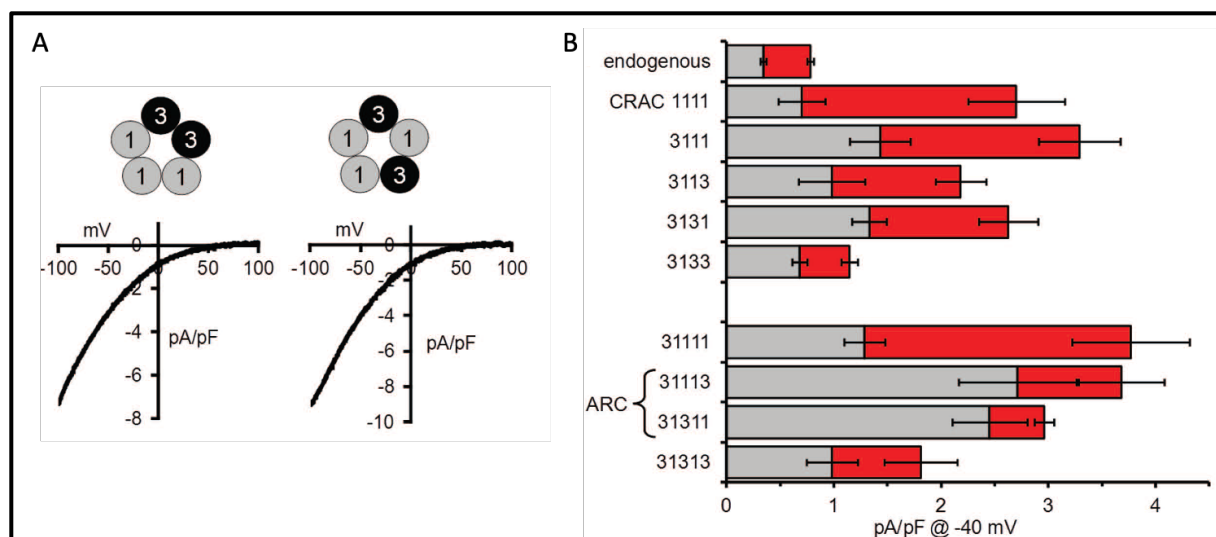
Depuis quelques années, un autre mode d'entrée calcique a été mis en évidence. En effet, en association avec ORAI1, les canaux ORAI3 contribuent à une entrée calcique indépendante de la déplétion des stocks calciques réticulaires. Durant ce phénomène, ORAI3 et ORAI1 s'associent en hétéromultimères pour former les canaux ARC (pour *Arachidonic acid-regulated  $Ca^{2+}$  Channels*) ou les canaux LRC (pour *Leukotriene C4-stimulated  $Ca^{2+}$  channels*). Cependant, bien que leur indépendance vis-à-vis de la déplétion calcique réticulaire est établie, l'activation de ces canaux est fortement dépendante des protéines STIM1. Il est également à noter que les canaux ARC et LRC partagent des propriétés électrophysiologiques comparables à celles des canaux SOC :

- Présentent une sélectivité élevée pour le  $Ca^{2+}$ .



- Sont responsables d'un courant entrant à forte rectification entrante.
- Présentent un potentiel d'inversion positif.
- Sont perméables aux cations monovalents, en absence de cations divalents.

La spécificité des canaux ARC réside dans leur activation qui est dépendante de faibles concentrations d'acide arachidonique (AA) agissant au niveau intracellulaire. En présence d'une faible concentration de son agoniste, la phospholipase A2 activée par les récepteurs couplés aux protéines G produit l'AA responsable de l'activation des canaux ARC. Par ailleurs, les canaux calciques ARC présentent également la particularité d'être dépendants de protéines STIM1 insérées dans la membrane lors de leur activation (Mignen *et al.* 2007). D'un point de vue structurel, le pore du canal ARC est formé par un assemblage de cinq sous-unités ORAI1 et ORAI3 formant ainsi un hétéropentamère : deux sous-unités ORAI3 s'associent à trois sous-unités ORAI1 arrangées dans l'ordre 31311 ou 31113 (où 1 et 3 représentent ORAI1 et ORAI3 respectivement) (**Figure 31**) (Thompson *et al.* 2010). De plus, la sous-unité ORAI3 confère la sensibilité à l'AA du canal formé *via* son domaine N-ter cytosolique. Cependant, contrairement aux canaux SOC, les canaux ARC sont insensibles au 2-APB et à l'inactivation induite par la dépolarisation membranaire. A l'inverse, ils peuvent être inhibés par les lanthanides comme les canaux SOC (Mignen *et al.* 2003). L'implication d'ORAI3 dans les canaux ARC a été mise en évidence dans les cellules HEK293 (Mignen *et al.* 2007). En effet, l'introduction du dominant-négatif d'ORAI3 (E81Q) dans des cellules HEK293 surexprimant d'une façon stable les sous-unités ORAI1 et la protéine STIM1 provoque une abrogation complète du courant ARC. D'une façon similaire, l'invalidation moléculaire d'ORAI3 réduit le courant ARC (Mignen et Shuttleworth 2000, Mignen *et al.* 2003, Mignen *et al.* 2007, Thompson *et al.* 2010, Thompson et Shuttleworth 2012).



**Figure 31** : Le canal ARC est formé d'un pentamère de 3 sous-unités ORAI1 et 2 sous-unités ORAI3. A. Courbes I/V correspondantes à l'amplitude de courant des pentamères formés des sous-unités ORAI représentant le canal ARC. B. Courant ARC et CRAC mesurés à -40 mV dans des cellules HEK-293 exprimant différentes constructions de canaux ORAI. Seul les hétéro-pentamères 31113 et 31311 présentent un courant ARC majoritaire (Rouge) tandis que les autres constructions présentent majoritairement un courant CRAC (Gris). Modifié à partir de (Thompson et Shuttleworth 2013)

Dans un modèle de cancer de la prostate, il a été établi le rôle des canaux ARC dans la progression tumorale (Dubois *et al.* 2014). Durant cette étude, les auteurs ont observé que l'extinction moléculaire d'ORAI1 dans les cellules surexprimant ORAI3 entraîne une diminution de la croissance tumorale, suggérant ainsi qu'ORAI3 nécessite la présence d'ORAI1 dans la tumorigenèse de la prostate, ce qui pourrait être au moins partiellement dû au fait que les canaux ARC sont constitués d'hétéromultimères ORAI3-ORAI1 (Dubois *et al.* 2014).

Les canaux LRC ont, quant à eux, été mis en évidence dans les cellules musculaires lisses vasculaires, où ils sont activés par la thrombine. En effet, la thrombine induit une SICE, générée par ORAI3 et ORAI1 et dépendante de STIM1 (Zhang *et al.* 2013). Cette voie, hautement sélective pour le  $Ca^{2+}$ , nécessite des leucotriènes  $C_4$  intracellulaires, produits suite à la liaison de la thrombine à son récepteur. Au cours de ce processus, il a été montré que les protéines STIM1 situées au niveau du RE sont nécessaires et suffisantes à l'activation des canaux LRC. Peu de données sont disponibles concernant ce mécanisme. Dans des conditions basales, STIM1 est pré-couplée à ORAI3, via le domaine *coiled-coil region* de STIM1 (Gonzalez-Cobos *et al.*

2013, Zhang *et al.* 2013). Cependant, la stœchiométrie exacte des canaux LRC, les mécanismes d'action de LTC<sub>4</sub>, ainsi que les voies de signalisation et facteurs de transcription activés par cette entrée calcique demeurent encore incompris.

#### b. Les canaux ORAI3 dans la physiopathologie

##### **Les pathologies cardiaques**

Durant l'hypertrophie cardiaque, ORAI3 permet les courants dépendants de l'acide arachidonique et de STIM1, bien que ORAI1 et ORAI3 soient tous deux exprimés dans les cardiomyocytes adultes (Saliba *et al.* 2015). Par ailleurs, il a également été découvert le rôle prépondérant d'ORAI3 dans l'intégrité sarcomérique ainsi que dans le fonctionnement mitochondrial cardiaque dans un modèle murin (Gammons *et al.* 2021). En effet, la délétion d'ORAI3 induit une cardiomyopathie dilatée sévère chez les souris, conséquence d'une atteinte mitochondriale cardiaque et de sarcomères aberrants (Gammons *et al.* 2021). De plus, il a été mis en évidence un rôle protecteur d'ORAI3 dans l'hypertrophie cardiaque (Keck *et al.* 2019). Cet effet protecteur est supporté par une entrée calcique dépendante de *Tumor necrosis factor α* (TNFα) *via* ORAI3. En effet, l'inhibition d'ORAI3 dans les cellules inflammatoires CD11b/c accélère l'insuffisance cardiaque dans un modèle d'hypertrophie chez le rat. Ainsi, l'activité d'ORAI3 dans ces cellules exerce un effet protecteur contre les effets délétères de l'hypertrophie cardiaque en favorisant la résistance au stress oxydatif (Keck *et al.* 2019).

##### **L'inflammation**

Bogeski et ses collaborateurs ont montré un rôle intéressant d'ORAI3 dans les lymphocytes T exposés à un stress oxydatif élevé (Bogeski *et al.* 2010). Pendant un stress oxydatif, ORAI1 est inhibé par les ROS contrairement à ORAI3. Ainsi, ORAI3 reste fonctionnel en condition de stress oxydatif. L'expression d'ORAI3 est élevée dans les lymphocytes T effecteurs par rapport aux lymphocytes T auxiliaires, suggérant que les lymphocytes T effecteurs, pendant l'inflammation, utilisent ORAI3 pour assurer une entrée calcique nécessaire à la prolifération cellulaire et à la sécrétion des cytokines (Bogeski *et al.* 2010). Cette transition de l'expression d'ORAI3 est couplée à une diminution du rapport ORAI1/ORAI3, rendant les lymphocytes moins sensibles aux ROS (Bogeski *et al.* 2010). Par ailleurs, il a également été découvert très récemment que les cellules T CD4<sup>+</sup> de patients atteints de rhumatismes psoriasique et de

polyarthrite rhumatoïde présentent une expression accrue d'ORAI3 augmentant ainsi l'activité du canal ARC et rendant les cellules T sensibles à l'acide arachidonique et contribuant à l'inflammation chronique observée lors de ces pathologies (Ye *et al.* 2021). De plus, la stimulation du canal ARC avec de l'acide arachidonique induit un afflux de Ca<sup>2+</sup> responsable de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> (Ye *et al.* 2021). Cette augmentation de l'expression d'ORAI3 est causée par une expression réduite d'IKAROS, un répresseur transcriptionnel du promoteur du gène *Orai3*. En outre, l'inactivation fonctionnelle d'ORAI3 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> atténue l'inflammation dans un modèle murin (Ye *et al.* 2021).

### **Les pathologies vasculaires**

Des études récentes montrent que l'expression d'ORAI3 augmente lors d'une hyperplasie de l'intima et contribue à la formation de canaux LRC responsables de l'entrée calcique dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Gonzalez-Cobos *et al.* 2013). En effet, l'inhibition d'ORAI3 par siARN diminue aussi bien les courants LRC que la formation néo-intimale (Gonzalez-Cobos *et al.* 2013). De plus, il a été montré que ORAI3 en association avec la leukotriène-C4 synthase module l'activité de la protéine Akt pour promouvoir la migration des cellules musculaires lisses vasculaire et la formation néointimale (Zhang *et al.* 2015). Par ailleurs, il a également été mis en évidence une accumulation d'ORAI3 à la surface des cellules musculaires lisses vasculaires en réponse au VEGF (Li *et al.* 2015). Durant ce processus, le VEGF induit l'accumulation d'ORAI3 à la membrane des cellules induisant un remodelage endothélial *via* une entrée calcique par ORAI3 activé par l'acide arachidonique (Li *et al.* 2015).

### **L'excitabilité neuronale**

Il a été rapporté un rôle d'ORAI3 dans l'excitabilité des neurones de la racine dorsale (ganglion spinal) (Wei *et al.* 2017). En effet, l'extinction moléculaire d'ORAI3 (et ORAI1) abolit la dépolarisation membranaire des neurones induite par la déplétion des stocks calciques réticulaires. Ainsi, ORAI3 aurait une action excitatrice dans les neurones de la racine dorsale permettant ainsi de moduler la réponse à la douleur (Wei *et al.* 2017).

### c. Canaux ORAI3 et cancers

Les canaux ORAI jouent des rôles distincts dans différents sous-types de cancer du sein. Les isoformes ORAI1 et ORAI3, en particulier, ont été trouvées surexprimées dans le cancer du sein. Concernant ORAI3, il a été trouvé surexprimé dans 76,9 % de tumeurs cancéreuses mammaires par rapport aux prélèvements mammaires non tumoraux (Faouzi *et al.* 2011). De plus, une corrélation positive entre ORAI3 et l'expression transcriptionnelle du proto-oncogène c-Myc dans les tissus mammaires cancéreux a également été rapportée. Cette étude indique que cette corrélation entre ORAI3 et c-Myc est supportée par la voie de signalisation des MAP kinases (**Figure 32**) (Faouzi *et al.* 2013). En analysant ORAI3 dans des échantillons cliniques de cancer du sein, grâce à l'analyse d'un ensemble de données publiques, Hasna et ses collaborateurs ont proposé ORAI3 comme marqueur prédictif de la résistance aux drogues chimiothérapeutiques (Hasna *et al.* 2018). En effet, ils ont montré que la surexpression d'ORAI3 augmente la concentration calcique intracellulaire responsable de la diminution d'expression de la protéine P53 via la voie PI3K/Sgk1 (Sgk1 pour *serum and glucocorticoid-regulated kinase 1*) (**Figure 32**). Par la suite, une étude menée par Azimi et ses collaborateurs a rapporté une sensibilité d'ORAI3 à l'hypoxie. Ils ont observé une augmentation de l'expression d'ORAI3 en réponse à l'hypoxie dans les cellules cancéreuses mammaires basales et luminales, et ont identifié l'hypoxie et le facteur inductible par l'hypoxie 1 $\alpha$  (HIF1- $\alpha$ ) comme régulateurs de l'expression d'ORAI3 dans ces types de lignées cellulaires (Azimi *et al.* 2019). Enfin, l'expression transcriptionnelle d'ORAI3 est régulée par les microARN, notamment miR34A et miR18A/B qui inhibent et activent respectivement l'expression d'ORAI3 (Vashisht *et al.* 2018). D'autre part, une association entre les canaux ORAI3 et ORAI1 et les canaux TRPC6 a été rapportée dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (Jardin *et al.* 2018). En effet, l'activité calcique de TRPC6 permet à ces deux isoformes des canaux ORAI d'être transloquées au niveau de la membrane plasmique permettant ainsi de moduler l'afflux de Ca<sup>2+</sup> dans les cellules (Jardin *et al.* 2018).

En 2011, Faouzi et ses collaborateurs ont montré que la transfection d'un siORAI3 entraîne une diminution de la prolifération et de la survie des cellules cancéreuses mammaires luminales ER<sup>+</sup>, pouvant être le résultat de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. Ils ont également précisé que l'arrêt du cycle cellulaire, en absence d'ORAI3 est consécutif à une diminution de l'expression des cyclines D1 et E et des CDK2 et 4 (CDK pour *Cyclin-Dependent Kinase*). L'invalidation moléculaire d'ORAI3 a conduit également à l'apoptose par l'intermédiaire d'une augmentation de l'expression de p53 et de p21 mais également de l'expression de Bax résultant

en une élévation du ratio Bax/Bcl-2 dans la lignée cancéreuse MCF-7 (**Figure 32**) (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013). Le rôle d'ORAI3 dans la survie des cellules cancéreuses mammaires ER<sup>+</sup> a été confirmé par l'étude de Pangburn et ses collaborateurs. En effet l'encapsulation de petits siARN ciblant ORAI3 dans des polymersomes capables de délivrer ces siORAI3 aux cellules a permis d'établir que la viabilité des cellules cancéreuses T47D diminue dans la condition siORAI3, alors que la viabilité des cellulaires mammaires saines MCF-10A n'est aucunement affectée. Les mêmes auteurs ont également montré que l'entrée SOCE dans les cellules MCF-7 n'est pas compensée par une activité d'ORAI1 lors de l'absence du canal ORAI3 (Pangburn *et al.* 2012). L'équipe avance l'hypothèse selon laquelle les canaux ORAI1 ne sont pas disponibles car interagissent avec la pompe SPCA2. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, les canaux ORAI1 sont impliqués dans une entrée calcique constitutive, indépendamment des stocks calciques réticulaires (Feng *et al.* 2010). En 2013, Motiani et ses collaborateurs ont confirmé le rôle prolifératif de l'entrée SOCE générée par ORAI3 dans la lignée MCF-7 et ont démontré son rôle dans la migration (Motiani *et al.* 2013). L'inhibition d'ORAI3 par siARN inhibe l'activité transcriptionnelle de NFAT ainsi que phosphorylation de Erk1/2 et FAK (Motiani *et al.* 2013).

Le canal ORAI3 a également été étudié dans plusieurs autres types de cancers au cours desquels, il régule plusieurs processus biologiques :

- Cancer de la prostate (**Figure 32**) : Le groupe de Prevarskaya a rapporté que ORAI3 est surexprimé dans les tissus cancéreux de la prostate par rapport aux tissus non cancéreux (Dubois *et al.* 2014). Cependant, contrairement au cancer du sein ER<sup>+</sup>, la surexpression d'ORAI3 ne supporte pas la SOCE dans les cellules cancéreuses prostatiques au contraire d'ORAI1. Il a été démontré que la surexpression d'ORAI3 contribue à la formation de canaux ARC formés d'hétéromultimères ORAI3-ORAI1 activés par l'AA (Dubois *et al.* 2014). De plus, il a été rapporté que l'AA active la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate et que l'inhibition d'ORAI3 par siARN réduisait la prolifération cellulaire induite par l'AA. A l'inverse, la surexpression d'ORAI3 entraîne une prolifération accrue et une diminution de l'apoptose des cellules cancéreuses de la prostate en formant un nombre plus élevé de canaux ARC. Il a été démontré que lors de la stimulation des cellules par l'AA, ORAI3 régule la prolifération cellulaire *via* la voie dépendante de NFAT. L'AA active l'influx de Ca<sup>2+</sup> via le canal ARC, qui à son tour induit une activité transcriptionnelle de NFAT dépendante du Ca<sup>2+</sup>. De plus, Dubois et ses collaborateurs

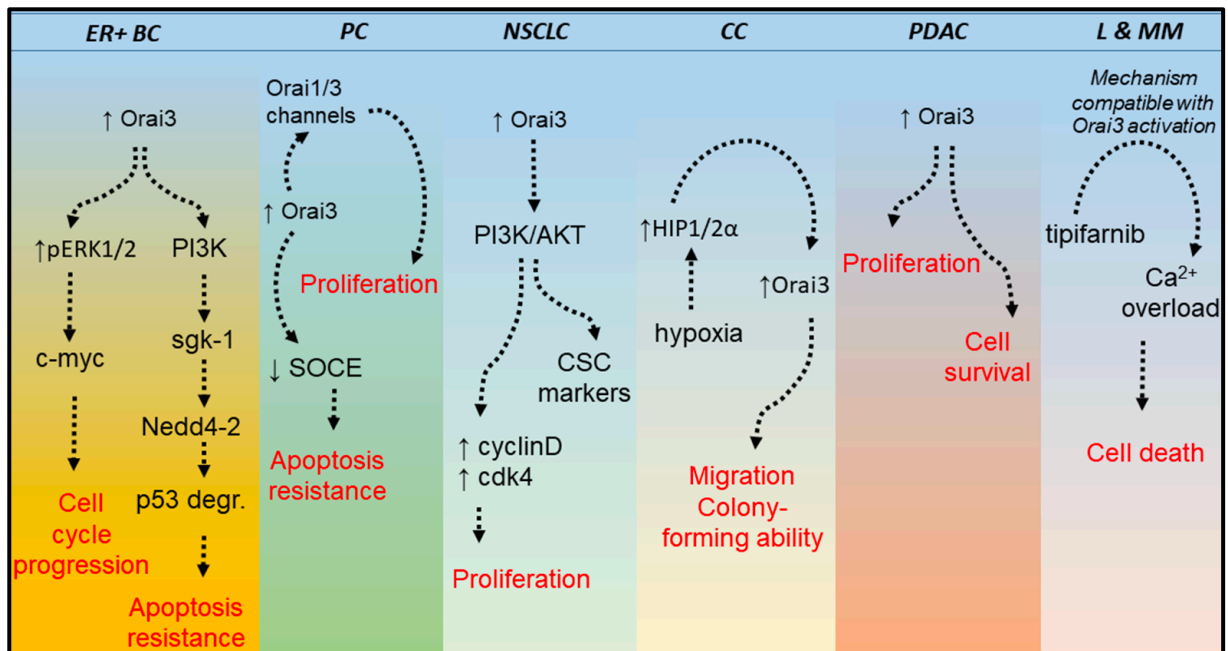
ont aussi démontré le rôle essentiel d'ORAI3 dans la progression du cancer de la prostate par des études de xénogreffe chez les souris (Dubois *et al.* 2014).

- Cancer du pancréas (**Figure 32**) : Une étude récente a révélé la surexpression d'ORAI3 dans le cancer du pancréas où il régule la prolifération cellulaire (Dubois *et al.* 2021). En effet, il a été montré que l'invalidation moléculaire d'ORAI3 (siORAI3) induit une catastrophe mitotique et l'apoptose, et inhibe la croissance tumorale dans un modèle murin (Dubois *et al.* 2021). De plus, il a également été établi que siORAI3 augmente la SOCE dans les cellules cancéreuses pancréatiques alors qu'il l'atténue dans les cellules pancréatiques saines (Dubois *et al.* 2021).
- Cancer du poumon (**Figure 32**) : ORAI3 présente une surexpression dans 67% des adénocarcinomes pulmonaires et ses niveaux d'expression sont corrélés au grade tumoral (Ay *et al.* 2013). De plus, ORAI3 régule la prolifération des cellules dans le cancer pulmonaire non à petites cellules. Dans les lignées cancéreuses pulmonaires, siORAI3 diminue la SOCE induite par thapsigargine, diminue la prolifération par l'arrêt en phase G0/G1 du cycle cellulaire et inhibe la phosphorylation d'Akt (Ay *et al.* 2013). De plus, le traitement à la cisplatine augmente la SOCE, l'expression protéique d'ORAI3 et la population des cellules souches cancéreuses pulmonaires (Daya *et al.* 2021). Par ailleurs, un lien a été établi quant au rôle de ORAI3 dans l'enrichissement des cellules souches cancéreuses de poumon dépendant de la cisplatine. En effet, dans le cancer du poumon, le SOC est composé par un ratio ORAI1/ORAI3 en faveur d'ORAI1. Avant traitement, ORAI3 constitue un régulateur négatif d'ORAI1. La cisplatine, en surexprimant ORAI3 inverse le ratio ORAI1/ORAI3 en faveur d'ORAI3 permettant ainsi une conversion d'ORAI3 d'un régulateur négatif à un acteur permettant la SOCE. Cette SOCE induite par la cisplatine, *via*, la voie PI<sub>3</sub>K/Akt, augmente l'expression des marqueurs des cellules souches cancéreuses, tels que Nanog et SOX2, conférant une résistance à la cisplatine aux cellules (Daya *et al.* 2021). De façon intéressante, une étude, réalisée par immunohistochimie sur des tissus de patients atteints de cancer du poumon avant et après traitement chimiothérapeutique, a montré le changement du ratio ORAI1/ORAI3 en faveur d'ORAI3 après traitement. De plus, ce ratio ORAI1/ORAI3, en faveur d'ORAI3, était associé à la non régression de la tumeur et donc à un échec thérapeutique (Daya *et al.* 2021).
- Cancer colorectal (**Figure 32**) : Il a été démontré que les métastases du cancer colorectal dans les ganglions lymphatiques sont associées à une diminution de l'expression

d'ORAI1 et une surexpression d'ORAI3 (Ibrahim *et al.* 2019). ORAI3 a été proposé comme un marqueur pronostique puisque sa surexpression est corrélée à une diminution de la survie globale (Ibrahim *et al.* 2019). De plus, un rapport ORAI3/ORAI1 élevé constitue un marqueur de mauvais pronostic. En se basant sur ces résultats, les auteurs ont suggéré que le rapport ORAI3/ORAI1 pourrait prédire le pronostic du cancer colorectal. En outre, la variation des niveaux d'expression d'ORAI3 et ORAI1 permet le remodelage de l'homéostasie du  $Ca^{2+}$  : l'augmentation du ratio ORAI3/ORAI1 pourrait conduire à une SICE *via* les canaux ARC et/ou LRC pour soutenir la progression du cancer colorectal (Ibrahim *et al.* 2019). De la même façon, Zuccolo et ses collaborateurs ont également rapporté une expression accrue d'ORAI3 dans les cellules cancéreuses colorectales métastatiques par rapport aux cellules cancéreuses primaires (Zuccolo *et al.* 2018). Ils ont également rapporté qu'ORAI3 régule la SOCE dans les cellules métastatiques. Cependant, les auteurs n'ont détecté aucune différence dans la prolifération et la migration des cellules métastatiques lors de l'inhibition d'ORAI3 (Zuccolo *et al.* 2018). Enfin, il a été rapporté un rôle des facteurs de transcription dépendant de l'hypoxie (HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$ ) dans la régulation de l'expression d'ORAI3 dans ce type de cancer (Zhu *et al.* 2021). En effet, siHIF1 $\alpha$  et siHIF2 $\alpha$  réduisent l'expression d'ORAI3 et la SOCE dans les cellules cancéreuses colorectales. A l'inverse, l'activation de HIF1 $\alpha$  et HIF2 $\alpha$  par ML228, ou encore leur surexpression, augmentent les niveaux d'ORAI3. De plus, la migration des cellules cancéreuses colorectales est réduite en présence de siHIF1 $\alpha$ , siHIF2 $\alpha$  et siORAI3 indiquant ainsi le lien entre siHIF1 $\alpha$ , siHIF2 $\alpha$  et ORAI3 (Zhu *et al.* 2021).

- Cancers hématologiques (**Figure 32**) : Yanamandra et ses collaborateurs ont montré que les cellules de myélomes et de leucémies sensibles au tipifarnib présentent une surexpression transcriptionnelle de ORAI3. Durant cette étude, ils ont proposé que l'influx calcique médié par le canal ORAI3 contribue à l'apoptose dans les cellules leucémiques et de myélome traitées au tipifarnib. En effet, ils ont montré que le tipifarnib induit un influx calcique qui active un stress réticulaire responsable de l'apoptose *via* une augmentation de l'activité des caspases 3,4 et 12. L'influx calcique ainsi que l'apoptose induits par le tipifarnib sont potentialisés par le 2-APB et inhibés par les lanthanides (Yanamandra *et al.* 2011).






**Figure 32 : Représentation graphique résumant le rôle d’ORAI3 dans les cancers.** ER<sup>+</sup> BC : Cancer du sein ER<sup>+</sup> ; PC : Cancer de la prostate ; NSCLC : Cancer pulmonaire non à petites cellules ; CC : Cancer colorectal ; PDAC : Adénocarcinome canalaire pancréatique ; L & MM : Leucémie et myélome multiple. Modifié à partir de (Sanchez-Collado *et al.* 2021).

Review

# Store-Independent Calcium Entry and Related Signaling Pathways in Breast Cancer

Mohamed Chamlali, Lise Rodat-Despoix  and Halima Ouadid-Ahidouch \*

Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, UR-UPJV 4667, University of Picardie Jules Verne, 80000 Amiens, France; mohamed.chamlali@etud.u-picardie.fr (M.C.); lise.despoix@u-picardie.fr (L.R.-D.)  
\* Correspondence: halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr

**Abstract:** Known as a key effector in breast cancer (BC) progression, calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) is tightly regulated to maintain the desired concentration to fine-tune cell functions.  $\text{Ca}^{2+}$  channels are the main actors among  $\text{Ca}^{2+}$  transporters that control the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in cells. It is well known that the basal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is regulated by both store-dependent and independent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in BC development and progression. However, most of the literature has reported the role of store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, and only a few studies are focusing on store-independent  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SICE). In this review, we aim to summarize all findings on SICE in the BC progression field.

**Keywords:** calcium channels; basal calcium entry; Orai- $\text{K}^+$  channel complex; transient receptor potential channels; voltage-gated calcium channels; breast cancer



**Citation:** Chamlali, M.; Rodat-Despoix, L.; Ouadid-Ahidouch, H. Store-Independent Calcium Entry and Related Signaling Pathways in Breast Cancer. *Genes* **2021**, *12*, 994. <https://doi.org/10.3390/genes12070994>

Academic Editor: Iman Azimi

Received: 20 April 2021  
Accepted: 25 June 2021  
Published: 29 June 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cancers are a major public health problem due to their incidence and, more particularly, their mortality. Among all cancers, breast cancer (BC) is one of the most diagnosed in the world. Despite significant discoveries in treatment, some BC are currently incurable. Thereby, we still need to identify targets to treat BC. In recent years, a research field has developed around the role of ion channels and their implication in tumor progression [1]. The involvement of ion transporters in tumor development could thus classify cancers as onco-channelopathies [2]. Furthermore, several studies reported the involvement of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channels in almost all hallmarks of cancer [3]. Research on BC has shown the involvement of a certain number of proteins related to its development and progression. It has also been found that  $\text{Ca}^{2+}$ -regulating proteins are key effectors in BC. Indeed,  $\text{Ca}^{2+}$  is recognized as a universal intracellular second messenger involved in a plethora of physiological as well as physiopathological processes, such as cell proliferation, migration, invasion, apoptosis, and chemoresistance in a cancer situation [4,5]. Many studies have already clarified the role of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in cancer and especially BC, suggesting its importance in the altering processes that shape cancer cells [6]. However, calcium transport and its regulation remain to be completely understood.

Several pathways, with different modes of action, permit a  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The most known is the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) pathway which is regulated by the activation of the  $\text{Ca}^{2+}$  release-activated channels encoded by Orai channels via stromal interaction molecule (STIM) proteins [7]. It is well known in the literature that these channels play critical roles in carcinogenesis, including BC [8]. However, recent studies have reported the role of store-independent  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SICE) in regulating BC processes and several hallmarks of BC. Indeed, SICE is known to be induced either by arachidonic acid (AA) and/or the AA metabolite leukotriene C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) pathways and regulated by both Orai1 and Orai3 channels [9], or by the functional coupling between Orai1 and secretory pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SPCA2) [10]. In addition to these two major pathways, SICE can also be mediated by voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VGCC), mechanosensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels, ligand-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels, as well as constitutively activated  $\text{Ca}^{2+}$  channels [11–13].

Several reviews have focused on the description and role of SOCE through the stromal interaction molecule (STIM) protein activation [8,14]. However, studies on SICE remain elusive. In this review, we aimed to summarize the different studies which have shown the role of SICE in the regulation of BC processes.

## 2. Orai Channels

Orai channels play distinct roles in different BC subtypes [15]. Two isoforms (Orai1 and Orai3) in particular have been found overexpressed in BC. Regarding Orai3, it was found overexpressed in 76.9% of 13 tested BC samples when compared to non-tumoral breast ones [16]. In addition, a positive correlation between Orai3 and the c-Myc proto-oncogene transcriptional expression in BC tissues has also been reported [17]. By analyzing Orai3 in clinical BC samples through the analysis of a public dataset, Hasna et al. proposed Orai3 as a predictive marker in the resistance to chemotherapeutic drugs [18]. Subsequently, a study conducted by Azimi et al. reported a sensitivity of Orai3 to hypoxia [19]. They observed an increase in Orai3 expression in response to hypoxia in both basal and luminal types of BC cells, and identified hypoxia and hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) as critical regulators of Orai3 expression in these types of cell lines [19]. Finally, Orai3 transcriptional expression is regulated via the expression of micro-ribonucleic acid (miRNA). Indeed, it has been shown that miR34A and miR18A/B inhibit and activate Orai3 expression, respectively [20]. On the other hand, Orai1 was found expressed in the mammary gland and its expression increased during lactation assuming the trans-epithelial Ca<sup>2+</sup> transport [21]. Orai1 was also found up-regulated in BC cell lines and is particularly highly expressed in basal subtype cells where it regulates migration [19,21,22].

Interestingly, an association between Orai channels and transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) channels has been reported. Thus, both Orai1 and Orai3 plasma membrane localization is allowed by TRPC6 in BC. Indeed, TRPC6 calcium activity permits these Orai isoforms to be translocated to the plasma membrane and thus participates in a novel way to modulate the Ca<sup>2+</sup> influx in BC [23].

Several studies have shown an activation mode of Orai1 and Orai3 depending on the estrogenic status and/or the histological origin [21,22,24]. Orai3 contributes to the SOCE in luminal cells expressing estrogen receptors (ER<sup>+</sup>) such as MCF-7 and T47D cell lines, but not in the estrogen-negative (ER<sup>-</sup>) basal cells such as MDA-MB-231 [24], while Orai1 mediates SOCE in basal-like BC cell lines [22,24]. However, Orai1 still regulates SOCE in ER<sup>+</sup> BC cell lines such as MCF-7 [21].

Orai1 is the most studied channel among the store-operated channels (SOC). Some studies have shown a modulation of the Ca<sup>2+</sup> entry through Orai1, which does not depend on the Ca<sup>2+</sup> store depletion. Indeed, in 2010, Feng et al. demonstrated another mode of activation of the Orai1 channels [10]. In luminal ER<sup>+</sup> cells, Orai1, which is activated independently from STIM1, regulates basal Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> homeostasis. This mechanism involves the SPCA2 pumps initially located in the Golgi apparatus [10]. It has been demonstrated by co-immunoprecipitation and pull-down techniques that SPCA2 via its amino-terminus (N-ter) physically interacts with Orai1 at the level of the plasma membrane, which results in the activation of Orai1 by SPCA2 carboxyl-terminus (C-ter) and thus in an increase in the basal Ca<sup>2+</sup> concentration [10]. Interestingly, the SPCA2/Orai1 coupling has also been shown in a cell model of lactation. Indeed, SPCA2 and Orai1 were found co-localized in mouse lactating glands and participate in a SICE to support lactation [25]. Therefore, it seems that BC cells redirect this SPCA2-dependent Orai1 activation to acquire cancer capacities. SICE induced by the Orai1/SPCA2 coupling has also been shown in the MCF-7 cell line, where it regulates cell proliferation [10]. Moreover, our team reported that SPCA2 also constitutes a complex with Kv10.1 potassium (K<sup>+</sup>) channels in ER<sup>+</sup> cell lines and allows its trafficking from the Golgi to the plasma membrane [26]. Both SPCA2 N-ter and C-ter are involved in this trafficking [27]. Indeed, in MCF-7 cells, SPCA2 regulates the localization and the activity of both Kv10.1 and Orai1 channels, mediating a SICE able to

sustain channel membrane localization and Erk1/2 phosphorylation, and to promote cell survival in a collagen environment [26,28].

As seen above, when a store-independent activation of Orai1 occurs, other proteins are involved to form a functional or physical complex with Orai1. It is the case in potassium channels.  $K^+$  channel activity permits  $K^+$  ion efflux that induces a membrane potential hyperpolarization, therefore, increasing the driving force for  $Ca^{2+}$  that favors  $Ca^{2+}$  entry in the cell [29]. Both the voltage-gated Kv10.1 and the small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated potassium channel (SK3) were found to work in partnership with Orai1. Indeed, these  $K^+$  channels, by regulating the membrane potential, regulate  $Ca^{2+}$  entry in basal-like BC cells.

For both of these channels, it has been found that Orai1 was the main actor in the constitutive  $Ca^{2+}$  entry in BC. In fact, both Kv10.1 and SK3 functionally regulate the  $Ca^{2+}$  entry through Orai1 leading the cell migration regulation. Indeed, Kv10.1 was observed expressed alongside Orai1 in invasive breast tumors and lymph node metastasis, and regulates cell migration through an Orai1-dependent constitutive  $Ca^{2+}$  entry [30]. On the other hand, it has been shown that SK3 knockdown inhibits BC bone metastasis [31]. This process is explained by the fact that, in the basal MDA-MB-435S cell line, Orai1 is recruited with SK3 to the lipid rafts, and following the SK3-dependent hyperpolarization, Orai1 is activated in a store-independent manner. Moreover, the same team showed an involvement of the SigmaR1 protein in the activity and localization of SK3 in lipid rafts [32]. The SICE through Orai1 activates the calpain leading to cell migration in the MDA-MB-435S cell line [31,32].

### 3. TRP Channels

The transient receptor potential (TRP) channels family is expressed and functional in most of the non-excitabile cells in the human organism. They are known to be activated by various stimuli, such as growth factors, temperature, ligand, or mechanical stimuli, and are known to be abnormally expressed in cancers and especially BC. Many TRP channels have been identified as being up-regulated in BC and can be correlated with clinical parameters in BC. This is the case, for example, for TRP canonical (TRPC) channels (TRPC1, TRPC3, and TRPC6), TRP melastatin (TRPM) channels (TRPM6, TRPM7, and TRPM8), and TRP vanilloid (TRPV) channels (TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, and TRPV6) [33–38]. In addition, it has been shown that TRPC6 is upregulated in BC cell lines and patient tissue compared to normal breast cell lines and healthy tissue, respectively [39]. However, TRPC6 expression is not correlated with tumor grades, estrogen receptor expression, or lymph node-positive tumors. Furthermore, the overexpression of TRPC1 has been discovered to be correlated with small tumors low proliferating (Grade 1), whereas TRPV4 is correlated with tumor grade, tumor size, and patient overall survival [40]. Moreover, given the estrogen-dependent trait observed in some BC, the TRPM8 channel has been shown to have its expression regulated by estrogen. Indeed, the application of estrogen on the MCF-7 cell line increases the expression of TRPM8 [33]. Both the role and expression of TRPM7 have been shown to depend on estrogen and/or aggressiveness status. Indeed, in  $ER^-$  tumors (not expressing the estrogen receptor and known to be the most aggressive), TRPM7 appears to be overexpressed in the most invasive areas [41], correlated to cancer metastasis and invasive BC [42], and regulates migration [41]. While in  $ER^+$  tumors, TRPM7 is overexpressed in the non-invasive areas, but at a lower level than in the invasive areas, and regulates cell proliferation [37].

In addition, it has also been shown that the TRPC1 channel expression is regulated via activation of the calcium-sensing receptor (CaR) [43]. Indeed, the activation of CaR by extracellular  $Ca^{2+}$  (up to 10 mM) increases TRPC1 expression, via the phospholipase C (PLC) and Erk1/2 pathway in MCF-7 cells [43–45]. Furthermore, TRPC1 is required for Erk1/2 phosphorylation and  $Ca^{2+}$  entry, and also for the proliferative effect induced by the activation of CaR. Moreover, the involvement of TRPC1 in the CaR-induced proliferation has been suggested [43].

Interestingly, TRPC1 expression is upregulated in hypoxia compared to normoxia conditions through HIF1 $\alpha$  expression due to the presence of HIF1 $\alpha$  and HIF1 $\beta$  binding domains in the TRPC1 gene promoter [46]. Silencing of HIF1 $\alpha$ , but not HIF1 $\beta$  nor HIF2 $\alpha$ , reduced TRPC1 expression. In basal BC cells under hypoxia, TRPC1 contributes to a basal Ca<sup>2+</sup> entry and an increase of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration in a constitutive manner. Indeed, TRPC1 silencing reduces the constitutive Ca<sup>2+</sup> entry in cells grown under a hypoxic environment [46]. Moreover, the same study showed that TRPC1 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in hypoxic conditions with an upregulation of the Snail1 mesenchymal marker via HIF1 $\alpha$  signaling and downregulation of the epithelial marker Claudin-4 [46]. In addition, TRPC1 positively regulates the expression of the autophagy marker LC3BII through activation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) as well as signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) phosphorylation during hypoxia [46].

In BC, Lee et al. have shown that TRPV4 calcium activity is required in cell migration via activation of the Akt signaling pathway as well as a downregulation of E-cadherin protein expression. In this study, they showed that activation of the upregulated TRPV4 by 4- $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate (4 $\alpha$ -PDD) triggers a Ca<sup>2+</sup> influx responsible for the Akt signaling pathway and a sustainable phosphorylation of FAK which could be via the Akt signaling pathway. Moreover, Akt activation is responsible for a downregulation of  $\beta$ -catenin and E-cadherin [40]. Moreover, the activation of TRPV4 induces an EMT in MDA-MB-468 cells by increasing the expression of EMT markers, such as Vimentin, AXL, Serpin1, Twist, Snail, and CD44/CD24 ratio. In contrast, TRPV4-silenced cells presented a reduced single-cell motility but no change in the EMT markers' expression [47].

The melastatin family of TRP channels is also a well-known regulator of carcinogenesis processes. For example, our team showed that TRPM7 is a key regulator in BC progression. It participates in cell proliferation as well as cell migration and invasion [37,41,42]. First, it has been found that TRPM7 silencing decreases the constitutive Ca<sup>2+</sup> entry and hence the cell viability [37]. Guilbert et al. established that TRPM7 basal activity regulates ER<sup>+</sup> BC cell line progression. In addition, they demonstrated that TRPM7 silencing decreased both Ca<sup>2+</sup> entry and MCF-7 cell line proliferation [37]. However, it has been shown that TRPM7 regulates MDA-MB-231 cell line migration via its catalytic kinase domain, and not through its channel activity, by regulating the myosin II-based cytoskeletal tension and thereby SRY-Box transcription factor 4 (SOX4) [41,48,49]. Furthermore, research work on the MDA-MB-435S cell line showed that TRPM7 knockdown decreases both cell migration and invasion following a decrease in the MAPK protein phosphorylation [42]. However, this study does not show a direct channel activation of TRPM7, particularly when TRPM7 presents a kinase-type catalytic domain [42].

Another TRPM family member, the Ca<sup>2+</sup>-permeable TRPM8 channel, was found as a regulator of BC processes. This channel was shown to be activated in BC cells and associated with an elevation of cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration following the application of icilin (TRPM8 agonist) [33]. However, the estrogen status does not seem to be involved in the TRPM8 activation state since 17 $\beta$ -estradiol increased TRPM8 mRNA expression but failed to affect the Ca<sup>2+</sup> entry [33]. Moreover, it has been shown that TRPM8, following menthol or icilin activation, regulates BC cell proliferation and migration via activation of AMP-activated protein kinase–Unc-51 like autophagy activating the kinase 1 (AMPK–ULK1) signaling pathway, suggesting that TRPM8, by regulating the autophagy, leads the proliferative and migratory processes [50].

#### 4. Voltage-Gated Calcium Channels

A number of studies have focused on the role of VGCC, which could be activated under normal cell culture conditions. Indeed, the resting membrane potential, measured by whole-cell patch-clamp technique, varies from  $-40$  to  $-20$  mV in BC cell lines [51–53]. The opening of VGCC at rest allows, therefore, a basal Ca<sup>2+</sup> entry. Some VGCC see their expression and activity being altered in BC. This is the case in T-type Ca<sup>2+</sup> channels, such

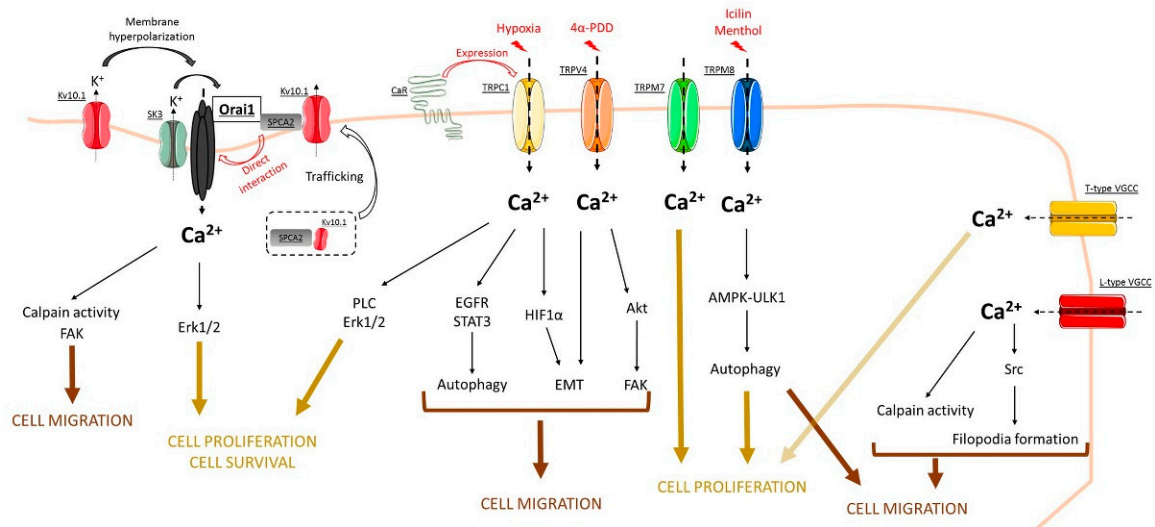
as Cav3.1, Cav3.2, which are overexpressed in BC tissue [54,55]. Indeed, through an experimental and informatic study using microarray analysis, it has been found that certain L-type channels, such as Cav1.2 and Cav1.3, seem to be overexpressed in different types of cancer, including BC, and participate in inward  $\text{Ca}^{2+}$  entry following melatonin and  $5\alpha$ -dihydrotestosterone perfusion [56–58].

L-type VGCC were found to be active at a basal level and regulated by the L-type voltage-gated calcium channel  $\gamma$  4 subunit (CACNG4) [59]. CACNG4 modulates L-type VGCC basal activation, and thereby the downstream processes. This subunit has been found to be involved in BC cell proliferation, motility, and adhesion. Its silencing reduced these cellular processes and its overexpression increased the metastasis to the lungs in vivo. Treatment with L-type channels antagonists Verapamil and Amlodipine decreased the MCF-7 and MDA-MB-231 cell proliferation. It has also been shown that CACNG4 silencing led to an increase in  $\text{Ca}^{2+}$  entry. However, the application of L-type channel antagonists decreased  $\text{Ca}^{2+}$  entry. These results suggested that CACNG4 subunit regulates the channel in an active state resulting in the higher intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration leading in fine to the inhibition of processes such as cell proliferation, motility, and adhesion [59]. Moreover, L-type VGCC are involved in BC cell invasion [60]. The activation of the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel with a specific agonist BAY K8644 leads to an increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration responsible for filopodia stability. Indeed, treated cells with L-type channels pharmacological blockers, such as amlodipine besylate, felopidine, manidipine dichloride, and cilnipedine, lose their stable filopodia. Furthermore, it has been shown in the same study that integrin activation promotes filopodia formation through the proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src signaling pathway, calpain activity, as well as a  $\text{Ca}^{2+}$  entry at the filopodia level. In addition, the L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel seems to be colocalized with myosin X (MYO10) within filopodia [60].

T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, active at membrane potential from  $-50$  mV and above [61], have been reported to regulate BC cell proliferation. Selective knockdown or pharmacological targeting to inhibit T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels reduced MCF-7 cell proliferation without altering cell viability [62]. A similar study was conducted and showed that treatment with mibefradil and pimoizid ( $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists) inhibited T-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents and reduced cell proliferation. However, due to the poor selectivity of the pharmacological blockers used, it has been concluded that T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels are involved in the cell proliferation alongside other VGCC, such as L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels [61].

## 5. Conclusions

To summarize,  $\text{Ca}^{2+}$  channels are a protein family activated by a plethora of stimuli from store-dependent activation to the basal-activated state in BC. Based on studies demonstrated in this review, it seems that  $\text{Ca}^{2+}$  signaling is far from being fully understood in BC. As we schematized, the SICE constitutes a key effector in a multitude of BC cell processes, even though it is not the major actor in the  $\text{Ca}^{2+}$  flow as SOCE (see Figure 1). Nevertheless, further studies on  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated cell processes in BC should bring answers regarding the relationship and/or the complementarity between the role of SOCE and SICE in the regulation of BC progression via  $\text{Ca}^{2+}$  signaling.



**Figure 1.** Concluding model that summarizes the role of store-independent calcium entry (SICE) through Orai, TRP, and voltage-gated calcium channels in the regulation of breast cancer processes. See, in the text, the role of each channel in cell processes such as cell proliferation, cell survival, as well as cell migration.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, M.C., L.R.-D. and H.O.-A.; writing—review and editing, M.C., L.R.-D. and H.O.-A.; visualization, M.C., L.R.-D. and H.O.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** M.C. is grateful for the funding from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”, the “Université de Picardie Jules Verne”, and the “Cancéropôle Nord-Ouest”. This work was supported by the “Université de Picardie Jules Verne”, the “Région Hauts-de-France”, the “Ligue contre le cancer”, and the “Cancéropôle Nord-Ouest”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Abbreviations

AA	Arachidonic acid;
AMPK-ULK1	AMP-activated protein kinase–Unc-51 like autophagy activating kinase 1;
BC	Breast cancer;
Ca <sup>2+</sup>	Calcium;
CaR	Calcium-sensing receptor;
C-ter	carboxyl terminus;
EGFR	Epidermal growth factor;
EMT	Epithelial-mesenchymal transition;
ER <sup>+</sup>	Estrogen receptor positive;
ER <sup>−</sup>	Estrogen receptor negative;
Erk1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2;
FAK	Focal adhesion kinase;
HIF1α	Hypoxia-inducible factor 1 α;
Kv10.1	Voltage-gated potassium channel;
LTC4	AA metabolite leukotriene C4 (LTC4);
miRNA	Micro-ribonucleic acid;
N-ter	Amino terminus;
PLC	Phospholipase C;
SICE	Store-independent calcium entry;
SK3	Small conductance calcium-activated potassium channel;

SOC	Store-operated channels;
SOCE	Store-operated calcium entry;
SOX4	SRY-Box transcription factor 4;
SPCA2	Secretory pathway calcium-ATPase;
Src	Proto-oncogene tyrosine kinase Src;
STAT3	Signal transducers and activators of transcription 3;
STIM	Stromal interaction molecule;
TRP	Transient receptor potential;
TRPC	Transient receptor potential canonical;
TRPM	Transient receptor potential melastatin;
TRPV	Transient receptor potential vanilloid;
VGCC	Voltage-gated calcium channel;
4 $\alpha$ -PDD	4- $\alpha$ -phorbol-12,13-didecanoate.

## References

- Lang, F.; Stouraras, C. Ion channels in cancer: Future perspectives and clinical potential. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **2014**, *369*, 20130108. [[CrossRef](#)]
- Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuuba, Y. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 559–621. [[CrossRef](#)]
- Tajada, S.; Villalobos, C. Calcium Permeable Channels in Cancer Hallmarks. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Petersen, O.H.; Michalak, M.; Verkhatsky, A. Calcium signalling: Past, present and future. *Cell Calcium* **2005**, *38*, 161–169. [[CrossRef](#)]
- Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Lipp, P. Calcium—A life and death signal. *Nature* **1998**, *395*, 645–648. [[CrossRef](#)]
- So, C.L.; Saunus, J.M.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Calcium signalling and breast cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2019**, *94*, 74–83. [[CrossRef](#)]
- Hogan, P.G.; Rao, A. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *460*, 40–49. [[CrossRef](#)]
- Jardin, I.; Lopez, J.J.; Salido, G.M.; Rosado, J.A. Store-Operated Ca(2+) Entry in Breast Cancer Cells: Remodeling and Functional Role. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 4053. [[CrossRef](#)]
- Zhang, X.; Gueguinou, M.; Trebak, M. Store-Independent Orai Channels Regulated by STIM. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*; Kozak, J.A., Putney, J.W., Jr., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018; pp. 197–214.
- Feng, M.; Grice, D.M.; Faddy, H.M.; Nguyen, N.; Leitch, S.; Wang, Y.; Muend, S.; Kenny, P.A.; Sukumar, S.; Roberts-Thomson, S.J.; et al. Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell* **2010**, *143*, 84–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Phan, N.N.; Wang, C.Y.; Chen, C.F.; Sun, Z.; Lai, M.D.; Lin, Y.C. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol. Lett.* **2017**, *14*, 2059–2074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deliot, N.; Constantin, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2512–2522. [[CrossRef](#)]
- Mignen, O.; Constantin, B.; Potier-Cartreau, M.; Penna, A.; Gautier, M.; Gueguinou, M.; Renaudineau, Y.; Shoji, K.F.; Felix, R.; Bayet, E.; et al. Constitutive calcium entry and cancer: Updated views and insights. *Eur. Biophys. J. EBJ* **2017**, *46*, 395–413. [[CrossRef](#)]
- Chen, Y.F.; Lin, P.C.; Yeh, Y.M.; Chen, L.H.; Shen, M.R. Store-Operated Ca(2+) Entry in Tumor Progression: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. *Cancers* **2019**, *11*, 899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chalmers, S.B.; Monteith, G.R. ORAI channels and cancer. *Cell Calcium* **2018**, *74*, 160–167. [[CrossRef](#)]
- Faouzi, M.; Hague, F.; Potier, M.; Ahidouch, A.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 542–551. [[CrossRef](#)]
- Faouzi, M.; Kischel, P.; Hague, F.; Ahidouch, A.; Benzerdjeb, N.; Sevestre, H.; Penner, R.; Ouadid-Ahidouch, H. ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 752–760. [[CrossRef](#)]
- Hasna, J.; Hague, F.; Rodat-Despoix, L.; Geerts, D.; Leroy, C.; Tulasne, D.; Ouadid-Ahidouch, H.; Kischel, P. Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: The p53 connection. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 693–707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Azimi, I.; Milevskiy, M.J.G.; Chalmers, S.B.; Yapa, K.; Robitaille, M.; Henry, C.; Baillie, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. 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* **2019**, *11*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vashisht, A.; Tanwar, J.; Motiani, R.K. Regulation of proto-oncogene Orai3 by miR18a/b and miR34a. *Cell Calcium* **2018**, *75*, 101–111. [[CrossRef](#)]



21. McAndrew, D.; Grice, D.M.; Peters, A.A.; Davis, F.M.; Stewart, T.; Rice, M.; Smart, C.E.; Brown, M.A.; Kenny, P.A.; Roberts-Thomson, S.J.; et al. ORAI1-mediated calcium influx in lactation and in breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 448–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yang, S.; Zhang, J.J.; Huang, X.Y. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 124–134. [[CrossRef](#)]
23. Jardin, I.; Diez-Bello, R.; Lopez, J.J.; Redondo, P.C.; Salido, G.M.; Smani, T.; Rosado, J.A. TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure. *Cancers* **2018**, *10*, 331. [[CrossRef](#)]
24. Motiani, R.K.; Abdullaev, I.F.; Trebak, M. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: Selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19173–19183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cross, B.M.; Hack, A.; Reinhardt, T.A.; Rao, R. SPCA2 regulates Orai1 trafficking and store independent Ca<sup>2+</sup> entry in a model of lactation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67348. [[CrossRef](#)]
26. Peretti, M.; Badaoui, M.; Girault, A.; van Gulick, L.; Mabilie, M.P.; Tebbakha, R.; Sevestre, H.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Girault, A.; Peretti, M.; Badaoui, M.; Hemon, A.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. The N and C-termini of SPCA2 regulate differently Kv10.1 function: Role in the collagen 1-induced breast cancer cell survival. *Am. J. Cancer Res.* **2021**, *11*, 251–263.
28. Badaoui, M.; Mimsy-Julienne, C.; Saby, C.; van Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 24653–24671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Schwab, A.; Hanley, P.; Fabian, A.; Stock, C. Potassium channels keep mobile cells on the go. *Physiology* **2008**, *23*, 212–220. [[CrossRef](#)]
30. Hammadi, M.; Chopin, V.; Matifat, F.; Dhennin-Duthille, I.; Chasseraud, M.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Human ether a-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3837–3846. [[CrossRef](#)]
31. Chantome, A.; Potier-Cartreau, M.; Clarysse, L.; Fromont, G.; Marionneau-Lambot, S.; Gueguinou, M.; Pages, J.C.; Collin, C.; Oullier, T.; Girault, A.; et al. Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4852–4861. [[CrossRef](#)]
32. Gueguinou, M.; Crottes, D.; Chantome, A.; Rapetti-Mauss, R.; Potier-Cartreau, M.; Clarysse, L.; Girault, A.; Fourbon, Y.; Jezequel, P.; Guerin-Charbonnel, C.; et al. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca(2+) homeostasis. *Oncogene* **2017**, *36*, 3640–3647. [[CrossRef](#)]
33. Chodon, D.; Guilbert, A.; Dhennin-Duthille, I.; Gautier, M.; Telliez, M.S.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Estrogen regulation of TRPM8 expression in breast cancer cells. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Dhennin-Duthille, I.; Gautier, M.; Faouzi, M.; Guilbert, A.; Brevet, M.; Vaudry, D.; Ahidouch, A.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: Correlation with pathological parameters. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2011**, *28*, 813–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. El Hiani, Y.; Ahidouch, A.; Roudbaraki, M.; Guenin, S.; Brule, G.; Ouadid-Ahidouch, H. Calcium-sensing receptor stimulation induces nonselective cation channel activation in breast cancer cells. *J. Membr. Biol.* **2006**, *211*, 127–137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Guilbert, A.; Dhennin-Duthille, I.; Hiani, Y.E.; Haren, N.; Khorsi, H.; Sevestre, H.; Ahidouch, A.; Ouadid-Ahidouch, H. Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 125. [[CrossRef](#)]
37. Guilbert, A.; Gautier, M.; Dhennin-Duthille, I.; Haren, N.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2009**, *297*, C493–C502. [[CrossRef](#)]
38. Ouadid-Ahidouch, H.; Dhennin-Duthille, I.; Gautier, M.; Sevestre, H.; Ahidouch, A. TRP calcium channel and breast cancer: Expression, role and correlation with clinical parameters. *Bull. Cancer* **2012**, *99*, 655–664. [[CrossRef](#)]
39. Aydar, E.; Yeo, S.; Djamgoz, M.; Palmer, C. Abnormal expression, localization and interaction of canonical transient receptor potential ion channels in human breast cancer cell lines and tissues: A potential target for breast cancer diagnosis and therapy. *Cancer Cell Int.* **2009**, *9*, 23. [[CrossRef](#)]
40. Lee, W.H.; Choong, L.Y.; Jin, T.H.; Mon, N.N.; Chong, S.; Liew, C.S.; Putti, T.; Lu, S.Y.; Harteneck, C.; Lim, Y.P. TRPV4 plays a role in breast cancer cell migration via Ca(2+)-dependent activation of AKT and downregulation of E-cadherin cell cortex protein. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e338. [[CrossRef](#)]
41. Guilbert, A.; Gautier, M.; Dhennin-Duthille, I.; Rybarczyk, P.; Sahni, J.; Sevestre, H.; Scharenberg, A.M.; Ouadid-Ahidouch, H. Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain. *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 3694–3707. [[CrossRef](#)]
42. Meng, X.; Cai, C.; Wu, J.; Cai, S.; Ye, C.; Chen, H.; Yang, Z.; Zeng, H.; Shen, Q.; Zou, F. TRPM7 mediates breast cancer cell migration and invasion through the MAPK pathway. *Cancer Lett.* **2013**, *333*, 96–102. [[CrossRef](#)]

43. El Hiani, Y.; Ahidouch, A.; Lehen'kyi, V.; Hague, F.; Gouilleux, F.; Mentaverri, R.; Kamel, S.; Lassoued, K.; Brule, G.; Ouadid-Ahidouch, H. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 and TRPC1 channels are required for calcium-sensing receptor-stimulated MCF-7 breast cancer cell proliferation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2009**, *23*, 335–346. [[CrossRef](#)]
44. Brown, E.M.; Gamba, G.; Riccardi, D.; Lombardi, M.; Butters, R.; Kifor, O.; Sun, A.; Hediger, M.A.; Lytton, J.; Hebert, S.C. Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **1993**, *366*, 575–580. [[CrossRef](#)]
45. Sanders, J.L.; Chattopadhyay, N.; Kifor, O.; Yamaguchi, T.; Butters, R.R.; Brown, E.M. Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* **2000**, *141*, 4357–4364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Azimi, I.; Milevskiy, M.J.G.; Kaemmerer, E.; Turner, D.; Yapa, K.; Brown, M.A.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. TRPC1 is a differential regulator of hypoxia-mediated events and Akt signalling in PTEN-deficient breast cancer cells. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 2292–2305. [[CrossRef](#)]
47. Azimi, I.; Robitaille, M.; Armitage, K.; So, C.L.; Milevskiy, M.J.G.; Northwood, K.; Lim, H.F.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Activation of the Ion Channel TRPV4 Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9417. [[CrossRef](#)]
48. Middelbeek, J.; Kuipers, A.J.; Henneman, L.; Visser, D.; Eidhof, I.; van Horsen, R.; Wieringa, B.; Canisius, S.V.; Zwart, W.; Wessels, L.F.; et al. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4250–4261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kuipers, A.J.; Middelbeek, J.; Vrenken, K.; Perez-Gonzalez, C.; Poelmans, G.; Klarenbeek, J.; Jalink, K.; Trepap, X.; van Leeuwen, F.N. TRPM7 controls mesenchymal features of breast cancer cells by tensional regulation of SOX4. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 2409–2419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Huang, Y.; Li, S.; Jia, Z.; Zhao, W.; Zhou, C.; Zhang, R.; Ali, D.W.; Michalak, M.; Chen, X.Z.; Tang, J. Transient Receptor Potential Melastatin 8 (TRPM8) Channel Regulates Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells by Activating the AMPK-ULK1 Pathway to Enhance Basal Autophagy. *Front. Oncol.* **2020**, *10*, 573127. [[CrossRef](#)]
51. Roger, S.; Besson, P.; le Guennec, J.Y. Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1616*, 107–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Wonderlin, W.F.; Woodfork, K.A.; Strobl, J.S. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* **1995**, *165*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Ouadid-Ahidouch, H.; le Bourhis, X.; Roudbaraki, M.; Toillon, R.A.; Delcourt, P.; Prevarskaya, N. Changes in the K<sup>+</sup> current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: Possible involvement of a h-ether.a-gogo K<sup>+</sup> channel. *Recept. Channels* **2001**, *7*, 345–356.
54. Barcelo, C.; Siso, P.; Maiques, O.; de la Rosa, I.; Marti, R.M.; Macia, A. T-Type Calcium Channels: A Potential Novel Target in Melanoma. *Cancers* **2020**, *12*, 391. [[CrossRef](#)]
55. Ohkubo, T.; Yamazaki, J. T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 267–275. [[CrossRef](#)]
56. Wang, C.Y.; Lai, M.D.; Phan, N.N.; Sun, Z.; Lin, Y.C. Meta-Analysis of Public Microarray Datasets Reveals Voltage-Gated Calcium Gene Signatures in Clinical Cancer Patients. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0125766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Marques, R.; Peres, C.G.; Vaz, C.V.; Gomes, I.M.; Figueira, M.I.; Cairrao, E.; Verde, I.; Maia, C.J.; Socorro, S. 5alpha-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.* **2015**, *32*, 228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Squecco, R.; Tani, A.; Zecchi-Orlandini, S.; Formigli, L.; Francini, F. Melatonin affects voltage-dependent calcium and potassium currents in MCF-7 cell line cultured either in growth or differentiation medium. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *758*, 40–52. [[CrossRef](#)]
59. Kanwar, N.; Carmine-Simmen, K.; Nair, R.; Wang, C.; Moghadas-Jafari, S.; Blaser, H.; Tran-Thanh, D.; Wang, D.; Wang, P.; Wang, J.; et al. Amplification of a calcium channel subunit CACNG4 increases breast cancer metastasis. *EBioMedicine* **2020**, *52*, 102646. [[CrossRef](#)]
60. Jacquemet, G.; Baghirov, H.; Georgiadou, M.; Sihto, H.; Peuhu, E.; Cettour-Janet, P.; He, T.; Perala, M.; Kronqvist, P.; Joensuu, H.; et al. L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13297. [[CrossRef](#)]
61. Bertolesi, G.E.; Shi, C.; Elbaum, L.; Jollimore, C.; Rozenberg, G.; Barnes, S.; Kelly, M.E. The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozone inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol. Pharmacol.* **2002**, *62*, 210–219. [[CrossRef](#)]
62. Taylor, J.T.; Huang, L.; Pottle, J.E.; Liu, K.; Yang, Y.; Zeng, X.; Keyser, B.M.; Agrawal, K.C.; Hansen, J.B.; Li, M. Selective blockade of T-type Ca<sup>2+</sup> channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* **2008**, *267*, 116–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Contents lists available at ScienceDirect

## BBA - Reviews on Cancer

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbacan](http://www.elsevier.com/locate/bbacan)

## Review

## Ion channels as key partners of cytoskeleton in cancer disease

Lise Rodat-Despoix<sup>a,\*</sup>, Mohamed Chamlali<sup>a</sup>, Halima Ouadid-Ahidouch<sup>a</sup><sup>a</sup> Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire (UR 4667), Université de Picardie Jules Verne, UFR des Sciences, 33 Rue St Leu, 80039 Amiens, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Ion channel  
Cytoskeleton  
cancer  
Protein interaction  
Scaffolding proteins  
Pharmacological targets

## ABSTRACT

Several processes occur during tumor development including changes in cell morphology, a reorganization of the expression and distribution of the cytoskeleton proteins as well as ion channels. If cytoskeleton proteins and ion channels have been widely investigated in understanding cancer mechanisms, the interaction between these two elements and the identification of the associated signaling pathways are only beginning to emerge. In this review, we summarize the work published over the past 15 years relating to the roles played by ion channels in these mechanisms of reorganization of the cellular morphology, essential to metastatic dissemination, both through the physical interactions with elements of the cytoskeleton and by intracellular signaling pathways involved.

## 1. Introduction

Despite significant progress in terms of screening and treatment, cancer remains a major public health problem because of their incidence and more particularly their mortality (World Health Organization, 2020). It is well-established that cancer cells hijack more or less the whole-cell machinery to sustain cell proliferation, promote cell migration and invasion, and evade apoptosis and immune system. All these processes define the hallmarks of cancer [1]. Changes in the extracellular microenvironment, such as pH or the composition of the extracellular matrix (ECM), also help to allow cancer cells to deviate cellular metabolism to their advantage [2–4]. Ionic imbalance, whether reflected in changes in ionic homeostasis or ion fluxes is another essential parameter of tumorigenesis. Numerous studies have thus contributed to considering ionic transporters, whether they are pumps, channels or receptors, as diagnostic, prognostic or therapeutic targets for cancers [5–7]. During carcinogenesis, cells are subject to specific modifications

such as a loss of control of cell cycle or apoptosis. Moreover, cancer cells can reorganize their intracellular architecture, also known as cytoskeleton, to enable cell architecture deformations to migrate and invade surrounding tissues. In the past three decades, an interplay between cytoskeleton and intercellular as intracellular ion flows has been discovered. It is thus well established that the calcium (Ca<sup>2+</sup>) signaling, as well as potassium (K<sup>+</sup>), magnesium (Mg<sup>2+</sup>), and chloride (Cl<sup>-</sup>) flow impacts cytoskeletal dynamics [8–11].

If most of these studies, conducted using drugs that selectively stabilize or destabilize microfilaments or microtubules (Table 1), described the impact on channel function, they could not demonstrate direct binding of specific cytoskeletal proteins to individual channel proteins [12]. This lack has been largely filled by technical advances in biochemistry and molecular biology, making it possible to dissociate the direct or indirect interactions of these channels with the components of the cytoskeleton. A relevant collection of the most significant advances on the influences between cell cytoskeleton and membrane channels,

**Abbreviations:** ADP, Adenosine diphosphate; AURKA, Aurora kinase A; Ca<sup>2+</sup>, Calcium ion; [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, Cytosolic calcium concentration; CAM, Cell adhesion molecules; Cdc42, Cell division control protein 42 homolog; CDK1, Cyclin-dependent kinase 1; Cl<sup>-</sup>, Chloride; CIC, Chloride intracellular channel; EB1, Microtubule plus-end-binding protein; ECM, Extracellular matrix; ER, Endoplasmic reticulum; ERM, Ezrin, radixin and moesin proteins; EVH1, Enabled/VASodilator-stimulated phosphoprotein homology 1; FAK, Focal adhesion kinase; FERM, 4.1R, ezrin, radixin, moesin; GTPase, Guanosine triphosphate hydrolase; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hydrogen peroxide; IP<sub>3</sub>R, Intositol triphosphate receptor; K<sup>+</sup>, Potassium; kDa, KiloDaltons; L-type calcium channel, Long-lasting type calcium channel; MAP, Microtubules associated proteins; MAPK, Mitogen-activated protein kinases; mAR, Membrane androgen receptor; mDIA, Diaphanous-related formin; Mg<sup>2+</sup>, Magnesium; NCX, Sodium/calcium exchanger; NED, Neuroendocrine differentiation; NHERF, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger regulatory factor; PDAC, Pancreatic ductal adenocarcinoma cells; PI3K, Phosphoinositide 3 kinase; PLC, Phospholipase C; PLK1, polo-like kinase 1; PM, Plasma membrane; SICE, Store-independent Ca<sup>2+</sup> entry; SOC, Store-operated channel; SOCE, Store-operated calcium entry; STIM, Stromal interaction molecule; TAC, Testosterone albumin conjugates; Tg, Thapsigargin; TRP channel, Transient receptor potential channel; TRPC, Transient receptor potential canonical channel; TRPM, Transient receptor potential melastatin channel; TRPV, Transient receptor potential vanilloid channel; UTP, Uridine triphosphate; VDAC, Voltage-dependent anion channel; VGCC, Voltage-gated calcium channel; YAP, Yes-associated protein; Zn<sup>2+</sup>, Zinc ion.

\* Corresponding author.

E-mail address: [lise.despoix@u-picardie.fr](mailto:lise.despoix@u-picardie.fr) (L. Rodat-Despoix).<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188627>

Received 30 April 2021; Received in revised form 8 September 2021; Accepted 8 September 2021

Available online 11 September 2021

0304-419X/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

receptors, and transporters has been proposed in a very interesting issue edited by Jean-Claude Hervé [13]. However, unlike axonal growth processes, mechanical stress transduction, or cardiovascular disease for which the link between cytoskeleton and ion channels has been widely described, the identification of such connection in cancer processes is emerging.

This review discusses recent advances in our understanding of the direct and indirect interactions between ion channels and the cytoskeleton, and their roles in tumorigenesis.

## 2. Cytoskeleton: an organized network

### 2.1. Cytoskeletal filaments

The cytoskeleton groups together a complex network of filaments ensuring the three-dimensional organization of cells. This network is made up of three main families of protein filaments; namely *microfilaments*, *microtubules*, and *intermediate filaments*; and confers mechanical, dynamic, and biological properties on cells. The assembly and disassembly of these filaments, offer to the cells the ability to maintain or remodel their internal architecture, modulating their interactions with their environment, trafficking internal organelles, or moving around one place to another (Fig. 1).

Filaments of the cytoskeleton with the smallest diameter (7 nm) microfilaments are formed of a central globular protein of 42 kDa: actin. Actin is the most conserved protein in eukaryotes with a much-conserved sequence broken down into 3 main isoforms:  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -actin [14]. Associated with this central protein, actin-binding proteins or partner proteins such as myosin [15], gelsolin [16], profilin [17], alpha-actinin [18], actin related protein 2/3 (ARP-2/3) [19], cofilin [20], allow the control of various cellular functions.

As the largest cytoskeleton filaments, with a 25 nm diameter, microtubules share also a common constitution: a globular protein of 50 kDa organized into dimers of tubulin, formed of  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits [21]. These heterodimers combine into polarized protofilaments, and 13 protofilaments constitute a hollow cylinder called a microtubule. To strengthen their stability, microtubules are associated with other proteins: Microtubules Associated Proteins (MAP), dyneins, and even kinesins [22,23] which play the role of protein engines making it possible to move organelles and vesicles into the cell. The interaction between microtubules and the actomyosin cytoskeleton (under the control of Rho GTPases) is essential to cancer processes [24–27]. Several chemical products and natural or synthetic compounds have been purified and are extensively used for their specific effect on these filaments (Table 1).

While actin and tubulin have been highly conserved during evolution, families of intermediate filaments are much extended. There are various forms of intermediate, tissue-specific filaments in the cytoplasm of animal cells, including keratin filaments of epithelial cells, neurofilaments of nerve cells, and desmin filaments of muscle cells. Their main function is to provide mechanical resistance. With a 10 nm diameter,

their role is thus mainly mechanical by constituting stable support for the microtubules to ensure the maintenance of the cell shape [35]. However, the proteins that make up these filaments are described as full-fledged molecular actors. Thereby, the expression of vimentin ensures mechanical stability of the cell but also appears essential for migratory and invasive properties, especially in breast cancer [36,37]. In addition, vimentin stabilizes the Focal Adhesion Kinase (FAK) protein *via* activation of Rac1 in lung cancer [38].

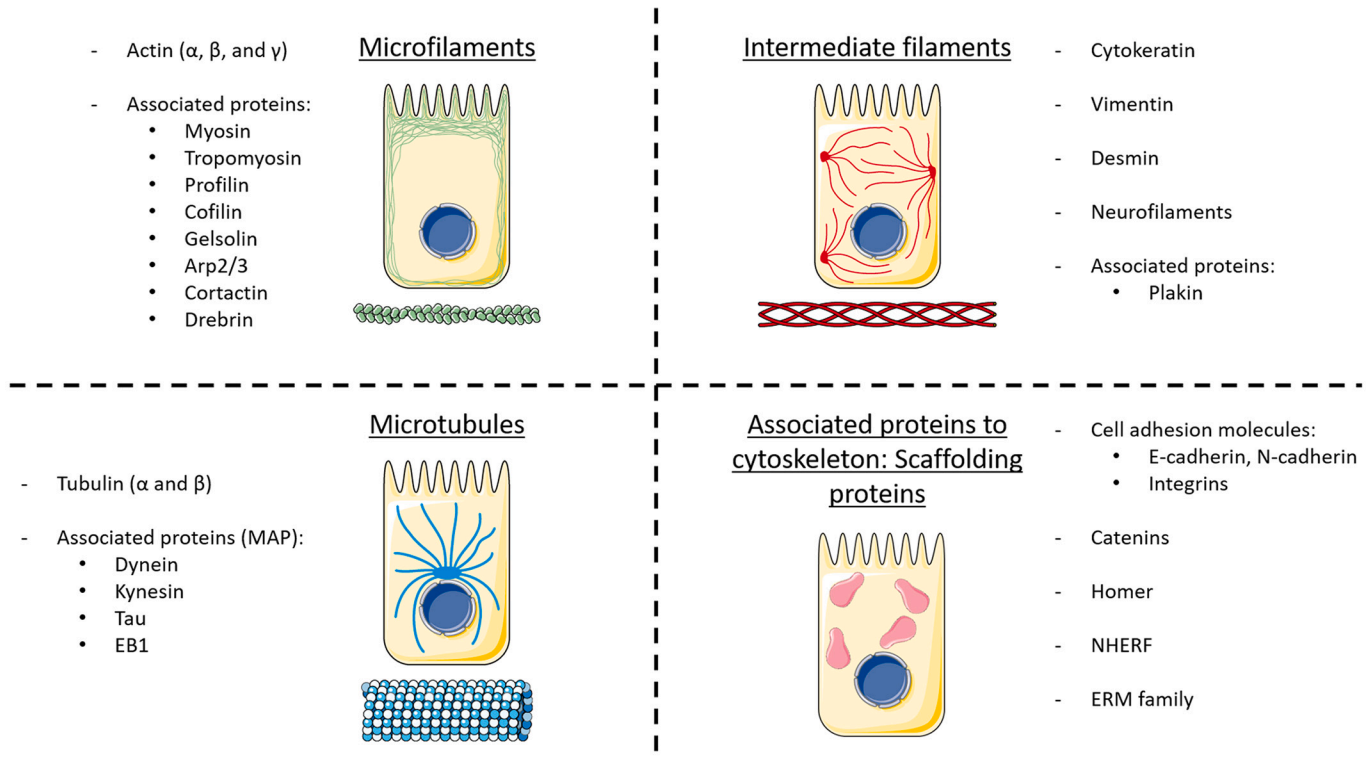
### 2.2. Cytoskeletal associated proteins

Cell morphology is also shaped by proteins serving as anchors to other proteins, thus facilitating their interaction. The name “scaffold” implies the formation of a stable complex, a notion further reinforced by their highly specific localization [39]. Scaffolding proteins bring together two or more proteins in a relatively stable configuration, facilitating their concerted interactions and functions. By establishing a close proximity between these proteins, they play critical roles in cellular signaling pathways (for example Mitogen-activated protein kinases (MAPK) signaling [40] or photosensory reception in *Drosophila* signaling [41]), are involved in the stabilization, sorting, recycling, and localization of cell surface receptors [42–45] as well as in cell polarity [46]. Scaffolding proteins have thus been the subject of numerous studies, exponentially increasing the number of their members (Fig. 1). Cell Adhesion Molecules (CAM) are major representatives of these proteins, including E- and N-cadherins as well as integrins, which determining role in the cancerous process is largely described. Indeed, E- and N-cadherins, transmembrane proteins of 120 to 140 kDa forming adherent junctions or desmosomes, are particularly involved in the epithelial-mesenchymal transition. Integrins are heterodimers made up of an alpha subunit and a beta subunit. Most of them bind to molecules of the extracellular matrix (ECM) (through their extracellular region) and actin microfilaments *via* several binding proteins that associate with their intracellular region. The activation of integrins can induce rearrangements of the actin cytoskeleton allowing the cells to adapt their morphology to the triggered processes (proliferation, migration, invasion ...). In that context, actin filaments form stress fibers that adhere to the substrate *via* the focal adhesion complexes and integrins, and which play an important role in the migratory, morphogenesis, and cellular trafficking processes [47].

Among the scaffolding proteins involved in the regulation of ion channels, Homer proteins are by far the most described. Members of the Homer family are predominantly expressed in the nervous system and are also present in peripheral tissues at low levels. Homer are adaptor proteins consisting of three members in mammals (Homer1, Homer2, and Homer3) classified into long (constitutively expressed) and short (expressed in an activity-dependent manner) forms [48]. The long Homer form contains an amino-terminal target-binding domain, which includes an Enabled/VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein (Ena/VASP) Homology 1 (EVH1) domain, and a carboxy-terminal self-assembly domain containing a coiled-coil domain, which allows the

**Table 1**  
Chemical agents affecting cytoskeleton organization.

	Chemical agent	Impact on filament	Mechanism of action	Origin	References
ACTIN	Phalloidin	Stabilize	binds to actin filaments and opposes their depolymerization	Death cap mushroom	[28]
	Jaspalakinolide	Polymerize	induces an amorphous polymerization with a nucleation every 3 actin-G: the filament is then disorganized.	<i>J. johnstoni</i> sponge	[29]
	Latrunculin A	Depolymerize	binds to the G-actin monomer and inhibits filament polymerization.	<i>Latrunculia Magnifica</i> Keller sponge	[30]
	Cytochalasin B	Depolymerize	covers the plus ends of the filaments	<i>Drechslera dematoidea</i> fungus	[31]
MICROTUBULES	Taxol®	Stabilize	attaches along the filaments	<i>T. brevifolia</i> Yew	[32]
	Nocodazole	Depolymerize	Binds to tubulin subunits	Synthetic	[33]
	Colchicine	Depolymerize	covers the ends of the filament	Autumn hooks	[34]



**Fig. 1.** Cytoskeletal organizational chart. Actin and tubulin are the main representatives of microfilament and microtubule families respectively. Intermediate filaments are a more heterogeneous sub-class as well as the scaffolding proteins section.

formation of homo- and heterocomplexes of Homer proteins, and two leucine zippers [49]. The short Homer forms lack the carboxyterminal domain. Members of the Homer family share a conserved amino-terminal EVH1-like domain, present in different  $\text{Ca}^{2+}$ -handling proteins such as phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ), inositol triphosphate receptors (IP $_3$ Rs), ryanodine receptors, Transient receptor potential canonical (TRPC) channels, the voltage-gated calcium channel (VGCC) Cav1.2 and stromal interaction molecule 1 (STIM1) [49].

With increasing interest in oncology research these last years, the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger regulatory factor (NHERF) family of scaffolding proteins has been identified as a link between ion channels and the actin-based cytoskeleton [50]. The NHERF family is composed of four members that possess either two or four PDZ domains. NHERF1 (EBP50) and NHERF2 (E3KARP) have two PDZ domains, whereas NHERF3 (PDZK1, CAP70, NaPi CAP-1) and NHERF4 (IKEPP, NaPi CAP-2) have four PDZ domains [51]. This PDZ domain is a common structural domain of 80–90 amino-acids playing a key role in the formation and function of signal transduction complexes [52]. Moreover, NHERF1/EBP50 and NHERF2/E3KARP display two PDZ domains and an additional Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)-binding domain (EB) protein-interacting domain conferring the property of connecting cell surface proteins to the intracellular actin cytoskeleton underlying the plasma membrane [53]. Interestingly, a dual role of NHERF1 in tumorigenesis has been shown, depending on its subcellular localization: when NHERF1 is located at the plasma membrane, it acts as a tumor suppressor [54]; whereas, cytoplasmic localization or loss of NHERF1 membrane expression prevents NHERF1 from acting as a tumor suppressor and has been implicated in the invasive phenotype [54,55].

In closed connection with NHERF members, ERM family has been identified as key regulators of cell signaling as well as cytoskeleton organization during cancer progression [56]. The ERM protein family consists of three closely related proteins that crosslink actin filaments with plasma membranes: Ezrin (originally isolated from chicken intestinal epithelial brush borders), Radixin (isolated from rat hepatocyte cell

junctions), and Moesin (first isolated from the bovine uterus). The mammalian ERM proteins are 70–75 kDa in molecular weight and are very similar to one another, having around 72–80% amino acid identity [57]. Although there is some overlap in the involvement of ERM proteins in tumor progression, each of these three proteins exerts its role in the cancer process individually. Thus, the expression levels of ERM proteins regulate the functional activity of the protein they anchor at the cell membrane, but the relevant regulatory scaffold protein differs depending upon the transporter, and also upon the tissue in which it is expressed [56,58]. Many studies have thus widely described the involvement of Ezrin in the cancerous process, where its expression is associated with a poor prognosis [59,60]. If the role of Radixin and Moesin in tumor development is less described, their expression has nevertheless also been correlated with cancer progression [61].

### 3. Ion channels in direct association with cytoskeleton:

If the organization of the cytoskeleton in healthy cells is a pledge for the cell to maintain its morphology and its anchoring in its environment, its rearrangement during tumorigenesis promotes the formation of tumors, survival, and metastasis. This reorganization is closely linked to changes in expression, localization, or even function of the ion channels with which certain components of the cytoskeleton interact.

#### 3.1. $\text{K}^+$ channels and cytoskeleton: actin and microtubules

Several earlier studies have shown the interaction between the cytoskeletal elements, including actin and microtubules, and ion channels in several cell types [12]. Studies over the last 25 years have also clearly deciphered the contribution of  $\text{K}^+$  channels to the proliferation and migration/invasion of cancer cells, leading to consider them as “new markers” in oncological research. These cellular processes require changes in the cytoskeleton organization that directly impact the function and recruitment of channels in the plasma membrane.

### 3.1.1. Modulation of $K^+$ channels expression and activity by the cytoskeleton

Kv10.1 (also known as Eag1, KCNH1) is a member of the voltage-gated potassium channel family and was the first identified ion channel showing oncogenic properties [62]. Its expression in normal tissues is mainly restricted to the brain [63]. However, it is overexpressed in over 70% of human tumors and correlated with a worse prognosis [64]. Recently, Ouadid-Ahidouch group reported evidence that Kv10.1 interacts functionally with the  $Ca^{2+}$  channel Orail and regulates breast cancer cell survival and migration by regulating a store-independent  $Ca^{2+}$  entry (SICE) [65–67]. Kv10.1 is regulated during the cell cycle and it shows reduced current in the M phase [9,68]. This regulation process is induced by alterations of its interaction with the cytoskeleton [9,69]. Moreover, cortactin, an actin-binding protein involved in cytoskeletal architecture and frequently overexpressed in cancer [70], directly interacts with Kv10.1 in cervical cancer cell lines [71]. Indeed, cortactin binds to the carboxy terminus (C-ter) region of Kv10.1 and controls its stability at the plasma membrane. Silencing of cortactin leads to the internalization of Kv10.1. The role of cortactin in the regulation of the Kv10.1 membrane fraction is essential for its activity. Indeed,  $K^+$  flow through Kv10.1 hyperpolarizes the membrane potential (Vm), which increases the driving force for  $Ca^{2+}$  [64].

### 3.1.2. Modulation of the cytoskeleton by $K^+$ channels

Kv10.1 is also reported to regulate proliferation by regulating cell cycle progression in several cancer types [64,72]. Silencing of Kv10.1 induces an accumulation of cells in the G2/M phase strengthening its role in the cell cycle. However, the mechanism of action remained not determined. Recently, Movsisyan and Pardo [73] reported, how Kv10.1 participates in G2/M regulation by modulating the microtubule dynamics during mitosis in cancer cells (Hela cells). Kv10.1 has a dual effect on the mitotic microtubule dynamics through its conducting and non-conducting properties. By promoting the  $Ca^{2+}$  entry through Orail, Kv10.1 regulates the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration  $[Ca^{2+}]_i$  and the frequency of cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations. The inhibition of Orail or Kv10.1 activity decreases both the  $[Ca^{2+}]_i$  and the frequency of cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations along with a reduction in growth speed/length as well as microtubule dynamicity. Interestingly, the blockade of the two channels has a non-additive effect demonstrating that these channels share the same pathways in regulating microtubule growth. However, silencing of Kv10.1 showed an opposite effect with an increase in  $[Ca^{2+}]_i$  and in  $Ca^{2+}$  oscillations frequency along with an increase in the dynamicity of mitotic microtubules. This suggested that Kv10.1 regulates the microtubule dynamics independently of its conducting pathway likely by interfering with the activation of kinases Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), Aurora kinase A (AURKA), or the polo-like kinase PLK1; even if it has not been demonstrated.

Several studies have also been led on Kv 11.1 (also known as hERG 1), which is found to be overexpressed in several types of cancer and regulates different carcinogenesis processes [74,75]. Moreover, this channel constitutes a sensor of the tumoral microenvironment [76]. Kv11.1 regulates cell migration of pancreatic ductal adenocarcinoma cells (PDAC), through a reorganization of F-actin in stress fibers and modulation of filopodia formation and dynamics [77]. Kv11.1 maintains stress fibers in a less organized arrangement in cells cultured on fibronectin that showed high levels of focal adhesion. Moreover, Kv11.1 activity determined the organization of cortical F-actin into sparse and long filopodia, and allowed F-actin polymerization in cells cultured in hypoxic conditioning medium of pancreatic stellate cells. Kv11.1 was mainly found co-localized with  $\beta 1$ -integrin in both focal adhesions and filopodia. Although the mechanism of action has not been shown in PDAC, the authors suggest the involvement of Kv11.1- $\beta 1$ -integrin-downstream signaling proteins, as paxillin, in the alteration of actin organization that regulate migration [77]. This mechanism seems to be calcium-dependent since E4031, a specific Kv11.1 blocker, decreases intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. The same authors also suggested that

Kv11.1 could modulate cell migration by non-conductive mechanisms through a direct link to F-actin.

### 3.2. TRP channels

Regarding the role of the transient receptor potential (TRP) family in the regulation of the cytoskeleton, interest can be brought to the TRP Vanilloid1 (TRPV1) and TRP Melastatin 7 (TRPM7). In 2011, Caprodossi *et al* showed that the loss of TRPV1 expression in urothelial cancer cell lines led the capsaicin-treated cells to acquire a more invasive phenotype. In fact, cells treated with capsaicin have been shown to exhibit rounded morphology as well as  $\alpha$ -tubulin disassembly possibly due to increased granzyme A activity [78]. Considering the TRPM7 channel, it has been shown to participate in the formation of invadosomes as in the regulation of the cytoskeleton in N1E-115 mouse neuroblastoma cells [79]. Indeed, inhibition of TRPM7 by waixenicin-A induces the contraction of actomyosin filaments, leading to a decrease in the number of invadosomes [79]. Besides, TRPM7 regulates the contractility of the actomyosin cytoskeleton of the N1E-115 neuroblastoma cell line, through a  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism and the activity of myosin IIA via the TRPM7 kinase domain [80]. Thus, treatment with bradykinin activates TRPM7 and increases the number and size of focal points. Moreover, TRPM7 activation by bradykinin induces podosome formation led by a redistribution of F-actin filaments and myosin IIA. It has also been demonstrated that the formation of podosomes induced by TRPM7 requires the activation of the kinase domain. In that context, the expression of dominant dead-kinase TRPM7 does not allow the formation of podosomes nor myosin IIA phosphorylation [80]. TRPM7 also interacts physically with cytoskeletal proteins such as myosin II (A, B, C), drebrin  $\alpha$ -actinin (1 and 4), and tropomodulin at the level of invadosomes to form a complex promoting the progression of neuroblastoma [81]. In breast cancer, TRPM7 confers a migrating phenotype by regulating actin architecture and formation of focal adhesions in the DA-MB-231 cell line. In that context, the loss of expression of TRPM7 allows the cell to acquire a contractile phenotype exhibiting in parallel an increased focal adhesion formation via paxilline phosphorylation [82]. In addition, TRPM7 activity helps to regulate the activation of myosin IIA fibers in breast cancer, as TRPM7 silencing reduces myosin IIA phosphorylation by 40% in MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cell lines [83].

### 3.3. Other channels

Orai channels family, known as store-operated channels (SOC) and activated for the most part by stromal interaction molecule (STIM) has been characterized almost 2 decades ago. It has been found that Orai channels are overexpressed in many types of cancer such as lung, breast, liver, colorectal, and cervical cancers, where they play a critical role in many cell processes [84]. Among the Orai channels, Orail is the most studied SOC type channel and regulates a wide variety of physiological and pathophysiological processes. Recently, it was discovered that the Orail activation by STIM1 requires interaction with the cytoskeleton. Thus, it has been shown, in the context of cervical cancer and using normal cervical cells, primary cervical cancer cells, and cervical cancer cell lines, that STIM1 acquires a translocation capacity at the endoplasmic reticulum (ER) – plasma membrane (-PM) junction via its association with the cytoskeleton. Indeed, the activation of the STIM1 protein, by the depletion of the calcium stores of the ER, leads to its trafficking to the plasma membrane through a mechanism involving its association with the microtubule plus-end-binding protein EB1 [85–88].

Cytoskeletal filaments have also been identified to directly interact with intra-cellular channels such as the mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC). This well-characterized mitochondrial outer-membrane channel regulates the permeability of the mitochondrial membrane as well as the flux of ions into the mitochondria [89].  $\alpha\beta$ -heterodimers of tubulin interact with VDAC and close the channel at nano-molar concentration [90]. The closure of VDAC by

tubulin leads to a decrease in mitochondrial membrane potential of cancer cells, impacting the mitochondrial metabolism and promoting the Warburg effect [91]. Moreover, the direct interaction of gelsolin, an actin-associated protein, with VDAC enhances its closure, leading to the inhibition of the mitochondria-dependent apoptotic pathway [92].

Regarding the reticulum, Thillaiappan and collaborators detected, using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) and single-particle tracking that IP<sub>3</sub>R1, in HeLa cells, moved within the ER by diffusion or by a directional movement that depends in part on kinesin and dynein interaction. Moreover, by combined red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator and TIRFM approach, they establish that Ca<sup>2+</sup> puffs are generated by immobile IP<sub>3</sub>Rs that are segregated from the more abundant pool of mobile IP<sub>3</sub>Rs [93].

#### 4. Ion channels in indirect interaction with the cytoskeleton through scaffolding proteins

Allowing indirect association of epithelial ion channels with the actin-based cytoskeleton, scaffolding proteins stabilize and cluster channels at the membrane. By physically tethering proteins, scaffolds locally concentrate, compartmentalize and position transporters/receptors or enzymes in close vicinity of their substrates or regulatory proteins, avoiding background and nonspecific interactions [54].

##### 4.1. K<sup>+</sup> channels and cell-extracellular matrix elements: the integrins connection

The best known K<sup>+</sup> channel interacting with cell-ECM elements is Kv11.1 through integrins (see reviews [76,94–97]). It was shown that Kv11.1 and β1-integrin co-localize in intracellular and surface membrane compartments [98]. The activation of Kv11.1 activates β1-integrin. Indeed, several studies reported the involvement of the N-terminus of HERG for β1-integrin binding [96,99,100]. Recently, He et al. [74], by using molecular docking, identified an amino acid residue within the hERG1 S4 voltage sensor as a potential interacting site for β1-integrin. Interestingly, hERG1 is largely expressed in the heart and overexpressed in cancer but it interacts with β1-integrin only in cancer cells and not in the heart. The role of the β1-integrin-hEAG1 complex and its signaling pathways have been extensively studied in different processes of several cancer types including leukemic, colorectal, or pancreatic cancers [77,98,101]. The stimulation of hERG1 current by ECM (mostly fibronectin) is accompanied by hERG1 binding to β1-integrin that phosphorylates FAK and therefore regulates the adhesion receptor signaling. Recently, Crottes et al. [102] have identified a Sigma 1 receptor as a key regulator in the ECM-induced formation of hERG1–β1-integrin complex in leukemia and colorectal cancer cells. Indeed, by increasing cell surface expression of hERG1, the Sigma1 receptor promotes the formation of a hERG1/β1-integrin complex that leads to invasion, angiogenesis, and extravasation via the PI3K/AKT pathway. In colorectal cancer cells seeded on collagen 1, Kv11.1 forms also a macromolecular complex with β1-integrin and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1 (NHE1) leading to intracellular pH regulation that, in turn, regulates cell motility triggered by β1 integrin-dependent adhesion [103].

##### 4.2. Mechanosensitive channels

Firstly characterized by Coste et al. [104] PIEZO channels are mechanosensitive channels composed of 2 isoforms named PIEZO 1 and 2. In the regulation of the cell architecture, the PIEZO2 isoform has been shown, in the MDA-MB-231 BrM2 cell line, to regulate the organization of the actin cytoskeleton in aggressive breast cancer cells. Indeed, it has been demonstrated that the calcium influx through PIEZO2 allows activation of the Rho/mDia signaling pathway, promoting thus an architectural organization of actin into stress fibers via the transcription factor Yes-Associated Protein (YAP) [105].

Some TRP channels like TRPV4 can also be activated by a mechanical

stimulus. TRPV4 has been shown to regulate the migration of breast cancer cells by reducing cell stiffness through cytoskeletal regulation. Indeed, TRPV4 overexpression causes a 5 to 10% decrease of the ERM family proteins phosphorylation [106]. In contrast, the combination with hypo-osmotic shock exacerbates this decrease by 10 to 20%, indicating a weaker binding of F-actin to transmembrane proteins. The overexpression of TRPV4 also decreases the levels of cofilin phosphorylation, the expression of E-cadherin, and increases the G-actin/F-actin ratio [106].

##### 4.3. SOC channels

Among the Orai channels, Orai1 is the most studied SOC type channel. In 2009, the study led by Yang et al. has shown that Orai1, in combination with STIM1, is required for cell migration as well as metastasis in breast cancer [107]. Indeed, they have shown that the functional inactivation of Orai1 and STIM1 leads to an increase in the size of the focal adhesions in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. In addition, pharmacological inhibition of Orai1 by SKF96365 prevents the formation of new focal complexes, at the level of cell protrusions, and decreases the rate of focal adhesions disassembly. This result demonstrates the involvement of Orai1 in the regulation of the cytoskeleton via the small GTPases [107].

The actin cytoskeleton may also play a role in the regulation of calcium influx. This is the case, for example, in glioma. It has been shown that the dismantling of the actin cytoskeleton causes a decrease in the calcium signal activated by ADP or UTP and reduces the calcium entry into C6 glioma cells. In contrast, no difference was shown in the calcium signal induced by thapsigargin (Tg) [108]. Recently, it has been discovered that Orai1 expression could be regulated by a mechanism involving the cytoskeleton. Indeed, in the breast cancer cell line MCF-7, the activation of membrane androgen receptors (mARs) by testosterone albumin conjugates (TAC) triggers a strong transient increase of Orai1 at both the transcriptional and protein level. The Orai1 overexpression required activation of Rac1 GTPase and reorganization of the actin cytoskeleton. Indeed, both the inhibition of Rac1 and the polymerization of actin prevent the effect on the expression of Orai1 [109]. In prostate cancer, it has also been found that SOC activity can be regulated by the cytoskeleton. In fact, pharmacological actin disassembly following cytochalasin D treatment has shown a decrease of the store-operated calcium entry induced by Tg. Moreover, the level of differentiation of cancer cells can also play a role in the regulation of store-operated calcium entry (SOCE): Vanoverberghe et al. [110] demonstrated that neuroendocrine differentiation (NED) of prostate cancer cells induced by androgen deprivation resulted in a decrease of SOCE due to cortical F-actin over-polymerization, whereas actin polymerization enhances Tg-induced Ca<sup>2+</sup> stores depletion in undifferentiated LNCaP cells. The explanation could be the fact that when neuroendocrine differentiation occurs, over-polymerization of F-actin is observed, which may be a key point in the loss of SOCE induced by Tg in these cells. The cytoskeletal reorganization could be a signaling pathway used by cancer cells exhibiting neuroendocrine differentiation to downregulate SOC activity in prostate cancer cells [110].

##### 4.4. Other channels

Interestingly, the function of TRPC1 has been shown to be modulated through an interaction with the scaffolding protein Homer in skeletal muscle sarcolemma [111]; the lack of its interaction promoting the constitutive activity of TRPC1 [112,113]. Moreover, Homer expression was found to facilitate a physical association between TRPC1 and the IP<sub>3</sub>R that is necessary for responses to G-protein-coupled receptor activation [114]. In human epidermoid carcinoma cells A431, Homer proteins are endogenously expressed and can specifically bind to IP<sub>3</sub>R1 and interact with components of the store-operated influx system, preventing constitutive channel activation [115].

Additionally to the interaction of scaffolding protein Homer to assemble the TRPC1-IP<sub>3</sub>R complex, Vautrin-Glabik et al. established in breast cancer cell lines, the close link between the level of expression of IP<sub>3</sub>R3 and the remodeling of profilin cytoskeleton organization [116]. By silencing strategy, they demonstrated that IP<sub>3</sub>R3 silencing induces rounding shape and decreases adhesion in invasive breast cancer cell lines MDA-MB-231 and 435s. Moreover, IP<sub>3</sub>R3 silencing decreases Rho-GTPase activating-protein 18 (ARHGAP18) expression, RhoA activity, cell division control protein 42 homolog (Cdc42) and mDIA1 expression, and Y<sup>861</sup>FAK phosphorylation. Interestingly, IP<sub>3</sub>R3 was able to regulate profilin remodeling, without inducing any myosin II reorganization. Such a result could not be observed with IP<sub>3</sub>R1 or IP<sub>3</sub>R2 silencing, highlighting the specificity of the interaction between IP<sub>3</sub>R3 and profilin in breast cancer cell lines MDA-MB-231 and -435s [116].

Chloride channels are also linked to cytoskeletal rearrangements in metastasis processes. Indeed, Zhan et al. showed, in nasopharyngeal carcinoma (CNE-2Z) cells treated with 10 μM paclitaxel for 3 h, an up-regulation of the sub-type 3 of chloride intracellular channel (ClC-3) proteins that are partially overlapped with the microtubules assembled from α-tubulins. Moreover, considering that the chloride currents were increased by paclitaxel, the authors speculated that the microtubule cytoskeleton may participate in the trafficking of ClC-3 proteins while the microtubule cytoskeleton in the membrane may regulate ClC-3 channel activities [117]. Channels related to cell volume regulation are also fine interacting partners of scaffold proteins, especially with the NHERF scaffolding proteins family. NHE1 has thus been proposed to facilitate cell migration through cell volume regulation, actin polymerization, collagen-integrin adhesion, and degradation of the extracellular matrix [118]. Moreover, the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-435 have higher NHE1 activity than normal human breast cells under serum deprivation conditions, a common environment in tumor tissue [119]. NHE-1 is also known to regulate invadopodium-mediated matrix degradation due to its recruitment by Talin. Indeed, Beaty et al. demonstrated that Talin, a member of 4.1R, ezrin, radixin, moesin (FERM) superfamily protein, is able to recruit the

moesin-NHE-1 complex to invadopodia through its C-ter domain, and thus promoting mammary tumor metastasis [120]. Another ion transporter that interacts with scaffolding proteins is the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX), whose knocking-down of type 1 sub-type induces an epithelial-to-mesenchymal transition in kidney epithelial cells [121]. In this study, the authors demonstrate that NCX1 knockdown does not affect the structure of the actin cytoskeleton but changes the morphology of the cell through the interruption of the connection with E-cadherin that is tightly linked to the actin cytoskeleton.

## 5. Conclusion

Over the past decade, published work in oncology has helped to establish that there is a bidirectional interaction between the cytoskeleton and ion channels (Cf Fig. 2 for illustration). Indeed, the interaction of the cytoskeleton with the channels directly impacts the functioning of the latter, just as the functioning of the ion channels modulates the arrangement of the components of the cytoskeleton. It is now clearly established that this partnership between cytoskeleton and ion channels modulates the cancer process.

Ion channels have always been pharmacological targets of interest due to their location on the plasma membrane for the most part. A broad range of existing inhibitors is already in clinical use in cardiology [122] or in neurology [123]. Nevertheless, most of these inhibitors act as much on healthy cells as they do on cancer cells, with a risk that certain blockers may have off-target effects on normal physiological functions [7]. With the partially unanswered question of whether ion conductivity is needed for cancer development and progression, ion channels represent actually attractive diagnostic marker for cancer progression [3,6,7,124] as chemotherapeutic resistance [125]. Aside from the potential use of ion channels as anticancer drug targets, current clinical assays suggest using ion channels as tumor-specific targets for the delivery of toxins in a combinatorial treatments strategy [7,126].

By disrupting mitosis, cytoskeleton-specific agents are currently used in chemotherapy since fifty years ago [127]. The potential and

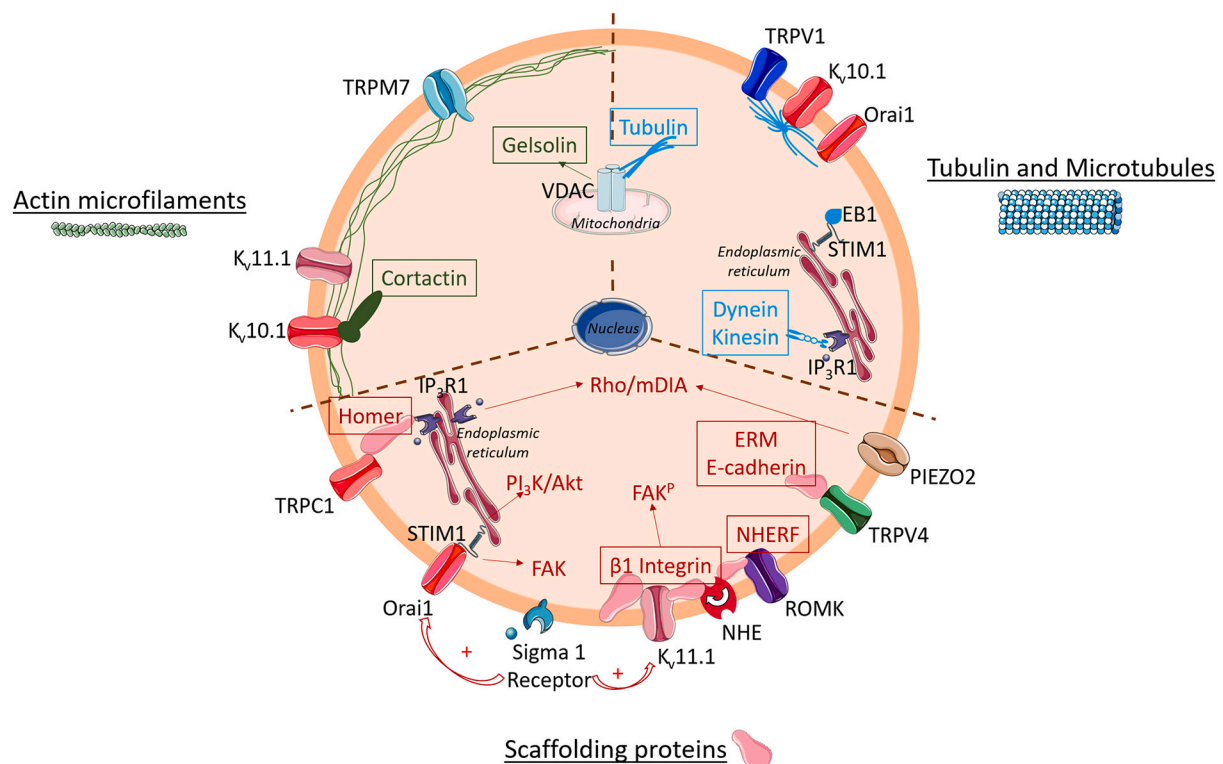


Fig. 2. Schematic representation summarizing the major direct and indirect interaction of ion channels with the cytoskeleton network in cancer processes.



limitations of targeting various classes of cytoskeletal protein for therapeutic are remarkably exposed in the recent review of Ong et al. [91]. Pharmacological tools developed essentially target the microtubules and can be subdivided into two main classes: microtubule polymerization-inhibiting or microtubule-stabilizing agents [128,129]. These include well-known drugs, such as taxanes and epothilones that stabilize the structure of the polymerized microtubules. Moreover, the targeting of cytoskeletal-associated proteins, can also affect cell adhesion or motility and inhibit cancer progression [91]. Nevertheless, drug resistance processes occur to microtubule-binding anti-cancer chemotherapeutics due to tubulin overexpression or interaction with other proteins disturbing drug delivery and metabolism [130]. This lead to develop pharmacological agents targeting intermediate filaments or cytoskeletal-associated protein such as integrins or tropomyosin whose inhibition impact cell morphology and tumor progression [91].

Another therapeutic strategy relies on specifically targeting cytoskeletal components, such as actin-targeting drugs like cytochalasin or jasplakinolide (Cf Table 1). However such a drug lacks specificity to cancer cells and induces lethality or cardiac and renal toxicity. Targeting intermediate filaments appear more suitable as they are specifically overexpressed in cancer cells vs healthy cells, limiting side effects and toxicity.

Over the past decade, special attention has also been paid to the nuclear cytoskeleton, whose closed interaction with the nuclear pore complex (NPC) has been established. The NPCs form selective channels that function together to guide protein and RNA trafficking between the nucleus and cytoplasm. NPC is also a linker of nucleoskeleton and cytoskeleton. In that context, changes in NPC-lamin interactions alter nuclear morphology in numerous cancer types [131], and alterations in nuclear plasticity may promote invasion and metastasis [132]. In conclusion, more and more studies tend to establish that ion channels can no longer only be considered as local regulators of ionic flow in biological processes but must be integrated as hubs connected with the intracellular network. In order to be as close as possible to the physiological reality, it seems opportune to develop new pharmacological tools taking into account these interactions between ion channels and the cytoskeleton.

## Declaration of Competing Interest

All authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgments

M.C. is grateful for the funding from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Université de Picardie Jules Verne, and the Cancéropôle Nord-Ouest. This work was supported by the Université de Picardie Jules Verne, the Région Hauts-de-France, the Fonds Européen de Développement Régional (FEDER), the Ligue contre le cancer and the Cancéropôle Nord-Ouest.

## References

- [1] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 144 (5) (2011) 646–674.
- [2] Z. Petho, et al., pH-channeling in cancer: how pH-dependence of cation channels shapes cancer pathophysiology, *Cancers* 12 (9) (2020).
- [3] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* 98 (2) (2018) 559–621.
- [4] S. Nallanthighal, J.P. Heiserman, D.J. Cheon, The role of the extracellular matrix in cancer stemness, *Front. Cell. Develop. Biol.* 7 (2019) 86.
- [5] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion channels and the hallmarks of cancer, *Trends Mol. Med.* 16 (3) (2010) 107–121.
- [6] A. Litan, S.A. Langhans, Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression, *Front. Cell. Neurosci.* 9 (2015) 86.
- [7] A.L. Capatina, D. Lagos, W.J. Brackenbury, Targeting ion channels for cancer treatment: current progress and future challenges, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* (2020) 1–43, [https://doi.org/10.1007/112\\_2020\\_46](https://doi.org/10.1007/112_2020_46). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [8] E. Davies, Intercellular and intracellular signals and their transduction via the plasma membrane-cytoskeleton interface, *Semin. Cell Biol.* 4 (2) (1993) 139–147.
- [9] J. Camacho, et al., Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels, *Pflügers Archiv.* 441 (2–3) (2000) 167–174.
- [10] A.R. Prescott, et al., Effects of elevated intracellular magnesium on cytoskeletal integrity, *J. Cell Sci.* 89 (Pt 3) (1988) 321–329.
- [11] E.M. Schwiebert, J.W. Mills, B.A. Stanton, Actin-based cytoskeleton regulates a chloride channel and cell volume in a renal cortical collecting duct cell line, *J. Biol. Chem.* 269 (10) (1994) 7081–7089.
- [12] P.A. Janmey, The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling, *Physiol. Rev.* 78 (3) (1998) 763–781.
- [13] J.C. Herve, Reciprocal influences between cell cytoskeleton and membrane channels, receptors and transporters, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2) (2014) 511–513.
- [14] I.M. Herman, Actin isoforms, *Curr. Opin. Cell Biol.* 5 (1) (1993) 48–55.
- [15] K.A. Makowska, et al., Specific myosins control actin organization, cell morphology, and migration in prostate cancer cells, *Cell Rep.* 13 (10) (2015) 2118–2125.
- [16] H. Fujita, et al., Characterization of gelsolin truncates that inhibit actin depolymerization by severing activity of gelsolin and cofilin, *Eur. J. Biochem.* 248 (3) (1997) 834–839.
- [17] D.A. Kaiser, et al., Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*, *J. Cell Sci.* 112 (Pt 21) (1999) 3779–3790.
- [18] K. Honda, et al., Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion, *J. Cell Biol.* 140 (6) (1998) 1383–1393.
- [19] H.N. Higgs, L. Blanchoin, T.D. Pollard, Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) and the Arp2/3 complex on actin polymerization, *Biochemistry* 38 (46) (1999) 15212–15222.
- [20] N. Zebda, et al., Phosphorylation of ADF/cofilin abolishes EGF-induced actin nucleation at the leading edge and subsequent lamellipod extension, *J. Cell Biol.* 151 (5) (2000) 1119–1128.
- [21] D.D. Tang, B.D. Gerlach, The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration, *Respir. Res.* 18 (1) (2017) 54.
- [22] L.S. Goldstein, R.D. Vale, Motor proteins. a brave new world for dynein, *Nature* 352 (6336) (1991) 569–570.
- [23] R.D. Vale, T.S. Reese, M.P. Sheetz, Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility, *Cell* 42 (1) (1985) 39–50.
- [24] A.F. Palazzo, et al., Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling, *Science* 303 (5659) (2004) 836–839.
- [25] T. Wittmann, G.M. Bokoch, C.M. Waterman-Storer, Regulation of leading edge microtubule and actin dynamics downstream of Rac1, *J. Cell Biol.* 161 (5) (2003) 845–851.
- [26] K. Kikuchi, K. Takahashi, WAVE2- and microtubule-dependent formation of long protrusions and invasion of cancer cells cultured on three-dimensional extracellular matrices, *Cancer Sci.* 99 (11) (2008) 2252–2259.
- [27] J. Oyanagi, et al., Epithelial-mesenchymal transition stimulates human cancer cells to extend microtubule-based invasive protrusions and suppresses cell growth in collagen gel, *PLoS one* 7 (12) (2012), e53209.
- [28] A.M. Lengsfeld, et al., Interaction of phalloidin with actin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71 (7) (1974) 2803–2807.
- [29] A.M. Senderowicz, et al., Jasplakinolide's inhibition of the growth of prostate carcinoma cells in vitro with disruption of the actin cytoskeleton, *J. Natl. Cancer Inst.* 87 (1) (1995) 46–51.
- [30] I. Spector, et al., Latrunculin–novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D, *Cell Motil. Cytoskeleton* 13 (3) (1989) 127–144.
- [31] S.S. Brown, J.A. Spudich, Cytochalasin inhibits the rate of elongation of actin filament fragments, *J. Cell Biol.* 83 (3) (1979) 657–662.
- [32] N. Kumar, Taxol-induced polymerization of purified tubulin. mechanism of action, *J. Biol. Chem.* 256 (20) (1981) 10435–10441.
- [33] F. Samson, et al., Nocodazole action on tubulin assembly, axonal ultrastructure and fast axoplasmic transport, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208 (3) (1979) 411–417.
- [34] D.L. Sackett, J.K. Varma, Molecular mechanism of colchicine action: induced local unfolding of beta-tubulin, *Biochemistry* 32 (49) (1993) 13560–13565.
- [35] D.A. Fletcher, R.D. Mullins, Cell mechanics and the cytoskeleton, *Nature* 463 (7280) (2010) 485–492.
- [36] B. Eckes, et al., Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts, *J. Cell Sci.* 111 (Pt 13) (1998) 1897–1907.
- [37] C. Gilles, et al., Transactivation of vimentin by beta-catenin in human breast cancer cells, *Cancer Res.* 63 (10) (2003) 2658–2664.
- [38] L.S. Havel, et al., Vimentin regulates lung cancer cell adhesion through a VAV2-Rac1 pathway to control focal adhesion kinase activity, *Oncogene* 34 (15) (2015) 1979–1990.
- [39] D. Garbett, A. Bretscher, The surprising dynamics of scaffolding proteins, *Mol. Biol. Cell* 25 (16) (2014) 2315–2319.
- [40] J.A. Printen, G.F. Sprague Jr., Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade, *Genetics* 138 (3) (1994) 609–619.
- [41] B.H. Shieh, M.Y. Zhu, Regulation of the TRP Ca<sup>2+</sup> channel by INAD in 16 (5) (1996) 991–998.
- [42] S. Shenolikar, E.J. Weinman, NHERF: targeting and trafficking membrane proteins, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280 (3) (2001) F389–F395.

- [43] B.E. Lauffer, et al., SNX27 mediates PDZ-directed sorting from endosomes to the plasma membrane, *J. Cell Biol.* 190 (4) (2010) 565–574.
- [44] J.A. Ardura, P.A. Friedman, Regulation of G protein-coupled receptor function by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange regulatory factors, *Pharmacol. Rev.* 63 (4) (2011) 882–900.
- [45] G. Romero, M. von Zastrow, P.A. Friedman, Role of PDZ proteins in regulating trafficking, signaling, and function of GPCRs: means, motif, and opportunity, *Adv. Pharmacol.* 62 (2011) 279–314.
- [46] B.J. Thompson, Cell polarity: models and mechanisms from yeast, worms and flies, *Development* 140 (1) (2013) 13–21.
- [47] S. Tojkander, G. Gateva, P. Lappalainen, Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles, *J. Cell Sci.* 125 (Pt 8) (2012) 1855–1864.
- [48] Y. Shiraiishi-Yamaguchi, T. Furuichi, The Homer family proteins, *Genome Biol.* 8 (2) (2007) 206.
- [49] T. Smani, et al., Cytoskeletal and scaffolding proteins as structural and functional determinants of TRP channels, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2) (2014) 658–664.
- [50] S. Shenolikar, et al., Regulation of ion transport by the NHERF family of PDZ proteins, *Physiology* 19 (2004) 362–369.
- [51] C. Mazzochi, D.J. Benos, P.R. Smith, Interaction of epithelial ion channels with the actin-based cytoskeleton, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291 (6) (2006) F1113–F1122.
- [52] H.J. Lee, J.J. Zheng, PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification, *Cell Commun. Signal.* 8 (2010) 8.
- [53] D. Reczek, M. Berryman, A. Bretscher, Identification of EBP50: a PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family, *J. Cell Biol.* 139 (1) (1997) 169–179.
- [54] J. Vaquero, et al., Role of the PDZ-scaffold protein NHERF1/EBP50 in cancer biology: from signaling regulation to clinical relevance, *Oncogene* 36 (22) (2017) 3067–3079.
- [55] A.M. Bushau-Sprinkle, E.D. Lederer, New roles of the Na<sup>+</sup>( )/H<sup>+</sup>( ) exchange regulatory factor 1 scaffolding protein: a review, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 318 (3) (2020) F804–F808.
- [56] J. Clucas, F. Valderrama, ERM proteins in cancer progression, *J. Cell Sci.* 127 (Pt 2) (2014) 267–275.
- [57] A.I. McClatchey, ERM proteins, *Curr. Biol.* 22 (18) (2012) R784–R785.
- [58] T. Ogiwara, et al., Physiological roles of ERM proteins and transcriptional regulators in supporting membrane expression of efflux transporters as factors of drug resistance in cancer, *Cancers* 12 (11) (2020).
- [59] J. Kong, et al., Ezrin contributes to cervical cancer progression through induction of epithelial-mesenchymal transition, *Oncotarget* 7 (15) (2016) 19631–19642.
- [60] N. Li, et al., Ezrin promotes breast cancer progression by modulating AKT signals, *Br. J. Cancer* 120 (7) (2019) 703–713.
- [61] T.L. Bartholow, et al., Immunohistochemical staining of radixin and moesin in prostatic adenocarcinoma, *BMC Clin. Pathol.* 11 (2011) 1.
- [62] L.A. Pardo, et al., Oncogenic potential of EAG K<sup>( )</sup> channels, *EMBO J.* 18 (20) (1999) 5540–5547.
- [63] B. Hemmerlein, et al., Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours, *Mol. Cancer* 5 (2006) 41.
- [64] H. Ouadid-Ahidouch, A. Ahidouch, L.A. Pardo, Kv10.1 K<sup>( )</sup> channel: from physiology to cancer, *Pflügers Archiv.* 468 (5) (2016) 751–762.
- [65] M. Badaoui, et al., Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway, *Oncotarget* 9 (37) (2018) 24653–24671.
- [66] M. Peretti, et al., Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 1175.
- [67] M. Hammadi, et al., Human ether a-go-go K<sup>( )</sup> channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry, *J. Cell. Physiol.* 227 (12) (2012) 3837–3846.
- [68] L.A. Pardo, et al., Cell cycle-related changes in the conducting properties of r-eag K<sup>+</sup> channels, *J. Cell Biol.* 143 (3) (1998) 767–775.
- [69] C. Toral, et al., Effect of extracellular matrix on adhesion, viability, actin cytoskeleton and K<sup>+</sup> currents of cells expressing human ether a go-go channels, *Life Sci.* 81 (3) (2007) 255–265.
- [70] M. Yin, W. Ma, L. An, Cortactin in cancer cell migration and invasion, *Oncotarget* 8 (50) (2017) 88232–88243.
- [71] S. Herrmann, et al., Cortactin controls surface expression of the voltage-gated potassium channel K(V)10.1, *J. Biol. Chem.* 287 (53) (2012) 44151–44163.
- [72] V. Cazares-Ordóñez, L.A. Pardo, Kv10.1 potassium channel: from the brain to the tumors, *Biochem. Cell Biol.* 95 (5) (2017) 531–536.
- [73] N. Movsisyan, L.A. Pardo, Kv10.1 regulates microtubule dynamics during mitosis, *Cancers* 12 (9) (2020).
- [74] S. He, et al., HERG channel and cancer: a mechanistic review of carcinogenic processes and therapeutic potential, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1873 (2) (2020), 188355.
- [75] A.P. Larsen, Role of ERG1 isoforms in modulation of ERG1 channel trafficking and function, *Pflügers Archiv.* 460 (5) (2010) 803–812.
- [76] A. Becchetti, A. Arcangeli, Integrins and ion channels in cell migration: implications for neuronal development, wound healing and metastatic spread, *Adv. Exp. Med. Biol.* 674 (2010) 107–123.
- [77] S. Manoli, et al., The activity of kv 11.1 potassium channel modulates F-actin organization during cell migration of pancreatic ductal adenocarcinoma cells, *Cancers* 11 (2) (2019).
- [78] S. Caproddi, et al., Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells, *Carcinogenesis* 32 (5) (2011) 686–694.
- [79] D. Visser, et al., TRPM7 triggers Ca<sup>2+</sup> sparks and invadosome formation in neuroblastoma cells, *Cell Calcium* 54 (6) (2013) 404–415.
- [80] K. Clark, et al., TRPM7, a novel regulator of actomyosin contractility and cell adhesion, *EMBO J.* 25 (2) (2006) 290–301.
- [81] J. Middelbeek, et al., The TRPM7 interactome defines a cytoskeletal complex linked to neuroblastoma progression, *Eur. J. Cell Biol.* 95 (11) (2016) 465–474.
- [82] J. Middelbeek, et al., TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis, *Cancer Res.* 72 (16) (2012) 4250–4261.
- [83] A. Guilbert, et al., Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain, *Eur. J. Cancer* 49 (17) (2013) 3694–3707.
- [84] S.B. Chalmers, G.R. Monteith, Orai channels and cancer, *Cell Calcium* 74 (2018) 160–167.
- [85] Y.F. Chen, L.H. Chen, M.R. Shen, The distinct role of STIM1 and STIM2 in the regulation of store-operated Ca<sup>(2 )</sup> entry and cellular function, *J. Cell. Physiol.* 234 (6) (2019) 8727–8739.
- [86] Y.F. Chen, K.F. Hsu, M.R. Shen, The store-operated Ca<sup>(2 )</sup> entry-mediated signaling is important for cancer spread, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (6 Pt B) (2016) 1427–1435.
- [87] Y.T. Chen, et al., Microtubule-associated histone deacetylase 6 supports the calcium store sensor STIM1 in mediating malignant cell behaviors, *Cancer Res.* 73 (14) (2013) 4500–4509.
- [88] S. Honnappa, et al., An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal, *Cell* 138 (2) (2009) 366–376.
- [89] A. Magri, S. Reina, V. De Pinto, VDAC1 as pharmacological target in cancer and neurodegeneration: focus on its role in apoptosis, *Front. Chem.* 6 (2018) 108.
- [90] T.K. Rostovtseva, et al., Tubulin binding blocks mitochondrial voltage-dependent anion channel and regulates respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (48) (2008) 18746–18751.
- [91] M.S. Ong, et al., Cytoskeletal proteins in cancer and intracellular stress: a therapeutic perspective, *Cancers* 12 (1) (2020).
- [92] H. Kusano, et al., Human gelsolin prevents apoptosis by inhibiting apoptotic mitochondrial changes via closing VDAC, *Oncogene* 19 (42) (2000) 4807–4814.
- [93] N.B. Thillaiappan, et al., Ca<sup>(2 )</sup> signals initiate at immobile IP3 receptors adjacent to ER-plasma membrane junctions, *Nat. Commun.* 8 (1) (2017) 1505.
- [94] A. Becchetti, G. Petroni, A. Arcangeli, Ion Channel conformations regulate integrin-dependent signaling, *Trends Cell Biol.* 29 (4) (2019) 298–307.
- [95] A. Arcangeli, A. Becchetti, Complex functional interaction between integrin receptors and ion channels, *Trends Cell Biol.* 16 (12) (2006) 631–639.
- [96] S. Pillozzi, A. Arcangeli, Physical and functional interaction between integrins and hERG1 channels in cancer cells, *Adv. Exp. Med. Biol.* 674 (2010) 55–67.
- [97] A. Arcangeli, A. Becchetti, Integrin structure and functional relation with ion channels, *Adv. Exp. Med. Biol.* 674 (2010) 1–7.
- [98] S. Pillozzi, et al., VEGFR-1 (FLT-1), beta1 integrin, and hERG K<sup>+</sup> channel for a macromolecular signaling complex in acute myeloid leukemia: role in cell migration and clinical outcome, *Blood* 110 (4) (2007) 1238–1250.
- [99] A. Cherubini, et al., Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling, *Mol. Biol. Cell* 16 (6) (2005) 2972–2983.
- [100] G. Hofmann, et al., HERG K<sup>+</sup> channels activation during beta(1) integrin-mediated adhesion to fibronectin induces an up-regulation of alpha(v)beta(3) integrin in the preosteoclastic leukemia cell line FLG 29.1, *J. Biol. Chem.* 276 (7) (2001) 4923–4931.
- [101] O. Crociani, et al., hERG1 channels modulate integrin signaling to trigger angiogenesis and tumor progression in colorectal cancer, *Sci. Rep.* 3 (2013) 3308.
- [102] D. Crottes, et al., SIGMAR1 regulates membrane electrical activity in response to extracellular matrix stimulation to drive cancer cell invasiveness, *Cancer Res.* 76 (3) (2016) 607–618.
- [103] J. Iorio, et al., KV11.1 Potassium Channel and the Na<sup>( )</sup>/H<sup>( )</sup> antiporter NHE1 modulate adhesion-dependent intracellular pH in colorectal cancer cells, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 848.
- [104] B. Coste, et al., Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels, *Science* 330 (6000) (2010) 55–60.
- [105] C. Pardo-Pastor, et al., Piezo2 channel regulates RhoA and actin cytoskeleton to promote cell mechanobiological responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (8) (2018) 1925–1930.
- [106] W.H. Lee, et al., TRPV4 regulates breast cancer cell extravasation, stiffness and actin cortex, *Sci. Rep.* 6 (2016) 27903.
- [107] S. Yang, J.J. Zhang, X.Y. Huang, Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis, *Cancer cell* 15 (2) (2009) 124–134.
- [108] P. Sabala, et al., Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296 (2) (2002) 484–491.
- [109] G. Liu, et al., Up-regulation of Orai1 expression and store operated Ca<sup>(2 )</sup> entry following activation of membrane androgen receptors in MCF-7 breast tumor cells, *BMC Cancer* 15 (2015) 995.
- [110] K. Vanoverberghe, et al., Cytoskeleton reorganization as an alternative mechanism of store-operated calcium entry control in neuroendocrine-differentiated cells, *PLoS one* 7 (9) (2012), e45615.
- [111] J.A. Stiber, et al., Mice lacking Homer 1 exhibit a skeletal myopathy characterized by abnormal transient receptor potential channel activity, *Mol. Cell. Biol.* 28 (8) (2008) 2637–2647.
- [112] O. Mignen, et al., Constitutive calcium entry and cancer: updated views and insights, *Eur. Biophys. J.* 46 (5) (2017) 395–413.
- [113] B. Constantin, Role of scaffolding proteins in the regulation of TRPC-dependent calcium entry, *Adv. Exp. Med. Biol.* 898 (2016) 379–403.

- [114] J.P. Yuan, et al., Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors, *Cell* 114 (6) (2003) 777–789.
- [115] A.V. Shalygin, et al., Homer 1a induces calcium channel activation, but does not change their properties in A431 cells, *Bull. Exp. Biol. Med.* 165 (2) (2018) 272–275.
- [116] A. Vautrin-Glabik, et al., IP3R3 silencing induced actin cytoskeletal reorganization through ARHGAP18/RhoA/mDia1/FAK pathway in breast cancer cell lines, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1865 (7) (2018) 945–958.
- [117] H. Zhang, et al., The ClC-3 chloride channel associated with microtubules is a target of paclitaxel in its induced-apoptosis, *Sci. Rep.* 3 (2013) 2615.
- [118] C. Stock, A. Schwab, Role of the Na/H exchanger NHE1 in cell migration, *Acta Physiol.* 187 (1–2) (2006) 149–157.
- [119] K. Morishita, K. Watanabe, H. Ichijo, Cell volume regulation in cancer cell migration driven by osmotic water flow, *Cancer Sci.* 110 (8) (2019) 2337–2347.
- [120] B.T. Beaty, et al., Talin regulates moesin-NHE-1 recruitment to invadopodia and promotes mammary tumor metastasis, *J. Cell Biol.* 205 (5) (2014) 737–751.
- [121] S.L. Balasubramaniam, et al., Knockdown of sodium-calcium exchanger 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition in kidney epithelial cells, *J. Biol. Chem.* 292 (27) (2017) 11388–11399.
- [122] K.V. Ledwitch, A.G. Roberts, Cardiovascular ion channel inhibitor drug-drug interactions with P-glycoprotein, *AAPS J.* 19 (2) (2017) 409–420.
- [123] P. Kumar, et al., Ion channels in neurological disorders, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 103 (2016) 97–136.
- [124] M. Gautier, et al., New insights into pharmacological tools to TR(i)P cancer up, *Br. J. Pharmacol.* 171 (10) (2014) 2582–2592.
- [125] P. Kischel, et al., Ion channels: new actors playing in chemotherapeutic resistance, *Cancers* 11 (3) (2019).
- [126] L. Leanza, Pharmacological targeting of ion channels for cancer therapy: in vivo evidences, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (6 Pt B) (2016) 1385–1397.
- [127] R.A. Stanton, et al., Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective, *Med. Res. Rev.* 31 (3) (2011) 443–481.
- [128] C. Dumontet, M.A. Jordan, Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (10) (2010) 790–803.
- [129] M.A. Jordan, L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nat. Rev. Cancer* 4 (4) (2004) 253–265.
- [130] S.T. Wong, S. Goodin, Overcoming drug resistance in patients with metastatic breast cancer, *Pharmacotherapy* 29 (8) (2009) 954–965.
- [131] P. Friedl, K. Wolf, J. Lammerding, Nuclear mechanics during cell migration, *Curr. Opin. Cell Biol.* 23 (1) (2011) 55–64.
- [132] K.H. Chow, R.E. Factor, K.S. Ullman, The nuclear envelope environment and its cancer connections, *Nat. Rev. Cancer* 12 (3) (2012) 196–209.

# OBJECTIFS DE LA THESE

## OBJECTIFS

Le cancer du sein représente le cancer le plus diagnostiqué et mortel chez la femme dans le monde. Malgré l'existence d'un arsenal thérapeutique efficace, seuls les cancers du sein en phases précoces répondent relativement bien aux traitements disponibles sur le marché du médicament. La mortalité due au cancer du sein demeure élevée à cause notamment des stades tardifs du cancer au cours duquel il devient invasif. Il est connu dans la littérature que la formation de métastases est associée à l'acquisition par les cellules épithéliales de caractéristiques agressives, comme par exemple des propriétés migratoires et invasives, ainsi qu'un remaniement du cytosquelette afin d'assurer le processus métastatique.

Ces différents processus tumoraux sont hautement dépendants du  $Ca^{2+}$ . En effet, l'implication de la signalisation calcique dans les différentes étapes de la cancérogenèse est largement décrite. La signalisation calcique, mais également ionique en générale régule les processus cancéreux à tel point que les cancers pourraient aujourd'hui être caractérisé d'onco-canalopathies (Prevarskaya *et al.* 2018). Plus précisément, le rôle de la signalisation calcique associée aux canaux ORAI, canaux ioniques exprimés au niveau membranaire, est connu depuis près de deux décennies.

Une des voies les plus importantes impliquées dans la régulation de l'entrée de calcium dans la cellule est la voie SOCE (*Store-Operated Calcium Entry*). En effet, les canaux ORAI (connus également sous le terme canaux SOC) sont constitué de trois protéines majoritaires : ORAI1, ORAI2 et ORAI3 (bien que d'autres canaux ioniques puissent être composant de la SOCE) (Feske *et al.* 2006, Vig *et al.* 2006). Les canaux ORAI sont connus pour présenter la particularité d'être activés suite à la déplétion des stocks calciques du réticulum endoplasmique. De ce fait, la SOCE représente la majeure entrée de  $Ca^{2+}$  dans les cellules non excitables.

Lors de notre étude, nous nous sommes intéressés à l'isoforme ORAI3 qui joue de nombreux rôle dans cancérogenèse mammaire. En effet, notre équipe a montré qu'ORAI3 était surexprimé dans près de 80 % tumeurs mammaires humaines, ainsi que dans les lignées cancéreuses mammaires humaines ER<sup>+</sup>, MCF-7 et T47D. Par ailleurs, l'invalidation fonctionnelle d'ORAI3 dans ces lignées diminue fortement aussi bien la SOCE que la prolifération, tout en augmentant le taux de cellules en apoptose (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013). Par ailleurs, le canal ORAI3 a également été proposé par notre équipe comme un outil pronostic dans le cancer du sein. Plus précisément, il a été démontré que la surexpression des canaux ORAI3 conférait aux cellules cancéreuses une capacité de résistance aux agents chimiothérapeutiques (Hasna *et al.*

2018). Enfin, Azimi et ses collaborateurs ont découvert que l'hypoxie augmente les taux transcriptionnels d'ORAI3 dans les lignées cancéreuses de type basal (Azimi *et al.* 2019). Ces deux dernières études concernant l'influence d'ORAI3 dans la cancérogenèse apporte une notion d'agressivité tumorale. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'activité du canal ORAI3 pourrait être un socle dans l'agressivité tumorale mammaire.

En nous basant sur les travaux du laboratoire et sur les données de la littérature, nous avons décidé d'étudier le rôle du canal ORAI3 dans l'agressivité tumorale, et notamment dans la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines. Ainsi, au cours de mon travail de thèse, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs quant au rôle d'ORAI3 dans le cancer du sein :

- Évaluer l'implication du canal ORAI3 dans la migration cellulaire des cellules cancéreuses.
- Caractériser la signature calcique du canal ORAI3 dans les cellules cancéreuses mammaires de type basal.
- Examiner les voies de signalisation sous-jacentes à ORAI3 dans la régulation des processus migratoires.
- Et enfin, étudier l'éventuelle implication du cytosquelette dans la migration cellulaire régie par le canal ORAI3.

# MATERIEL ET METHODES

## Culture cellulaire

### 1. Lignées cellulaires cancéreuses

Les cellules cancéreuses épithéliales mammaires humaines MDA-MB-231 (MDA-231) proviennent de l'ATCC (*American Type Culture Collection*) et ont été isolées au sein d'une effusion pleurale chez une femme de 51 ans atteinte d'un adénocarcinome mammaire métastatique. Les cellules MDA-MB-231 BrM2 (MDA-BrM2), sous-type de MDA-231 présentant la caractéristique de former des métastases uniquement dans le cerveau, nous ont été généreusement fournies par l'équipe du Pr. Joan Massagué. Ces cellules sont adhérentes et sont de type basal (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>). Elles présentent également la capacité d'être hautement métastatiques lors de leur injection dans un modèle de souris immunodéprimée.

Les cellules cancéreuses épithéliales mammaires humaines T47D proviennent également de l'ATCC et ont été isolées à partir d'une effusion pleurale chez une femme de 54 ans atteinte d'un carcinome canalaire infiltrant. De type luminal A, les cellules T47D sont caractérisées ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>.

Afin d'éviter toute dérive cellulaire qui peut avoir lieu lors des cycles décollement / ensemencement, les cellules sont utilisées sur un maximum 15 passages puis une nouvelle ampoule de cellules est décongelée. Par ailleurs, des tests de contamination aux mycoplasmes ont été réalisés une fois par mois.

### 2. Clones cellulaires

Les clones stables sont issus de la lignée cellulaire cancéreuse T47D et résultent de l'insertion, de façon stable dans le temps, du plasmide *pEF1α-IRES-DsRed-Express2*, contenant soit le plasmide vide (EV pour *Empty Vector*), soit le gène codant pour la protéine ORAI3 (O3V pour *Orai3 Vector*). Les cellules O3V présentent une surexpression de canal ORAI3. Les clones stables ont été mis au point par le Dr. Philippe Kischel et le Dr. Jessy Hasna, durant le travail de thèse de cette dernière.

Les lignées cancéreuses mammaires transfectées stablement MDA-231 shCtl et MDA-231 shOrai1 nous ont généreusement été offertes par l'équipe de Pr. Hamid Morjani.



### 3. Entretien des lignées cellulaires

L'ensemble des expériences de culture cellulaire a été réalisé sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de type II (Faster BH-EN-2003-S). Les cellules sontensemencées et cultivées dans des flacons de culture de 25 ou 75cm<sup>2</sup> (Nunc) traités pour favoriser l'adhésion cellulaire, et placées dans un incubateur présentant une atmosphère saturée en humidité, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

Le milieu de culture (**Tableau 2**) utilisé pour l'entretien des lignées cancéreuses mammaires est un milieu EMEM (*Eagle's Minimal Essential Medium*) supplémenté de 5 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF). En ce qui concerne les clones stables T47D et MDA-231, les antibiotiques G418 (Sigma, A1720) et puromycine (Gibco Life Technology) ont été respectivement ajoutés au milieu de culture. Afin d'éviter l'inhibition de contact, les cellules sont décollées par trypsinisation une fois par semaine lorsqu'elles présentent une confluence de 80 %.

<b>Tableau 2 : Composition du milieu de culture</b>	
Eau ultrapure	Sigma
EMEM	Lonza
HEPES 20 mM	Gibco Life Technology
Bicarbonates de sodium 0,22 %	Gibco Life Technology
Acides aminés non essentiels (MEM 100X)	Gibco Life Technology
GlutaMax™ (L-glutamine)	Gibco Life Technology
SVF 5%	Gibco Life Technology

Durant la trypsinisation, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées avec un tampon *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Sigma). 1 mL de trypsine-EDTA (0.05%, Invitrogen) (EDTA pour *Ethylenediaminetetraacetic acid*) est ensuite appliqué sur les cellules pour assurer leur décollement. Cette étape est conduite à 37°C pendant 2. L'effet protéolytique de la trypsine est ensuite contrecarré par ajout de milieu de culture complet (présence d'inhibiteurs de trypsine dans le SVF), et les cellules sont dissociées par une vingtaine de pipetages successifs. Ensuite,

les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez, puis sont réensemencées dans de nouveaux flacons de culture. Le milieu de culture des cellules est renouvelé toutes les 48h.

Enfin, pour éviter une dérive génétique, nous effectuons au plus une quinzaine de passages par ampoule cellulaire.

Certaines expériences ont été réalisées dans un milieu de culture présentant 0,2 mM Ca<sup>2+</sup>. Cette concentration calcique est obtenu par ajout de 1,6 mM d'EGTA (EGTA pour *ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid*).

#### 4. Congélation et décongélation des cellules

A 80% de confluence, les cellules sont décollées par ajout de trypsine. Une quantité de deux millions de cellules est centrifugée à 1500 tours par minute pendant 7 min, le culot cellulaire est ensuite re-suspendu dans 1 mL de milieu de congélation composé à 90% de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les suspensions cellulaires sont placées dans des ampoules, elles-mêmes disposées dans des boîtes de congélation CoolCell™ (Biocision, Dutscher, Thermofisher, France) à -80°C, permettant une congélation lente et progressive des cellules.

Les cellules sont décongelées de façon rapide au bain marie à 37°C. Les cellules sont ensuite reprises dans un tube Eppendorf puis centrifugées à 1500 tours par minute pendant 5 minutes. Le surnageant contenant le DMSO (toxique pour les cellules) est ensuite éliminé, et le culot composé des cellules est ensemencé dans un milieu de culture supplémenté à hauteur de 10% de SVF, dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup> puis placé dans l'incubateur à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont confluentes, les cellules sont détachées du support du flacon de culture par trypsinisation puis réensemencées dans un flacon de 75 cm<sup>2</sup>.

#### Recouvrement des surfaces de culture le collagène de type I

Le collagène de type I utilisé pour toutes les expériences, nous a été généreusement fourni par l'équipe du Prof Hamid Morjani (uUnité MEDyC- UMR CNRS 7369). Le collagène est extrait à partir de tendons de queues de rats « *Sprague-Dawley* » selon le protocole décrit par Garnotel et collaborateurs (Garnotel *et al.* 2000).

Lors de l'étape de recouvrement des supports de culture par le collagène, ce dernier est dilué dans une solution d'acide acétique filtrée à une concentration de 18 mM, puis déposé sur les boîtes ou inserts à hauteur de 2.5µg/cm<sup>2</sup>. Ensuite les boîtes et inserts sont laissés ouverts sous

le PSM allumé permettant ainsi l'évaporation du surnageant pendant une nuit entière. Le lendemain, les boîtes et inserts sont rincés avec du PBS stérile. Les cellules peuvent directement êtreensemencées dans les boîtes et inserts. Ces derniers peuvent également être stockés pendant 15 jours à 4°C pour une utilisation ultérieure.

## Transfection

### 1. Principe

Cette technique permet d'éteindre l'expression d'une protéine cible en détruisant son ARN messager (ARNm) ou *a contrario* d'augmenter l'expression d'une protéine d'intérêt. La transfection s'effectue grâce à l'introduction d'un *small interfering RNA* (siARN) ou d'un plasmide de surexpression dans la cellule. Durant mon travail de thèse, nous avons effectué des transfections transitoires de deux façons :

- Par nucléofection (*Nucleofector 2D*, Amaxa, Lonza)
- Par lipofection par l'intermédiaire d'un réactif de transfection non liposomique (*FuGENE. HD Transfection Reagent*, Promega).

### 2. Extinction moléculaire par siARN

La nucléofection (également nommée électroporation) est une technique qui permet l'entrée du siARN d'intérêt dans les cellules cibles grâce à une impulsion électrique formant des pores très transitoires dans la membrane laissant passer le siARN, et à l'aide d'un tampon de nucléofection spécifique à la lignée cellulaire utilisée (*Nucleofector Kit V*, Amaxa).

Pour ce faire, les cellules sont décollées par trypsinisation, comptées et  $1,5 \cdot 10^6$  cellules est récupérés par condition. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 7min à 1500 tours par minute puis le culot est repris dans 100  $\mu$ L de tampon de transfection auquel nous avons ajouté 6  $\mu$ g de siARN Contrôle (Ctl) ou cible (**Tableau 3**).

<b>Tableau 3 : Séquences des siARN utilisés</b>	
<b>siARN</b>	<b>Séquence</b>
siContrôle (siCtl)	5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3' (Eurogentec)
siOrai3	5'-GGGUCAAGUUUGGCCCAU-3' (Eurogentec)

Le mélange est finalement transféré dans une cuve de transfection puis l'électroporation est effectué *via* le programme adéquat pour chaque lignée cellulaire :

- X-013 pour les lignées MDA- 231 et MDA-BrM2
- X-005 pour la lignée T-47D

Les cellules sont ensuite réensemencées dans un flacon de culture de 25 cm<sup>2</sup> contenant 5 mL de milieu de culture puis mises à incuber (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) pendant 48h. Par la suite, les cellules sont décollées puis réensemencées en vue des expériences à réaliser.

### 3. Surexpression transitoire

Concernant l'utilisation du FuGENE®, dans un premier temps, il faut mélanger séparément le FuGENE® et le vecteur (Ratio 1:3) dans un milieu sans sérum afin d'empêcher notamment un encombrement stérique par les constituants du sérum.

Durant nos expériences, pour une boîte de Pétri de 60 mm de diamètre, les cellules sontensemencées à hauteur d'un million de cellules par boîte. La transfection s'effectue 24h plus tard. 4 µg de vecteur plasmidique (vide (EV) ou surexprimant (O3V)) sont mélangés dans un volume de milieu de culture sans SVF puis 12 µL de FuGENE® sont ajoutés au mélange pour obtenir un volume final de 200 µL. Après 15 min d'incubation à température ambiante, le mélange est, goutte par goutte, mis au contact des cellules, dans les boîtes contenant 2 mL de milieu de culture complet.

24h plus tard, le milieu de culture des cellules est éliminé puis remplacé par 3 mL de milieu complet. A 48h post transfection, les cellules sont décollées puis réensemencées en fonction des expériences à réaliser.

# Migration cellulaire

## 1. Vidéomicroscopie

La vidéomicroscopie permet d'étudier les mécanismes de migration cellulaire de façon unitaire. 48h après transfection, les cellules sontensemencées à hauteur de 100 000 cellules dans un flacon de 12,5cm<sup>2</sup>. Les vidéo-microscopes Axiovert 40C (Zeiss, Allemagne), dotés d'une chambre de culture à 37°C, sont utilisés pour l'acquisition des images.

Les champs présentant une dizaine de cellules sont sélectionnés par le moyen du logiciel MikroCamLabII (Bresser, Allemagne). Les positions cellulaires sont ensuite enregistrées par photographie grâce à une caméra (Bresser, Allemagne) pendant 6h à intervalles réguliers de 5min.

L'analyse par les logiciels ImageJ et Amira (Thermofisher Scientific Corporation, États-Unis d'Amérique) permet d'obtenir l'aire, le périmètre et le centre des cellules. L'analyse par le logiciel Matlab (Mathworks, États-Unis d'Amérique) permet de calculer la vitesse de migration, la distance totale parcourue, la translocation cellulaire ainsi que la trajectoire des cellules.

## 2. Migration par chambre de Boyden

L'étude de la migration cellulaire a également été effectuée par la technique des chambres de Boyden modifiée (BD FALCON™ Cell Culture Inserts, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Ces inserts de culture, caractérisés par la présence de pores de 8 µm de diamètre sur la membrane de polyéthylène téréphtalate constituant le fond, sont placés dans une plaque 24 puits. La membrane au fond de l'insert joue le rôle de filtre par lequel les cellules capables de migration passent.

48h post transfection, les cellules sont décollées par une solution de trypsine et un volume de 200 µL, renfermant 40000 cellules, estensemencé dans la partie supérieure de l'insert. Un volume de 800 µL de milieu de culture est ajouté au fond du puits afin d'éviter tout biais dû au processus de chimiotactisme. Les cellules cancéreuses mammaires sont incubées pendant 24h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après cette période d'incubation au cours de laquelle les cellules ont migré, les inserts sont rincés deux fois avec une solution de PBS, puis les cellules subissent une fixation par une solution de méthanol (Sigma, France) pendant 20 min. Les inserts sont ensuite rincés abondamment avec de l'eau distillée, puis sont colorés par une solution d'hématoxyline

(Sigma, France) pendant 10 min. Les inserts sont à nouveau rincés à l'eau distillée puis séchés. Enfin, le tapis cellulaire de la partie supérieure de l'insert, représentant les cellules n'ayant pas migré, est éliminé à l'aide d'un coton-tige. Les inserts sont enfin placés sur un microscope inversé (X400, Nikon eclipse TS100, Champigny sur Marne, France) puis le nombre de cellule par champs (25 champs) est ensuite comptabilisé et normalisé par rapport à la condition contrôle. En parallèle, un test de viabilité cellulaire est réalisé.

## Viabilité et prolifération cellulaire

L'étude de la viabilité cellulaire se mesure en parallèle de l'étude de la migration cellulaire, par un test colorimétrique au MTT (pour (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ; Sigma, France). Les sels de tétrazolium du MTT sont réduits en cristaux de formazan, de couleur violette, par la succinate déshydrogénase mitochondriale. La coloration est mesurée par une lecture d'absorbance représentant le nombre de cellules vivantes. Les cellules sontensemencées en plaque de 12 puits, à hauteur de 80000 cellules par puits. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> correspondant à la période de migration cellulaire, le milieu de culture est remplacé par une solution de MTT diluée dans du milieu de culture à une concentration de 0,5 mg/mL pendant 60 min dans des conditions de culture cellulaire normales. Les cristaux de formazan formés sont ensuite dissous par ajout de DMSO. A la suite d'une agitation de quelques minutes, la solution est transférée dans une plaque 96 puits (200 µL par puits). L'absorbance est enfin mesurée par un lecteur de microplaques Infinite F200 pro TECAN (TECAN, Lyon, France) à 550 nm.

## Adhésion cellulaire

### 1. Protocole au MTT

Les cellules cultivées sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 60 mm et sont décollées par 0,5 mL de tampon Versène (**Tableau 4**) pendant 15 min, permettant de conserver les structures d'adhésion cellulaire. Les cellules sont récupérées dans un volume final de 3 mL de milieu de culture. Les cellules décollées sont ensuite réparties à hauteur de 80000 cellules par puits puis incubées (pendant 15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h ou 12h) à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

<b>Tableau 4 : Composition du tampon Versène</b>	
NaCl	126 mM
KCl	5 mM
EDTA	1 mM
HEPES	50 mM

Suite à l'incubation des cellules, les puits sont rincés délicatement par une solution de PBS, puis le milieu de culture est remplacé par une solution de MTT (de la même façon que lors des manipulations de viabilité et prolifération cellulaires). Après 1h d'incubation, un volume de 200  $\mu$ L d'une solution de DMSO est ajouté afin de permettre la dissolution des cristaux de formazan formés. L'absorbance, représentant la densité de cellules adhérentes, est finalement mesurée par le lecteur de microplaques TECAN à 550 nm.

## 2. Microscopie à force atomique - *Single Cell Force Spectroscopy*

### a. Principe

L'adhésion cellulaire est un processus fondamental mais complexe observé chez un grand nombre d'organismes. L'étude de ces processus d'adhésion amène plusieurs difficultés étant donné l'hétérogénéité de molécules d'adhésion à la surface cellulaire et leur contribution au processus d'adhésion impliquant des interactions spécifiques ou non. Durant l'étude de l'adhésion cellulaire, l'application d'une force suffisante pour rompre les liens cellule – substrat ne fournit aucune information quant à la composition protéique du système cellulaire d'adhésion. Malgré ce manque d'informations capitales dans l'étude de l'adhésion des cellules, un certain nombre d'approches ont été développées.

La spectroscopie de force, par le biais d'un microscope à force atomique, permet de mesurer d'un façon unitaire les détachements cellulaires par l'intermédiaire d'une structure, le cantilever, auquel la cellule est accrochée. Ainsi, il est possible d'étudier l'adhésion des cellules à une surface, à une cellule unitaire ou encore à une couche cellulaire à confluence.

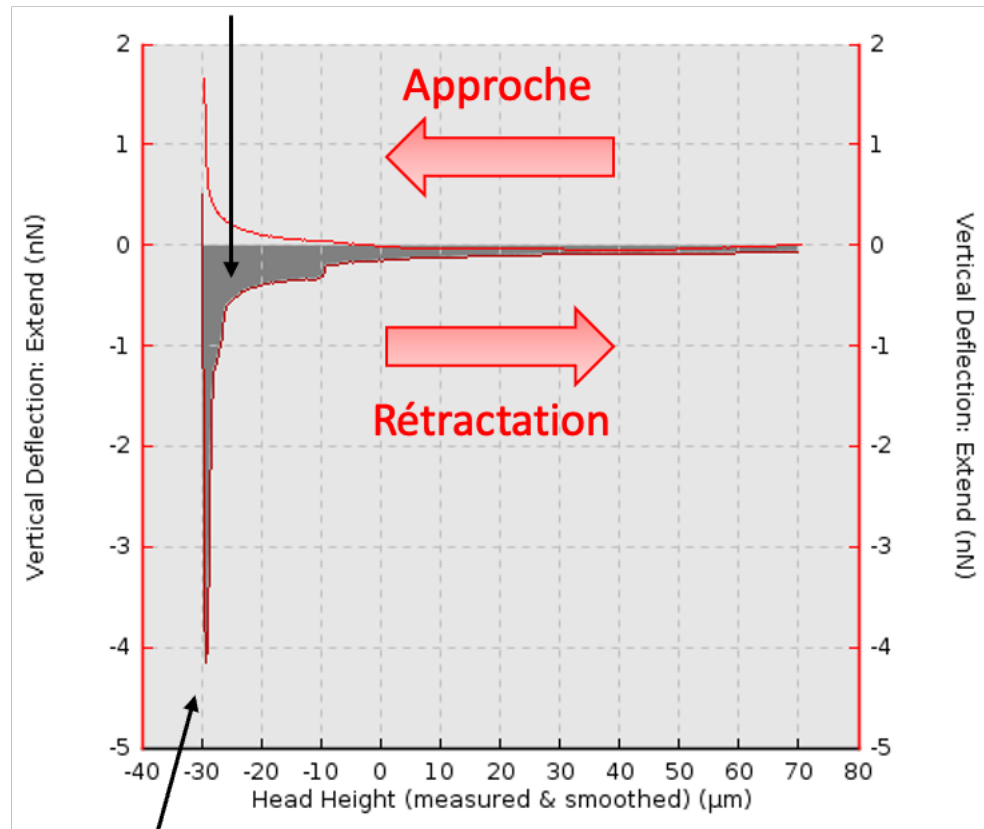
## b. Acquisition et analyse

Lors de mon travail de thèse, la résistance mécanique absolue de l'adhésion d'une cellule à un substrat a été mesurée à l'aide d'un microscope à force atomique Axiovert 200 (Zeiss) et du module CellHesion® (JPK, Berlin, Allemagne) et du logiciel JPKSPM Data Processing (JPK version 4.2.50). Ce microscope offre une plage z élargie ( $> 100 \mu\text{m}$ ) de sorte que le cantilever puisse être suffisamment soulevé pour séparer la cellule du substrat. Avant chaque expérience, une calibration consistant en la mesure de la constante de ressort du cantilever et de la sensibilité de la déflexion du laser est effectuée afin de soustraire les biais dus à ces paramètres lors de l'acquisition. Par ailleurs, pour chacune des mesures de l'adhésion au niveau atomique, le cantilever est enduit de  $8 \mu\text{L}$  d'agglutinine de germe de blé (Sigma) pendant 10 min.

Le cantilever est ensuite placé sur le module CellHesion®, puis positionné au-dessus d'une cellule placée dans une matrice de gélatine. Le cantilever est ensuite descendu à une vitesse de  $5 \mu\text{m}$  par seconde jusqu'à toucher la cellule pendant 5 sec, pour une force équivalente à 1 nN (N pour Newton). Ces paramètres de vitesse et de force sont nécessaires pour fixer la cellule sur la partie avant du cantilever avec l'aide de l'agglutinine. La cellule fixée au cantilever est ensuite positionnée au-dessus d'un tapis de collagène de type I puis abaissée à une vitesse de  $5 \mu\text{m/s}$  pendant l'approche et une constante de force de 1,5 nN. Après un temps de contact de 2 sec ou 10 sec en fonction des expériences, la cellule est séparée du tapis de collagène en soulevant le cantilever selon les mêmes paramètres de vitesse et de force que lors de l'approche. La force nécessaire pour séparer complètement les cellules est mesurée, le maximum de force étant représenté par la valeur minimale de la courbe de rétraction (**Figure 33**). La zone sous la courbe représente l'énergie nécessaire pour séparer les cellules (**Figure 33**).



Aire sous la courbe = Energie



Pic de la courbe = Force maximale  
d'adhésion

**Figure 33 :** Représentation légendée d'un courbe d'adhésion atomique obtenue lors de la mesure.

## Morphologie cellulaire

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre. Soixante-douze heures post transfection, les cellules sont placées sur un microscope optique inversé (X400, Nikon Eclipse TS100, Champigny sur Marne, France) permettant la prise des photographies. Le caractère morphologique est quantifié par le calcul de l'index de circularité :

$$IC = (4\pi \times \text{Aire}) / \text{Périmètre}$$

Ce calcul est réalisé à l'aide du logiciel Image J permettant d'obtenir l'aire et le périmètre des cellules photographiées. D'un point de vue morphologique, lorsque l'IC tend vers 1, la morphologie cellulaire est arrondie. *A contrario*, lorsqu'il tend vers 0, la cellule présente une morphologie en fuseau.

## Immunofluorescence

Durant les expériences d'immunofluorescence (IF), les cellules transfectées sontensemencées à hauteur de 15 000 cellules par puits dans une chambre de culture Lab-tek (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System, Thermofisher, France). 24h plus tard, elles sont fixées par une solution de paraformaldéhyde (PFA) dilué à 4 % dans du PBS pendant 30 min. Les cellules sont ensuite rincées, lavées par une solution de PBS puis perméabilisées par une solution de Triton X-100 dilué à 0,5 % dans du PBS pendant 10 min. Trois lavages successifs de 1 min au PBS sont effectuées puis l'étape de saturation, permettant le blocage des sites de fixation non spécifiques, est réalisée grâce à une solution de *Bovine Serum Albumin* (BSA) dilué à 5 % dans du PBS filtré, pendant 1h à température ambiante.

Puis l'anticorps primaire dilué dans une solution de PBS / BSA 1 % est incubé toute la nuit en chambre humide à 4°C (**Tableau 5**). La lame est ensuite rincée par du PBS, et l'anticorps secondaire, couplé à un fluorophore (**Tableau 5**), diluée également dans une solution de PBS / BSA 1% est incubé, dans une chambre humide pendant 45 min à température ambiante et à l'obscurité. Après trois rincages de 1 min au PBS, la lame est incubée dans une solution de DAPI pendant quelques secondes. La chambre de culture est finalement enlevée puis la lame contenant les cellules est séchée grossièrement. Enfin, une lamelle de verre est appliquée sur la plaque après application du milieu de montage *ProLong® Gold Antifade Mountant* (Thermofisher, France). Ce dernier présente la particularité de polymériser à température ambiante et à l'obscurité en quelques heures, permettant ensuite l'observation des marquages au Zeiss Observer.Z1 (Carl Zeiss, Marly-le-Roi, France). L'analyse est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

Le marquage des filaments d'actine se réalise, pendant 30 minutes à l'obscurité, avant le marquage au DAPI grâce à une solution de rhodamine phalloïdine (Sigma, France), diluée au 1/1000 dans une solution de PBS / BSA 1%.

<b>Tableau 5 : Liste des anticorps primaires et secondaires (couplés à un fluorophore) utilisés en IF et leur dilution</b>		
Paxilline	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling
Alexa Fluor 488 anti-lapin	1/1000 <sup>ème</sup>	Invitrogen

## Expression transcriptionnelle et traductionnelle

### 1. Expression transcriptionnelle : qRT-PCR

#### a. Extraction des ARN

L'extraction des ARN totaux a été effectuée selon la méthode d'extraction au Trizol (TRI Reagent®, Sigma). Après l'extraction, les ARN sont dosés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermofischer). Durant le dosage, nous avons éliminés tous les échantillons présentant des rapports  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{260}/A_{230}$  inférieurs à 1,8, car considérés comme impurs.

Durant l'extraction des ARN, l'ensemble des surfaces et le matériel technique sont nettoyés par une solution de RNA Away (Molecular Bioproducts) afin d'éviter toute contamination par des RNases. Par ailleurs, toutes les étapes de l'extraction sont réalisées sous une hotte d'extraction chimique dans le but de nous protéger des émanations toxiques.

#### b. Rétro-transcription (RT)

Les ARN totaux extraits subissent un rétro-transcription (RT) en ADN complémentaire (ADNc) en suivant les instructions du kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems).

Après le dosage des ARN suite à l'extraction, un volume, correspondant à 2 µg d'ARN, est complété avec de l'eau ultra pure pour un volume final de 13,2 µL. A ce mélange sont ajoutés 6,8 µl du mélange réactionnel nécessaire à la RT (**Tableau 6**). Les tubes thermorésistants, contenant le mélange ARN/mélange réactionnel sont placés dans thermocycler pour effectuer la RT, constituée de trois étapes :

- Une étape de fixation des amorces pendant 10 min à 25°C.
- L'étape de RT pendant 2h à 37°C.
- Une étape d'arrêt de la réaction pendant 5min à 85°C (désactivation de l'enzyme).

A la suite de cette étape, la température est maintenue à 4°C dans l'attente du stockage des ADNc à -20°C.

Tampon de RT	2 µL
Amorces	2 µL
Désoxyribonucléotides (dNTP)	0,8 µL
Inhibiteur de RNase	1 µL
Polymérase (MultiScribe™)	1 µL

c. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La PCR quantitative (qPCR) permet l'amplification et la quantification d'une séquence d'ADN spécifique. La totalité de nos expériences de qPCR a été réalisée au Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire d'Amiens (CRRBM).

Nous avons réalisé la qPCR dans une plaque de 384 puits à l'aide d'un thermocycler et du logiciel Light Cycler® 480 (Roche Molecular System, Inc.).

L'échantillon de ADNc obtenu durant la RT est dilué au 1/20<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure, puis 2 µL de cet ADNc dilué est ajouté dans le mélange réactionnel contenant les amorces, l'eau et un mélange composé de SYBR Green (Roche, France) (**Tableau 7**). Le SYBR Green est un agent intercalant de l'ADN dont la fluorescence émise est proportionnelle au nombre d'amplicons formés durant la PCR. La mesure de la fluorescence s'effectue à la fin de la phase d'élongation de chaque cycle.

Eau ultrapure	1,6 µL
Amorce sens (10 µM)	0,5 µL
Amorce anti sens (10 µM)	0,5 µL
SYBR Green	4,6 µL

La plaque, contenant les ADNc à amplifier, est centrifugée quelques secondes puis placée dans le thermocycler pour 45 cycles d'amplification. Chaque cycle est composé de trois étapes :

- Une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 s.
- Une étape d'hybridation à 60°C pendant 10 s.
- Une étape d'élongation à 72°C pendant 15 s.

Pour quantifier l'expression transcriptionnelle de nos gènes d'intérêt, nous avons déterminé le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence liée à l'amplification est détectable. Ce signal seuil, dénommé cycle seuil ou *Cycle Threshold* (Ct) est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc initialement présent dans l'échantillon amplifié. La quantification de l'expression transcriptionnelle de nos acteurs d'intérêt a été normalisée par rapport à l'expression transcriptionnelle de la Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta C_{\text{cible}}(\text{contrôle} - \text{échantillon})}}{(E_{\text{référence}})^{\Delta C_{\text{référence}}(\text{contrôle} - \text{échantillon})}}$$

## 2. Expression protéique : Western Blot

### a. Extraction des protéines

Après deux lavages au PBS, les boîtes de Pétri sont placées sur la glace et les protéines totales sont extraites grâce au tampon d'extraction protéique RIPA (**Tableau 8**) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Sigma), d'orthovanadate de sodium (0,5 mM) et d'EDTA (5 mM). Pour chaque boîte de cellules, un volume allant de 60 à 130 µL de RIPA complet est ajouté sur les cellules puis incubé sur glace pendant 30 min. Les surfaces de culture cellulaire sont ensuite

grattées puis le lysat protéique est repris et transféré dans un tube Eppendorf. Ensuite, le lysat protéique est centrifugé pendant 15 min, à 14 000 tours par minutes à 4°C.

Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf. Les protéines sont finalement dosées par la méthode colorimétrique de Bradford (DC protein assay, Biorad) et à l'aide d'une gamme étalon à base de BSA. Le dosage est réalisé par la mesure de la densité optique à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques (Tecan®) et du logiciel Tecan I-Control.

Enfin, les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

<b>Tableau 8 : Composition du tampon RIPA</b>	
Triton 100X	1 %
Chlorure de sodium	150 mM
Désoxycholate de sodium	1 %
PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> /K pH 7,2	20 mM

#### b. Western Blot

Lors du Western Blot, une quantité équivalente de protéines pour chacune des conditions est complétée avec du tampon Laemmli 5X (**Tableau 9**) et Laemmli 1X pour un volume final identique. Les échantillons protéiques sont ensuite dénaturés à 95°C pendant 10 min.

<b>Tableau 9 : Composition du tampon Laemmli 5X</b>	
TRIZMA-base	62,5 mM
Glycérol	10 %
SDS 10 % (Sodium Dodécyl Sulfate)	2,3 %
β-Mercaptoéthanol	5 %
Bleu de bromophénol	

Les protéines sont ensuite chargées dans un gel d'acrylamide puis soumises à une électrophorèse monodimensionnelle réalisée dans un système Bio-Rad selon la technique *Sodium Dodecyl Sulphate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). L'électrophorèse est permise par l'emploi d'un tampon de migration (**Tableau 10**) et effectuée durant 1h à 200 volts (V). Le suivi de la migration des protéines à travers le gel se fait par l'intermédiaire d'un marqueur de poids moléculaire coloré (Biorad).

A la suite de la migration des protéines dans le gel, ce dernier est placé dans un montage de transfert dans lequel les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'étape de transfert est effectuée grâce à un tampon de transfert (**Tableau 10**) pendant 90 min à 60 V.

La membrane de nitrocellulose est ensuite incubée pendant 2h sous agitation à température ambiante, dans une solution de *Tris Buffered Saline* (TBS) contenant 0.1% de Tween-20 (TBS-T) et 5% de lait afin de saturer les sites de fixation protéiques non spécifiques.

<b>Tableau 10 : Composition des tampons de migration et transfert utilisés en Western Blot</b>			
<b>Tampon de migration</b>		<b>Tampon de transfert</b>	
Tris Glycine	10 %	Tris Glycine	10 %
SDS 10 %	1 %	Méthanol	20 %
Eau ultra pure	QSP 1 L	Eau ultra pure	QSP 1 L

La membrane est ensuite incubée dans une solution d'anticorps primaire (diluée dans du TBS-T 5 % BSA) pendant la nuit à 4°C sous agitation douce. Après 3 lavages au TBS-T de 5 minutes chacun, la membrane est incubée pendant 1h dans une solution d'anticorps secondaire (diluée dans du TBS-T 5 % BSA), correspondant à l'anticorps primaire, à température ambiante et sous agitation (**Tableau 11**).

A la suite de trois derniers lavages au TBS-T (5 min chacun), les protéines reconnues par les anticorps sont révélées par chimioluminescence grâce au réactif ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*, Biorad). Le signal lumineux émis est capté par l'appareil ChemiDoc XRS

(Biorad) et intégré grâce au logiciel Quantity One® (Biorad). L'intensité des signaux est mesurée par densimétrie. L'analyse des photos et la quantification des bandes protéiques sont effectuées à l'aide du logiciel logiciel Quantity One®. L'expression de l'ensemble de nos protéines d'intérêt a été normalisée par rapport à l'expression protéique de la GAPDH.

<b>Tableau 11 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot et leur dilution</b>		
ORAI3	1/1000 <sup>ème</sup>	Abcam
ORAI1	1/500 <sup>ème</sup>	Sigma
STIM1	1/500 <sup>ème</sup>	Cell signalling
STIM2	1/500 <sup>ème</sup>	Abcam
FAK	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling
Phospho-FAK <sup>Y397</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling
Paxilline	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling
Phospho-Paxilline <sup>Y118</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling
GAPDH	1/5000 <sup>ème</sup>	Abcam
Anti-lapin IgG	1/5000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling
Anti-souris IgG	1/5000 <sup>ème</sup>	Cell Signalling

## Proximity Ligation assay

La technique de *Proximity Ligation Assay* (PLA) est une technique couplant les techniques d'IF et de PCR. La PLA permet d'établir la proximité entre deux protéines (< 40 nm). Couplée à la Co-IP, la PLA permet d'établir si l'interaction protéique est directe ou indirecte. Durant mon travail de thèse, nous avons étudié l'interaction entre le canal ORAI3 et la kinase FAK (**Tableau 12**). La PLA présente la particularité d'utiliser des anticorps secondaires couplés à une amorce nucléotidique. Ainsi, si les deux protéines d'intérêt sont proches, l'ajout d'une polymérase permet l'élongation des amorces en une molécule d'ADN circulaire. La détection de la



fluorescence est permise grâce aux oligonucléotides fluorescents composant le brin d'ADN formé.

<b>Tableau 12 : Liste des anticorps primaires en PLA et leur dilution</b>		
ORAI3	1/250 <sup>ème</sup>	Origene
FAK	1/750 <sup>ème</sup>	Cell Signalling

Durant les expériences de PLA, les cellules sontensemencées de la même façon que durant l'IF. Par ailleurs, les étapes de fixation des cellules, de perméabilisation et de blocage des sites non spécifiques sont identiques à celles effectuées durant l'IF. Lors de l'ajout de l'anticorps primaire, les cellules sont incubées en chambre humide à 37°C pendant 1h. Après deux lavages au tampon A (pendant 5 min), les deux anticorps secondaires (ciblant les deux protéines d'intérêt) sont incubés en chambre humide à 37°C pendant 30 min. Suite à 2 nouveaux rinçages (tampon A pendant 5 min), 1 µL de ligase diluée dans 39 µL de tampon de ligation sont ajoutés dans chaque puits, puis incubés en chambre humide à 37°C pendant 30 min. Suite aux deux rinçages au tampon A, l'étape finale consiste en une amplification des amorces d'ADN portées par les anticorps secondaires. Durant cette étape, 1 µL de polymérase et diluée dans 39 µL de tampon d'amplification (lui-même dilué au 1/5<sup>ème</sup> dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés dans chaque puits et incubés en chambre humide à 37°C pendant 100 min.

Une succession de lavages au tampon B permettant d'éliminer les excédents de réactifs. Les lames, après ajout du milieu de montage contenant du DAPI, sont ensuite recouvertes d'une lamelle puis stockées à -20°C jusqu'à la révélation grâce au microscope à fluorescence utilisé durant les expériences d'IF.

## Imagerie calcique

### 1. Principe

La technique d'imagerie calcique permet de mesurer, en temps réel, les variations de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire, en utilisant un fluorophore (également appelé sonde). Dans ce travail, nous avons utilisé la sonde Fura2-AM (le groupement AM, pour acétoxyméthyl ester, confère à la

sonde de traverser la membrane plasmique). Lors de l'entrée de la sonde dans la cellule (étape de charge), le groupement AM est clivé par des estérases, la stabilisant ainsi sous une forme non perméante.

Par ailleurs, le Fura-2 a la caractéristique d'être ratiométrique. Il possède deux longueurs d'onde d'excitation (340 et 380nm) et une longueur d'onde d'émission (510nm). La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à la sonde entraîne une variation de la fluorescence. Ainsi, la fluorescence mesurée à 340nm augmente et celle à 380nm diminue. A l'inverse, lors d'une perte d'affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , la fluorescence à 340 nm diminue et augmente à 380 nm. Le rapport des intensités émises à 510nm, après l'excitation aux deux longueurs d'onde mentionnées précédemment, permet d'estimer les fluctuations de la concentration calcique intracellulaire.

Lors des expérimentations d'imagerie calcique, les cellules (transfectées 48h auparavant) sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 35mm, contenant une lamelle de verre préalablement stérilisées à l'aide d'un autoclave. L'emploi de la lamelle de verre permet d'éviter de contaminer le signal dû au polypropylène des boites de Pétri. 24h plus tard, le Fura-2AM, à une concentration de 3,33  $\mu\text{M}$ , à 37°C et à l'obscurité pendant 30 min. Les lamelles de verre, dont l'excès de Fura2-AM a été éliminés par rinçages successifs, sont ensuite récupérées et accolées sur des boîtes de pétri à fond percé, grâce à de la graisse siliconée.

Les cellules sont exposées aux différentes longueurs d'onde d'excitation grâce à un monochromateur (Polychrome V, Till Photonics). Une caméra CCD capte les variations de fluorescence de la sonde Fura2 et un logiciel d'acquisition Metafluor qui transforme le signal lumineux en un signal numérique. Le logiciel quantifie, ensuite, les variations de la fluorescence d'émission du Fura2 pour chacune des longueurs d'onde d'excitation. Les données sont finalement analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism Software.

Tout au long de l'expérience, un système de perfusion/aspiration permet le contrôle de la composition ionique du milieu extracellulaire. Par ailleurs, durant les différents protocoles d'imagerie calcique, le milieu extracellulaire est composée tel que décrit dans le **Tableau 13**.

<b>Tableau 13 : Composition du milieu extracellulaire utilisé en imagerie calcique</b>	
Chlorure de sodium	145 mM
Chlorure de Potassium	5 mM

HEPES	10 mM
D-Glucose	5 mM
Chlorure de Magnésium	2 mM

## 2. Protocole au Quench Manganèse

La technique du *Quench Manganèse* est basée sur un principe d'extinction de la fluorescence. En effet, le manganèse ( $Mn^{2+}$ ) est capable de se lier au Fura2, provoquant ainsi une extinction irréversible de la fluorescence suite à un changement conformationnel de la sonde. Étant donné que le  $Mn^{2+}$  transite dans la cellule par les mêmes voies que le  $Ca^{2+}$ , cette technique permet de mesurer indirectement les mouvements calciques intracellulaire.

Le  $Mn^{2+}$ , lors de sa présence dans la cellule, entre en compétition avec le  $Ca^{2+}$  pour se lier au Fura-2. Durant ce processus, à concentration égale en  $Ca^{2+}$  et en  $Mn^{2+}$ , ce dernier se lie à plus de 99% au Fura-2, par rapport au  $Ca^{2+}$ , ce qui entraîne l'extinction de la fluorescence. Ainsi, plus la cinétique d'extinction de fluorescence est grande, plus l'influx de  $Mn^{2+}$  est important, suggérant ainsi, par extrapolation, une entrée calcique plus importante. De plus, lors du protocole au Quench Manganèse, la sonde fluorescente est excitée à 360 nm, correspondant au point isobestique du Fura2. L'excitation à cette longueur d'onde d'excitation est importante étant donné que la fluorescence de la sonde est indépendante de la concentration calcique intracellulaire.

Lors de l'expérience, les cellules sont perfusées avec un milieu extracellulaire normal contenant 2 mM de  $Ca^{2+}$  et excitées à 360 nm. Après 2 min, le milieu extracellulaire est remplacé par un milieu contenant 2 mM de  $Mn^{2+}$  pendant 3 min. Le remplacement du  $Ca^{2+}$  extracellulaire par du  $Mn^{2+}$  entraîne l'extinction de la sonde.

En ce qui concerne l'analyse des données, deux coefficients directeurs sont mesurés :

- Le coefficient directeur de la pente basale correspondant à l'extinction naturelle de la sonde.
- Le coefficient directeur de la pente d'extinction de fluorescence induite par la perfusion du  $Mn^{2+}$ .

La soustraction des deux coefficients directeur permet de calculer et d'évaluer l'entrée cationique.

### 3. Protocole d'entrée basale de calcium

Lors de l'étude de l'entrée calcique basale, les cellules sont perfusées avec un milieu extracellulaire contenant une concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  physiologique (2 mM) pendant 2 min. Ensuite, ce milieu est remplacé par un milieu extracellulaire sans  $\text{Ca}^{2+}$  (0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) supplémenté de 800  $\mu\text{M}$  d'EGTA (permettant de chélater le  $\text{Ca}^{2+}$  résiduel) pendant 10 min. Enfin, le milieu extracellulaire normal à 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  est re-perfusé pendant 10 min. La variation du ratio de fluorescence nous indique l'entrée basale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules.

### 4. Protocole d'étude de la concentration calcique intracellulaire

Afin d'étudier les différences de concentration calcique intracellulaire dans nos différentes conditions, les cellules sont perfusées pendant 2 min avec le milieu extracellulaire supplémentée de 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$ . La moyenne du ratio de fluorescence pour chaque cellule est calculée puis la moyenne de toutes les cellules analysées est établi nous permettant ainsi d'évaluer la concentration calcique intracellulaire.

### 5. Protocole SOC

Lors de l'étude de l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  (entrée de type SOCE), les cellules sont perfusées avec un milieu extracellulaire contenant une concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  physiologique (2 mM) pendant 2 min. Ensuite, ce milieu est remplacé par un milieu extracellulaire sans  $\text{Ca}^{2+}$  (0 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ) supplémenté de 800  $\mu\text{M}$  d'EGTA (permettant de chélater le  $\text{Ca}^{2+}$  résiduel) pendant 2 min puis de la même solution supplémentée de thapsigargine (permet la déplétion irréversible des stocks calciques) à hauteur de 1  $\mu\text{M}$  pendant 11 minutes. Ensuite, le milieu extracellulaire normal à 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  est re-perfusé pendant 7 min (augmentation du ratio de fluorescence correspondant à la SOCE). Finalement, la solution 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (supplémentée d'EGTA) est perfusée.

## Analyses statistiques

Chaque expérience scientifique réalisée durant mon travail de thèse a été effectuée au minimum trois fois sur trois passages cellulaires. Les résultats sont exprimés par la moyenne des données

obtenues. L'erreur standard à la moyenne (SEM pour *Standard Error of the Mean*) représente la variance.

Les logiciels GraphPad Prism Software et SigmaStats 3.0 nous ont permis d'établir les statistiques sur nos données.

Lors de la comparaison des moyennes de deux groupes, les tests t et de Kolmogorov-Smirnoff ont été utilisés lorsque la distribution de l'échantillon suit une loi normale. Dans le cas contraire, le test non paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé.

Lors de la comparaison de plus de deux moyennes, le test d'analyse de variance à un ou deux paramètres est utilisé (ANOVA pour *Analysis Of Variance*), en fonction des expériences réalisées.

Le seuil de significativité est fixé à  $p < 0,05$ . Les indications \*, \*\*, \*\*\* font référence à  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  respectivement.

# RESULTATS

## PARTIE 1 : ORAI3 REGULE LA MIGRATION DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES BASALES ER- VIA DES MECANISMES DEPENDANT ET INDEPENDANT DU CALCIUM.

### Résumé

Les cancers constituent un problème majeur de santé publique du fait de leur incidence et plus particulièrement de leur mortalité. Parmi tous les cancers, le cancer du sein est l'un des cancers les plus diagnostiqués et les plus mortels au monde (Global Burden of Disease Cancer *et al.* 2019). Malgré l'arsenal thérapeutique disponible sur le marché du médicament, le développement des métastases est responsable du décès de plus de 90 % des patients (Gupta et Massague 2006, Chaffer et Weinberg 2011, Peart 2017). La formation de métastases est un processus complexe impliquant l'échappement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire pour se propager aux tissus environnants et envahir les organes à distance. Au cours de ce processus, les cellules doivent pénétrer à travers leur tissu d'origine par migration et invasion cellulaire, envahir la barrière endothéliale et survivre dans la circulation sanguine et/ou lymphatique, s'échapper de la circulation et enfin proliférer pour former une tumeur secondaire au sein d'un organe distant (Seyfried et Huysentruyt 2013). Afin de prévenir la formation de métastases, une grande compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de métastases est nécessaire.

L'une des étapes clés au cours de la formation des métastases est la migration et l'invasion cellulaires (Horwitz et Webb 2003, Yamaguchi *et al.* 2005). Ces deux processus cellulaires sont responsables de l'échappement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire. Lors de la migration des cellules, un remodelage de l'architecture du cytosquelette est observé ainsi que des cycles d'adhésion et de détachement des cellules du substrat. Au front cellulaire, les complexes d'adhésion focaux ancrent la cellule au substrat par des mécanismes impliquant l'actine et le recyclage des protéines composant ces points focaux (Ciobanasu *et al.* 2012). En revanche, la protéolyse, par les calpaïnes, des protéines constituant les complexes d'adhésion focaux, permet à la cellule de se contracter et d'avancer (Lebart et Benyamin 2006). Ces dernières années, de nombreuses études ont mis au jour un dérèglement de l'expression et de l'activité des protéines impliquées dans le renouvellement des adhérences focales (Yamaguchi et Condeelis 2007, Leloup et Wells 2011).

Parmi l'ensemble des acteurs impliqués dans la migration cellulaire, le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle essentiel (Deliot et Constantin 2015). Depuis de nombreuses années, de nombreuses études ont rapporté le rôle de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses, notamment dans le cancer du sein (Tsai *et al.* 2015, Pratt *et al.* 2020, Hammad et Machaca 2021). Plus spécifiquement, les canaux ioniques nommés ORAI ont été mis en évidence comme étant parmi les acteurs majeurs de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules non excitables (Feske *et al.* 2006, Trebak et Putney 2017, Hou *et al.* 2018, Liu *et al.* 2019). Parmi les 3 isoformes des canaux ORAI, il a déjà été établi que le canal ORAI1 est impliqué dans la migration des cellules cancéreuses mammaires humaines (Yang *et al.* 2009). De plus, notre équipe a récemment démontré l'implication d'ORAI3 dans le cancer du sein notamment dans la prolifération et la survie cellulaires ainsi que dans la réponse aux traitements de chimiothérapie (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013, Hasna *et al.* 2018). Par ailleurs, en 2013, Motiani et ses collaborateurs ont rapporté qu'ORAI3 régule l'invasion des cellules cancéreuses mammaires ER<sup>+</sup> (Motiani *et al.* 2013). ORAI3 a aussi été associé à l'agressivité de certains cancers, tels que le cancer pulmonaire dans lequel il a été démontré qu'il constitue un marqueur de mauvais pronostic (Benzerdjeb *et al.* 2016). Dans le cas du cancer du côlon, ORAI3 a été proposé comme marqueur pronostic car sa surexpression est corrélée à une diminution de la survie globale (Ibrahim *et al.* 2019). Les cellules cancéreuses mammaires basales ER<sup>-</sup> sont très agressives et possèdent un pouvoir migratoire et invasif élevé. Cependant, hormis l'étude d'Azimi et ses collaborateurs qui ont démontré qu'ORAI3 pouvait se présenter comme un senseur de l'hypoxie dans la lignée MDA-MB-468 (Azimi *et al.* 2019), aucune étude n'a apporté de résultats significatifs sur l'implication d'ORAI3 dans les cellules cancéreuses mammaires ER<sup>-</sup> malgré son expression dans ce type de cellules cancéreuses.

Durant notre étude, nous avons étudié, plus précisément, le rôle d'ORAI3 dans l'adhésion et la migration dans deux lignées cellulaires cancéreuses basales ER<sup>-</sup> : MDA-231 et MDA-BrM2 qui respectivement envahissent préférentiellement l'os (Boyce *et al.* 1999) et le cerveau (Bos *et al.* 2009).

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels ORAI3 régule la migration, nous avons inhibé l'expression d'ORAI3 par siARN. L'efficacité de la transfection de siORAI3 a été réalisée par qRT-PCR et Western blot. Ensuite, nous avons évalué la migration cellulaire sur les 2 lignées cellulaires (MDA-231 et MDA-BrM2) en utilisant la vidéomicroscopie par l'étude de deux paramètres de migration : la vitesse de migration cellulaire et la translocation des cellules migrantes représentant la distance absolue de migration. Nous avons ainsi montré que la



translocation des cellules MDA-231 et MDA-BrM2 et leur vitesse de migration sont réduites significativement dans la condition siORAI3 par rapport à la condition siCtl. Des résultats similaires ont été obtenus la migration cellulaire en utilisant un modèle de chambre de Boyden dans nos modèles cellulaires. Par ailleurs, la surexpression transitoire d'ORAI3 augmente la migration cellulaire dans nos deux modèles cellulaires.

De plus, nous avons cherché à déterminer la signature calcique propre à ORAI3 dans ces deux lignées basales ER<sup>-</sup>. Nous avons, grâce au protocole d'entrée basale du Ca<sup>2+</sup>, montré que ORAI3 est activé de façon basale et régule la concentration calcique intracellulaire. De la même façon, la surexpression d'ORAI3 augmente l'entrée basale de Ca<sup>2+</sup> dans les lignées MDA-231 et MDA-BrM2. Il est également intéressant de noter qu'ORAI3 ne participe pas à la SOCE dans ces deux lignées de cellules cancéreuses mammaires basales.

Compte tenu de la capacité d'ORAI3 à réguler l'entrée basale du Ca<sup>2+</sup> et afin de comprendre si le Ca<sup>2+</sup> est impliqué dans la migration cellulaire, nous avons cultivé des cellules dans un milieu normal (1,8 mM Ca<sup>2+</sup>) et dans un milieu pauvre en Ca<sup>2+</sup> (0,2 mM Ca<sup>2+</sup>). Au sein de nos deux lignées cellulaires cancéreuses, la réduction de la concentration de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire diminue la migration des cellules siCtl. siORAI3 a réduit la migration dans les conditions de culture normales, mais n'affecte plus la migration dans un milieu pauvre en Ca<sup>2+</sup>. Ce résultat suggère que ORAI3 régule, de façon dépendante du Ca<sup>2+</sup>, la migration des cellules MDA-231 et MDA-BrM2. Afin de confirmer nos résultats, nous avons activé l'entrée de Ca<sup>2+</sup> médiée par ORAI3 grâce à l'utilisation de 2-APB à une concentration de 50 µM. Compte tenu de l'implication d'ORAI1 dans la migration cellulaire (Yang *et al.* 2009) et de l'effet inhibiteur du 2-APB, à cette concentration, sur ORAI1 (Peinelt *et al.* 2008), nous avons choisi d'utiliser la lignée cellulaire cancéreuse MDA-231 transfectée stablement avec shORAI1 dans le but d'éviter tout biais dû à l'inhibition d'ORAI1 médiée par le 2-APB. De façon intéressante, nous avons démontré que le traitement par le 2-APB augmente la vitesse de migration cellulaire dans les cellules shORAI1 par rapport aux cellules shORAI1 non traitées. Par ailleurs, nous avons également démontré que la migration cellulaire dépendante du Ca<sup>2+</sup> médié par ORAI3 est régulée par les processus adhésifs cellulaires. En effet, nous avons montré que la réduction du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire due à siORAI3 est associée à une diminution de l'activité de la calpaïne (protéase dépendante du Ca<sup>2+</sup>). En utilisant le substrat fluorescent de la calpaïne CMAC, t-BOC-Leu-Met, nous avons constaté que siORAI3 réduisait l'activité de la calpaïne dans les deux lignées MDA-231 et MDA-BrM2. Pour confirmer nos résultats, nous avons également

montré que le traitement au 2-APB (50  $\mu$ M), augmente l'activité de la calpaïne dans les cellules MDA-231 shORAI1.

Par ailleurs, étant donné que la migration cellulaire est également régie par un réarrangement du cytosquelette et plus particulièrement par des cycles de polymérisation et de dépolymérisation des filaments d'actine (Kenny *et al.* 2007, Vautrin-Glabik *et al.* 2018), nous avons cherché à évaluer l'impact d'ORAI3 sur la polymérisation actinique. Nos résultats ont révélé, par immunofluorescence, que siORAI3 provoque une altération de la polymérisation de la F-actine. En effet, les cellules MDA-231 ainsi que MDA-BrM2 transfectées avec un siCtl présentent des fibres formées d'actine F tandis que les cellules dépourvues d'ORAI3 ne présentent pas cette architecture d'actine F. A notre surprise, nous avons découvert que cette modulation de l'architecture du cytosquelette d'actine est indépendante de l'entrée calcique *via* ORAI3. De nombreuses études ont rapporté une implication de l'actine F dans la morphologie cellulaire (Pardo-Pastor *et al.* 2018, Vautrin-Glabik *et al.* 2018). Ainsi, nous avons étudié la morphologie des cellules MDA-231 et MDA-BrM2 transfectées avec siCtl ou siORAI3. Les cellules MDA-231 transfectées avec siORAI3 présentaient une morphologie plus arrondie par rapport aux cellules siCtl quel que soit le milieu de culture dans lequel les cellules ont été cultivées, prouvant le caractère indépendant vis-à-vis du  $Ca^{2+}$ . Des résultats similaires ont été obtenus sur les cellules MDA-BrM2, bien que de façon légère mais significative, une dépendance au  $Ca^{2+}$  existe dans la régulation de la morphologie des cellules MDA-BrM2.

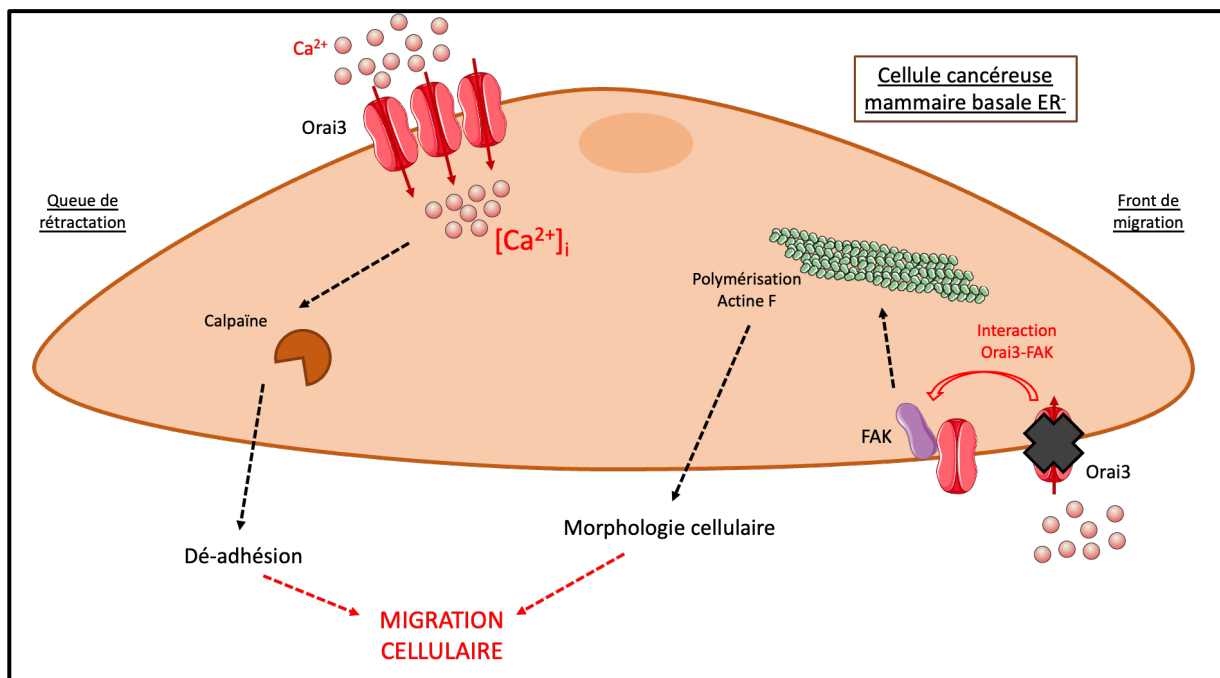
L'une des protéines les plus connues qui régulent les processus d'adhésion cellulaire ainsi que la polymérisation de l'actine est la protéine FAK (Sieg *et al.* 1999, Westhoff *et al.* 2004). Nous avons donc évalué l'expression de cette protéine et sa phosphorylation dans des cellules MDA-231 et MDA-BrM2 transfectées avec siCtl ou siORAI3. Par Western Blot, nous avons montré que les cellules dépourvues du canal ORAI3 présentent une diminution de l'expression de FAK dans nos deux modèles cellulaires. En revanche, le taux de phosphorylation de FAK ne montre aucune différence dans la condition siORAI3 par rapport à siCtl. Des interactions entre canaux ioniques et FAK conduisant à son activation ont été rapportées (Wei *et al.* 2008), nous avons donc étudié une éventuelle interaction d'ORAI3 avec FAK en utilisant la technique de PLA (Alam 2018). Nos résultats ont montré que ORAI3 et FAK sont extrêmement proches (< 40 nm) ouvrant ainsi une perspective d'interaction entre ces deux acteurs.

En conclusion, durant notre étude, nous avons montré qu'ORAI3 constitue un canal fonctionnel impliqué dans l'entrée basale du  $Ca^{2+}$  dans les cellules cancéreuses mammaires de type basal.

Dans les cellules cancéreuses mammaires basales, ORAI3 pourrait s'activer constitutivement permettant une entrée calcique basale. Le même processus a été rapporté concernant ORAI1 dans ce type de cellules cancéreuses (Hammadi *et al.* 2012, Chantome *et al.* 2013).

De plus, ORAI3 régule la migration des cellules cancéreuses mammaires de deux façons :

1. Par un mécanisme dépendant du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquant la modulation de l'activité de la calpaïne et de l'adhésion cellulaire.
2. Par l'intermédiaire du remodelage de l'architecture du cytosquelette d'actine et en régulant, de façon indépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ , l'interaction avec FAK.



**Figure 34 :** Représentation schématique du rôle d'ORAI3 dans la régulation de la migration des cellules cancéreuses mammaires ER- de type basal.

## Article

# Orai3 Calcium Channel Regulates Breast Cancer Cell Migration through Calcium-Dependent and -Independent Mechanisms

Mohamed Chamli<sup>1</sup> , Sana Kouba<sup>1</sup>, Lise Rodat-Despoix<sup>1</sup> , Luca Matteo Todesca<sup>2</sup>, Zoltán Pethő<sup>2</sup> , Albrecht Schwab<sup>2</sup> and Halima Ouadid-Ahidouch<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, UR UPJV 4667, University of Picardie Jules Verne, 33 Rue Saint Leu, 80000 Amiens, France; mohamedchamli80@hotmail.fr (M.C.); sana.kouba@u-picardie.fr (S.K.); lise.despoix@u-picardie.fr (L.R.-D.)

<sup>2</sup> Institute of Physiology II, University of Münster, Robert-Koch-Str. 27b, 48149 Münster, Germany; todesca@uni-muenster.de (L.M.T.); pethoe@uni-muenster.de (Z.P.); aschwab@uni-muenster.de (A.S.)

\* Correspondence: halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr; Tel.: +33-322827646

**Abstract:** Orai3 calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) channels are implicated in multiple breast cancer processes, such as proliferation and survival as well as resistance to chemotherapy. However, their involvement in the breast cancer cell migration processes remains vague. In the present study, we exploited MDA-MB-231 and MDA-MB-231 BrM2 basal-like estrogen receptor-negative ( $\text{ER}^-$ ) cell lines to assess the direct role of Orai3 in cell migration. We showed that Orai3 regulates MDA-MB-231 and MDA-MB-231 BrM2 cell migration in two distinct ways. First, we showed that Orai3 remodels cell adhesive capacities by modulating the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Orai3 silencing (siOrai3) decreased calpain activity, cell adhesion and migration in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner. In addition, Orai3 interacts with focal adhesion kinase (FAK) and regulates the actin cytoskeleton, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent way. Thus, siOrai3 modulates cell morphology by altering F-actin polymerization via a loss of interaction between Orai3 and FAK. To summarize, we demonstrated that Orai3 regulates cell migration through a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulation of calpain activity and, in a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent manner, the actin cytoskeleton architecture via FAK.

**Keywords:** breast cancer; Orai3; calcium; cell migration; cell adhesion; calpain; actin cytoskeleton



**Citation:** Chamli, M.; Kouba, S.; Rodat-Despoix, L.; Todesca, L.M.; Pethő, Z.; Schwab, A.; Ouadid-Ahidouch, H. Orai3 Calcium Channel Regulates Breast Cancer Cell Migration through Calcium-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cells* **2021**, *10*, 3487. <https://doi.org/10.3390/cells10123487>

Academic Editor: Isabella Derler

Received: 11 November 2021

Accepted: 8 December 2021

Published: 10 December 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Cancers are a major public health problem due to their incidence and more particularly their mortality. Among all cancers, breast cancer is one of the most diagnosed and hence one of the very frequent causes of cancer-related death in the world (2.3 million breast cancer diagnoses and 685,000 deaths in 2020 according to WHO) [1]. Ultimately, most of the patients die of metastases despite the available therapeutic progress [2–4].

The formation of metastasis is a complex process involving the escape of cancer cells from the primary tumor to spread and invade distant tissues. The cells must thus penetrate through their original tissue by cell migration and invasion, invade the endothelial barrier and survive in the blood and/or lymphatic circulation, escape from the circulation and finally proliferate to form a secondary tumor within a distant organ [5]. In order to prevent the formation of metastases, understanding the molecular mechanisms involved is essential.

One of the key steps during metastasis is cell migration and invasion [6,7], which are responsible for the escape of cancer cells from the primary tumor to colonize adjacent tissue. Cell migration is both a physiological and a pathophysiological cellular process. During the migration of cells, a remodeling of cytoskeleton architecture is observed as well as cycles of adhesion and detachment of cells to the substrate. At the cell front, focal adhesions anchor the cell to the substrate through mechanisms involving actin and focal adhesion remodeling [8]. On the other side, the disassembly of the focal adhesions, by

calpains, permits the cell to contract and move forward [9]. In recent years, many studies have shown a dysregulation in the expression and activity of proteins involved in the turnover of focal adhesions [10–12].

Among all the actors involved in cell migration, calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) plays a pivotal role [13]. Numerous studies have demonstrated the role of  $\text{Ca}^{2+}$  influx in regulating the migration of cancer cells and more specifically breast cancer cells [14–16]. Orai channels, whose activity is linked to the filling state of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores, are among the major players in mediating the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into non-excitabile cells [17–20]. It has already been established that the Orai1 channel is involved in the migration of human breast cancer cells [21,22]. In addition, our team recently reported the involvement of Orai3 in cell proliferation, survival and response to chemotherapy [23–25]. In 2013, Motiani et al. showed that Orai3 regulates estrogen receptor-positive ( $\text{ER}^+$ ) breast cancer cell invasion and independent-anchorage cell growth [26]. However, the role of Orai3 in estrogen receptor-negative ( $\text{ER}^-$ ) breast cancer cells has not yet been tested despite the knowledge of its expression in this cell type. In the present study, we investigated the role of Orai3 in migration and adhesion of basal-type  $\text{ER}^-$  breast cancer cells.

We found that the Orai3 regulates the migration of two cell lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-231 BrM2) through two different mechanisms. Orai3 regulates cell adhesion in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner by modulating the activity of calpain that in turn allows cells to detach. We demonstrated that Orai3 is active at a basal level permitting a  $\text{Ca}^{2+}$  entry leading to an increase of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) that activates calpain. Orai3 also regulates the cell morphology by rearranging the actin cytoskeleton via a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent interaction with focal adhesion kinase (FAK). Together, our results reveal new mechanisms by which Orai3 regulates breast cancer cell aggressiveness.

## 2. Material and Methods

### 2.1. Cell Culture

Human basal-like breast cancer cell lines MDA-MB-231 (MDA-231) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Molsheim, France). MDA-MB-231 BrM2 (MDA-BrM2), that specifically metastasize in the brain [27], were kindly provided by Joan Massagué (Memorial Sloan Kettering Institute, New York, NY, USA). MDA-231 shCtl and MDA-231 shOrai1 were kindly offered by Hamid Morjani (BioSpecT EA 7506, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France). Cells were grown in Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM; Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 20 mM HEPES, 2 mM Glutamine (Life Technologies, Saint Aubin, France) and 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Life Technologies, Saint Aubin, France). Cells were detached using trypsin-EDTA 0.25% (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) and were incubated at 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$  in a humidity-saturated atmosphere.

All experiments were performed on a collagen I matrix (2.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). Collagen I had been extracted as previously described [28].

### 2.2. Transient Transfections

Cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) by electroporation using the nucleofection (Amaxa Biosystems, Lonza, Aubergenville, France). MDA-231 and MDA-BrM2 cells ( $1.5 \times 10^6$ ) were transiently nucleofected according to the manufacturer's protocol with 6  $\mu\text{g}$  of scrambled siRNA (siCtl) or with siRNA directed against Orai3 (siOrai3). All the experiments were performed 72 h after siRNA transfection. siRNA sequences are available in the Supplementary Material and Methods section.

Orai3 was transiently overexpressed by lipofection using the FuGENE<sup>®</sup> HD Transfection Reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's protocol. Cells were transfected either with pEF1 $\alpha$ -IRES-DsRed plasmid as control (referred in the text as CTL), or with pEF1 $\alpha$ -Orai3-IRES-DsRed vector (referred to in the text as ORAI3). The Orai3 cDNA was inserted into the pEF1 $\alpha$ -IRES-DsRed plasmid by Hasna et al. [25]. All the experiments were performed 72 h after transfection.

### 2.3. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted with the Trizol reagent (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) method as previously described [29]. RNA concentration and purity were determined using a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Wilmington, NC, USA). RNA (2 µg) was converted into cDNA with the MultiScribe™ Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Real-time PCR was performed on a LightCycler 480 System (Roche, Basel, Switzerland) using SYBR Green I PCR master mix (Life Science, Roche, Basel, Switzerland). mRNA expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), used as housekeeping gene, and compared to the control sample, using the Pfaffl method [30]. Primer sequences are available in Supplementary Material and Methods.

### 2.4. Western Blot Analysis

Proteins were extracted and separated as previously described [29]. The primary antibodies used were: anti-Orai3 (1:1000, Abcam, Waltham, MA, USA), anti-FAK (1: 1000, Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA), anti-pFAK Y397 (1:1000, Cell Signaling Tech., Danvers, MA, USA). GAPDH antibody (1:5000, Abcam, Waltham, MA, USA) was used for loading controls. Secondary antibodies were coupled to horseradish peroxidase, permitting protein detection with an enhanced chemiluminescence kit (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France). Detection and quantification were performed as previously described [29]. All experiments were normalized to GAPDH, which was used as reference protein.

### 2.5. Cell Migration

Cell migration was quantified by means of live-cell imaging as previously described [31]. Cells were seeded 24 h prior to the experiment into 12.5 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks. These were placed into heating chambers placed on the stage of phase contrast microscopes (Axiovert 40C; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Cell migration was monitored for 6 h in 5 min intervals. Image acquisition and camera (Bresser, Rhede, Germany) were controlled by MikroCamLab II software (Bresser, Rhede, Germany). Analysis by ImageJ 1.53a (National Institute of Health, Bethesda MD, USA) and Amira software (ThermoFisher Scientific Corporation, Waltham, MA, USA) provided the area, perimeter and center of cells. Migration was quantified as the movement of the cell center with time. Matlab 9.2 software (Mathworks, Natick, MA, USA) was used to quantify migration speed (in µm/min) and translocation as the net distance covered during the course of experiment (in µm). Cell directionality was derived from the quotient of translocation and total track length.

Cell migration was also evaluated using a Boyden chamber model with 8 µm pore size cell culture inserts (Falcon®, Corning, Boulogne-Billancourt, France). Cells ( $4 \times 10^4$ ) were seeded in the upper compartment in culture medium supplemented with 5% FBS. The lower compartment was filled with the same culture medium. Thus, the migration assay was performed without the addition of chemoattractant. After 24 h of incubation at 37 °C, inserts were washed with phosphate-buffered saline (PBS), then fixed with methanol for 20 min at room temperature and stained with haematoxylin for 10 min. The remaining cells on the upper side were removed from the membrane by scrubbing. Cells in 25 contiguous areas were counted at  $\times 400$  magnification. For each experiment, the number of migrating cells was normalized to their respective control (siCtl or CTL).

### 2.6. Cell Adhesion Assays

For cell adhesion assays, cells were gently detached with Versene buffer (126 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM EDTA and 50 mM HEPES) 72 h post transfection, centrifuged to eliminate EDTA, and resuspended in 1 mL of culture medium. A total of  $8 \times 10^4$  cells were seeded in 35 mm Petri dishes and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> (incubation time from 15 min to 8 h). Non-adherent cells were removed by smooth PBS washing after culture medium removal. Thereafter, 800 µL 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 0.5 mg/mL diluted in culture medium was

added and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 1 h. After removing MTT, 200 µL dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) were added to solubilize formazan crystals. Absorbance was read at 550 nm using a microplate spectrophotometer (Infinite F200 Pro, Tecan, Lyon, France), and corresponded to adherent cell density.

### 2.7. Cell Morphology

One × 10<sup>5</sup> cells were seeded in 35 mm Petri dishes 24 h prior to the experiments. Cell images were taken with an inverted optical microscope (Nikon Eclipse TS100, Leica Microsystems, Nanterre, France) with the 10× objective. Cell morphology was quantified by assessing their circularity index (CI) using ImageJ. The following formula was used to calculate CI:  $4\pi(\text{area})/(\text{perimeter})^2$ . CI presents a range of value from 0 to 1 where 1 corresponds to a rounded cell morphology whereas values close to 0 describe an elongated cell shape.

### 2.8. Immunofluorescence

One × 10<sup>4</sup> cells were seeded on a Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France) 24 h prior to the immunofluorescence experiment. After washing with PBS cells were fixed with paraformaldehyde (PFA; 4%) at room temperature for 30 min. Thereafter, cells were washed and permeabilized with Triton™ X-100 (0.1% in PBS; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 10 min. Cells were washed 3 times in PBS and blocked with 5% bovine serum albumin (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) diluted in PBS for 45 min. Phalloidin-tetramethyl rhodamine conjugate (1/1000 in PBS with 1% BSA; Santacruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) was used to stain F-actin filaments. Cells were incubated with phalloidin-tetramethyl rhodamine conjugate in the dark for 30 min. Afterwards, cells were washed 3 times in PBS and incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; 1%) for 1 min. Lab-Tek™ were mounted on slides using Prolong® Gold antifade reagent (Life Technologies). Images were taken at 40× objective using the Zeiss Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and analyzed in ImageJ 1.53a (National Institute of Health, Bethesda MD, USA).

### 2.9. Measurement of Calpain Activity

In order to measure calpain activity in single cells, the Boc test was used [32]. Two to three × 10<sup>4</sup> cells were seeded in glass bottom dishes (Ibidi, Gräfelfing, Germany) 24 h before the experiment. Ten minutes before the experiment, the EMEM culture medium was replaced with Ringer's solution. Subsequently, 10 µM of calpain substrate calpain 7-amino-4-chloromethylcoumarin, t-BOC-L-leucyl-L-methionine amide (CMAC, t-BOC-Leu-Met, Invitrogen) were added. After a 10 min incubation at 37 °C and in the dark, fluorescence images were taken at 40× objective using the Zeiss Observer Z1 microscope and analyzed in ImageJ. The image exposure parameters (100 ms for CMAC, t-BOC-Leu-Met) were identical in each experiment. Fluorescence intensity was measured over the entire cell area and corrected for background fluorescence in ImageJ.

### 2.10. Calcium Imaging

Ten to fifteen × 10<sup>3</sup> cells were seeded on glass coverslips 24 h before each experiment. Then, cells were incubated with 3.33 µM Fura-2/AM (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) at 37 °C in the dark for 30 min. Afterwards, the cells were washed with extracellular saline solution (145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4). Thereafter, the coverslip was placed on the stage of a fluorescence microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Cells were illuminated at 340 and 380 nm using a monochromator (polychrome IV, TILL Photonics, Germany), and fluorescence emission was captured with a Cool SNAPHQ camera (Princeton Instruments, Lisses, France) after filtration through a long-pass filter (510 nm). Metafluor software (version 7.1.7.0, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) was used for signal acquisition and data analysis. During acquisition, cells were continuously superfused with the saline solution. The store-independent Ca<sup>2+</sup> entry was analyzed by following the variation of

the ratio  $F_{340}/F_{380}$  only by changing the  $Ca^{2+}$  concentrations of the extracellular solution from 2 mM  $Ca^{2+}$  to 0 mM  $Ca^{2+}$  (supplemented with 800  $\mu$ M EGTA). The intracellular  $Ca^{2+}$  concentration is derived from the ratio of emitted fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths ( $F_{340}/F_{380}$ ). Store-operated  $Ca^{2+}$  entry (SOCE) was triggered by applying the classical protocol using 1  $\mu$ M thapsigargin for  $Ca^{2+}$  store depletion which lead to  $Ca^{2+}$  influx through store-operated channels (SOC).

To estimate divalent cation influx under basal conditions, we used the manganese ( $Mn^{2+}$ ) quenching technique as previously described [23]. After Fura2/AM loading and washings, cells were excited at 360 nm and fluorescence was recorded at 510 nm. After 2 min, the  $Ca^{2+}$  (2 mM) present in the superfusion solution was replaced by 2 mM  $Mn^{2+}$  solution. The  $Mn^{2+}$  influx, a corroborate of  $Ca^{2+}$  influx, was estimated from the quenching rate of fluorescence at 360 nm. The  $Mn^{2+}$  quenching extracellular solution was composed of 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM  $MnCl_2$ , 1 mM  $MgCl_2$ , 5 mM glucose and 10 mM HEPES (pH 7.4).

### 2.11. Proximity Ligation Assay

One  $\times 10^4$  cells were seeded on Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France) 24 h prior to the proximity ligation assay (PLA) experiment. After washings with PBS, cells were fixed with PFA (4%) at room temperature for 30 min. Thereafter, cells were washed and permeabilized with Triton™ X-100 (0.1% in PBS; Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) for 10 min. The Duolink in situ PLA detection kit (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was used to detect interactions between FAK and Orai3. Experiments were performed following the manufacturer's instructions. Primary antibodies were incubated at 1:500 overnight at 4 °C. Red fluorescent oligonucleotides produced as the end product of the procedure were visualized using the Zeiss Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Images were analyzed using ImageJ software 1.53a (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

### 2.12. Statistical Analysis

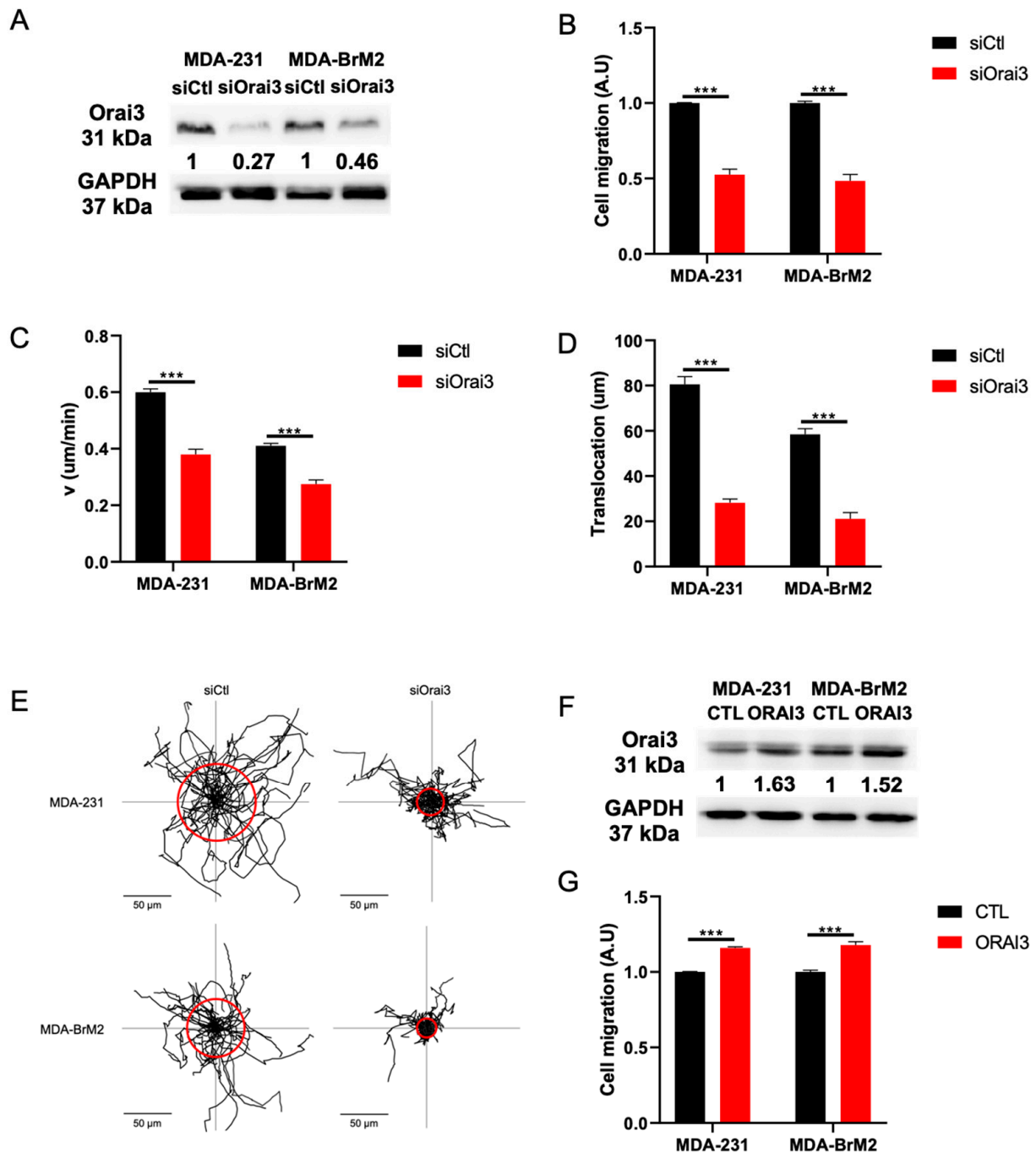
All data are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean) of at least three independent experiments. N refers to number of experiments and n refers to the number of cells. The mean values of two groups were compared by the student's *t*-test and the mean values of more than two groups were compared using two-way analysis of variance (ANOVA), using GraphPad Prism 7.0 software (La Jolla, CA, USA). The statistical significance  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$  are represented as \*, \*\* and \*\*\*, respectively.

## 3. Results

### 3.1. The Orai3 $Ca^{2+}$ Channel Regulates Cell Migration and Is Activated at a Basal Level in MDA-231 and MDA-BrM2 Breast Cancer Cells

Until now, no study has been conducted on the role of the Orai3  $Ca^{2+}$  channel in the migration of cancer cells. In order to understand the mechanisms by which Orai3 regulates migration we studied the impact of the downregulation of Orai3 by siRNA on cell migration in two aggressive breast cancer cell lines namely MDA-MB-231 (MDA-231) and MDA-MB-231 BrM2 (MDA-BrM2). Silencing of Orai3 decreases Orai3 protein levels by  $77.0 \pm 9.1$  and  $54.0 \pm 3.1\%$  in MDA-231 and MDA-BrM2 cells, respectively (Figure 1A and Figure S1A). siOrai3 decreases mRNA levels by 87% in MDA-231 cells and 82% in MDA-231 BrM2 cells (Figure S1B). Furthermore, Orai3 silencing did not affect the expression of STIM1, STIM2 and Orai1 at both mRNA and protein levels (Figure S1C–G).





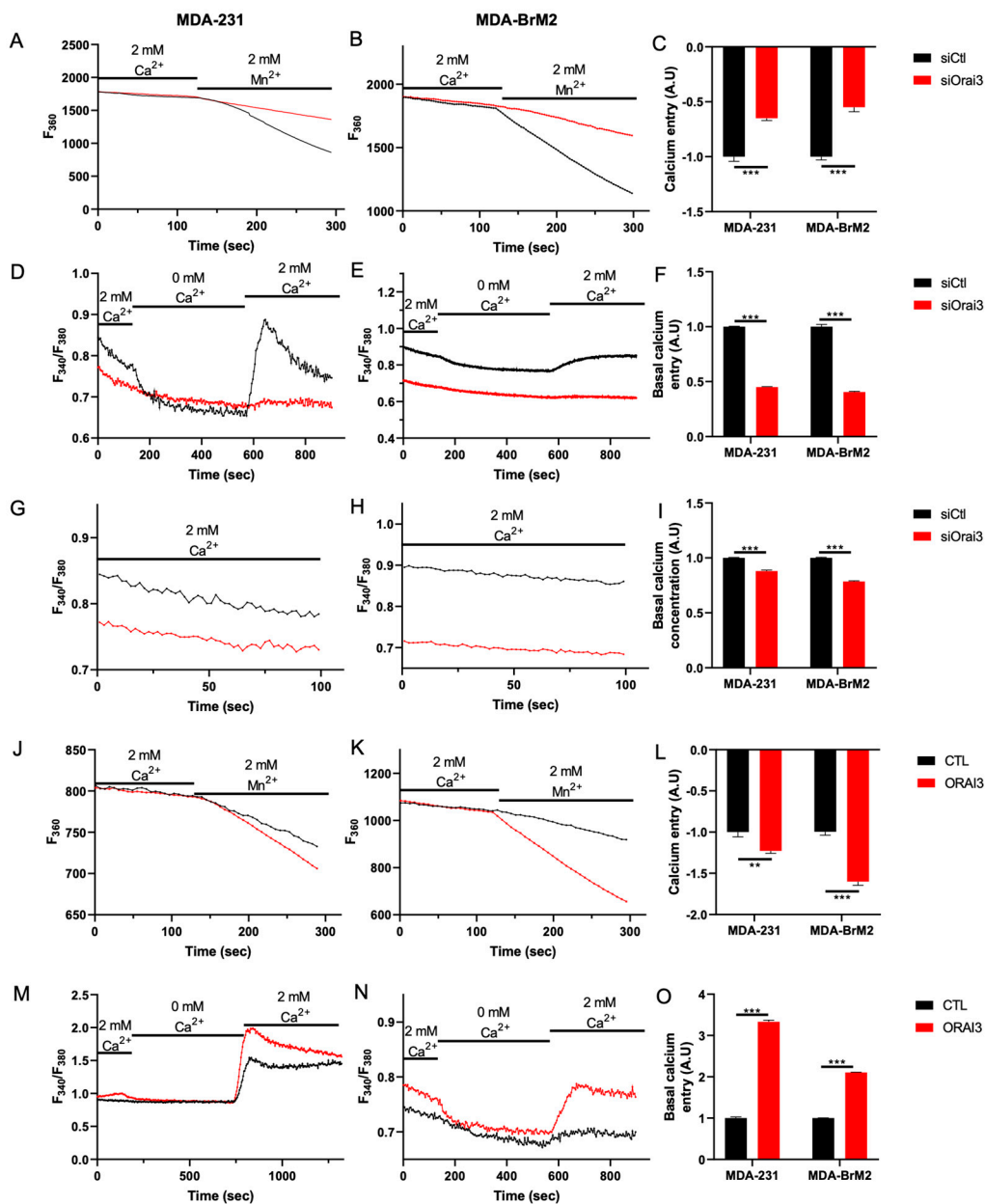
**Figure 1.** Orai3 regulates basal-like breast cancer cell migration. (A) Orai3 expression evaluated by Western Blot 72 h post transfection (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (B) Orai3 activity regulates MDA-231 and MDA-BrM2 cell migration. Cell migration experiments were performed using Boyden chambers (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C,D) Both cell migration speed (C) and translocation (D) are impaired by siOrai3. Summary of the migration experiments shown in E and evaluated by live-cell imaging (MDA-231 siCtl n = 49; MDA-231 siOrai3 n = 43; MDA-BrM2 siCtl n = 39; MDA-BrM2 siOrai3 n = 42; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (E) Trajectories of migrating cells in siCtl and siOrai3 MDA-231 and MDA-BrM2 cells. The radius of the red circles illustrates the mean translocation of each condition (Scale bar: 50 μm). (F,G) Orai3 overexpression increases protein expression levels (F) as well as MDA-231 and MDA-BrM2 cell migration (G). Cell migration experiments were performed using Boyden chambers (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Using a Boyden chamber migration test, we showed a reduction in cell migration by  $50.0 \pm 5.6\%$  and  $55.0 \pm 6.1\%$  in MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with siOrai3, respectively (Figure 1B). These data were confirmed by a MTT test which allowed us to rule out any effect due to proliferation because the silencing of Orai3 failed to affect both MDA-231 and MDA-BrM2 cell viability and proliferation (Figure S2A–C). In order to confirm the results obtained by the Boyden chamber model, we assessed cell migration of the two cell lines also by means of live-cell imaging. Thereby, we determined migration parameters such as cell migration speed, translocation and directionality. We show that the migration speed of siOrai3 MDA-231 and siOrai3 MDA-BrM2 cells are reduced by  $34.0 \pm 3.9\%$  and  $38.0 \pm 3.7\%$ , respectively, when compared to the siCtl condition (Figure 1C). Moreover, we observed a decrease in translocation by  $65.0 \pm 3.2\%$  and  $63.0 \pm 2.7\%$  in both cell lines (MDA-231 and MDA-BrM2, respectively) (Figure 1D,E). We also observed a decrease in cell migration directionality, by  $48.0 \pm 3.4\%$  and  $48.0 \pm 3.1\%$  of siOrai3 MDA-231 and siOrai3 MDA-BrM2 cells, respectively (Figure S2D). We have also studied the effect of transient overexpression of Orai3 on cell migration. By Western Blot, Orai3 overexpression showed an increase of protein levels by  $63 \pm 2.7\%$  in MDA-231 cells and  $52 \pm 1.1\%$  in MDA-BrM2 cells (Figure 1F and Figure S2E). Orai3 overexpression was also validated at the mRNA level in both cell lines (Figure S2F). Using a Boyden chamber model we found an increase of cell migration by  $15 \pm 0.9\%$  and  $17 \pm 2.1\%$  in both cell lines compared to CTL (Figure 1G). The cell viability was not affected (Figure S2G).

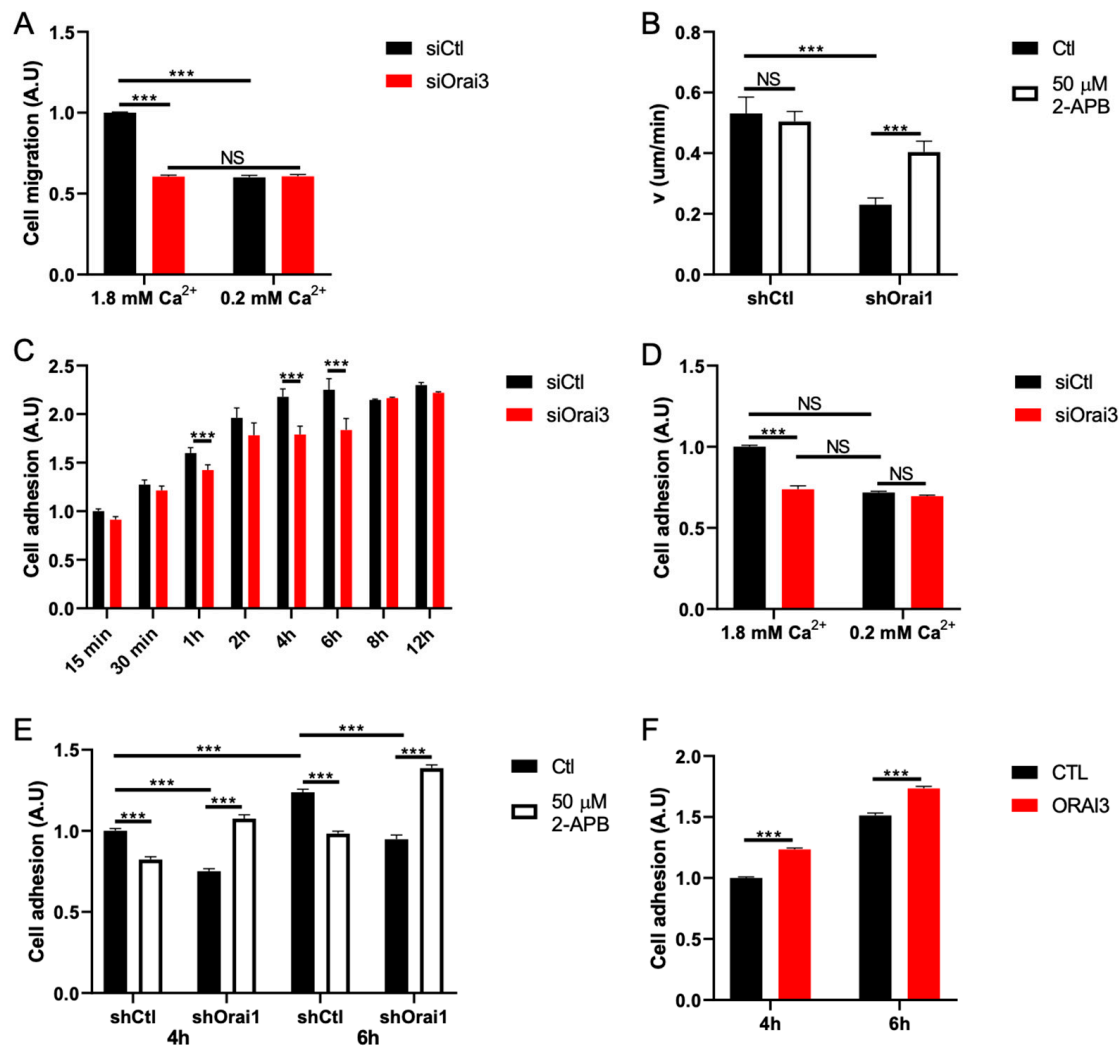
We next studied the impact of siRNA against Orai3 on  $\text{Ca}^{2+}$  entry using the manganese-quenching technique. Orai3 silencing decreases the  $\text{Mn}^{2+}$  quench by  $40.0 \pm 2.1\%$  and  $45.0 \pm 3.6\%$  in MDA-231 and MDA-BrM2 cells, respectively (Figure 2A–C). Moreover, we used the basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry protocol to show that entry of cations is supported by entry of  $\text{Ca}^{2+}$ . Orai3 silencing decreases basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry (assessed as the  $F_{340}/F_{380}$  ratio) by  $57.0 \pm 1.1$  and  $62.0 \pm 1.3\%$  in MDA-231 and MDA-BrM2 respectively (Figure 2D–F). This basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry also regulates the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. Indeed, we observed a  $13.0 \pm 0.6$  and  $18.0 \pm 0.4\%$  decrease in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration when the expression of the Orai3 channel was reduced (Figure 2G–I). Furthermore, using the classical SOCE protocol, we confirmed that Orai3 does not participate in SOCE (Figure S3A–C) in our breast cancer cell lines. Besides, we showed that Orai3 overexpression increases the cation entry by  $23.0 \pm 3.6$  and  $62.0 \pm 1.6\%$  in MDA-231 and MDA-BrM2 cells, respectively (Figure 2J–L). We also found that basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry increased by 3.25-fold and 2.15-fold when Orai3 was overexpressed in MDA-231 and MDA-BrM2, respectively (Figure 2M–O).

### 3.2. Orai3 Regulates Cell Migration in a $\text{Ca}^{2+}$ -Dependent Manner via a Modulation of Cell Adhesive Capacities

Given the ability of Orai3 to regulate basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry and in order to understand whether  $\text{Ca}^{2+}$  is involved in cell migration, we cultured cells in normal medium ( $1.8 \text{ mM Ca}^{2+}$ —normal  $\text{Ca}^{2+}$ ) and in a medium poor in  $\text{Ca}^{2+}$  ( $0.2 \text{ mM Ca}^{2+}$ —low  $\text{Ca}^{2+}$ ). Orai3 silencing reduced cell migration of MDA-231 cells by  $45.0 \pm 0.9\%$  under normal  $\text{Ca}^{2+}$  conditions (Figure 3A). Reducing the concentration of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  (low  $\text{Ca}^{2+}$ ) decreased cell migration to a similar extent, i.e., by  $41.0 \pm 1.3\%$ . This effect of low extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  is not enhanced by siOrai3 (Figure 3A). Similar results were obtained on the MDA-BrM2 cell line (Figure S4A). Orai3 knockdown under both normal  $\text{Ca}^{2+}$  and low  $\text{Ca}^{2+}$  conditions reduced MDA-BrM2 cell migration by  $44.0 \pm 1.8\%$  (Figure S4A). As expected, siOrai3 in low  $\text{Ca}^{2+}$  does not show any additional decrease in cell migration (Figure S4A). In all cases, siOrai3 does not affect cell viability (Figure S4B,C). All together, these results argue for a regulation of MDA-231 and MDA-BrM2 cell migration by Orai3-mediated basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry.



**Figure 2.** Orai3 is active at a basal level and modulates the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. (A–C). Traces (A,B) and quantification (C) of  $\text{Mn}^{2+}$  quenching measured at  $F_{360}$  in MDA-231 (A,C) and MDA-BrM2 (B,C) cell lines transfected with siCtl or siOrai3 (MDA-231 siCtl  $n = 152$ ; MDA-231 siOrai3  $n = 162$ ; MDA-BrM2 siCtl  $n = 212$ ; MDA-BrM2 siOrai3  $n = 228$ ;  $N = 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (D–F). Traces (D,E) and quantification (F) of basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (D,F) and MDA-BrM2 (E,F) cell lines transfected with siCtl or siOrai3 (MDA-231 siCtl  $n = 269$ ; MDA-231 siOrai3  $n = 255$ ; MDA-BrM2 siCtl  $n = 222$ ; MDA-BrM2 siOrai3  $n = 322$ ;  $N = 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (G–I).  $\text{Ca}^{2+}$  concentration plot (G,H) and quantification (I) measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (G,I) and MDA-BrM2 (H,I) cell lines transfected with siCtl or siOrai3 (MDA-231 siCtl  $n = 423$ ; MDA-231 siOrai3  $n = 441$ ; MDA-BrM2 siCtl  $n = 404$ ; MDA-BrM2 siOrai3  $n = 490$ ;  $N = 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (J–L). Traces (J,K) and quantification (L) of  $\text{Mn}^{2+}$  quenching measured at  $F_{360}$  in MDA-231 (J,L) and MDA-BrM2 (K,L) cell lines transfected with CTL or ORAI3 (MDA-231 CTL  $n = 182$ ; MDA-231 ORAI3  $n = 169$ ; MDA-BrM2 CTL  $n = 198$ ; MDA-BrM2 ORAI3  $n = 158$ ;  $N = 3$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (M–O). Traces (M,N) and quantification (O) of basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (M,O) and MDA-BrM2 (N,O) cell lines transfected with CTL or ORAI3 (MDA-231 CTL  $n = 212$ ; MDA-231 ORAI3  $n = 209$ ; MDA-BrM2 CTL  $n = 188$ ; MDA-BrM2 ORAI3  $n = 199$ ;  $N = 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).



**Figure 3.** Orai3 regulates cell migration and adhesion in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. (A,B). Orai3-mediated Ca<sup>2+</sup> entry supports cell migration. Migration assay using Boyden chambers in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup> (A) (N = 3; \*\*\* *p* < 0.001; NS Non-Significant) and cell migration speed following Orai3 activation with 2-APB, evaluated by live-cell imaging (B) (shCtl Ctl n = 39; shCtl 2-APB n = 41; shOrai1 Ctl n = 42; shOrai1 2-APB n = 39; N = 3; \*\*\* *p* < 0.001; NS Non-Significant). (C). Orai3 activity regulates cell adhesion. Cell adhesion assay using an MTT-based technique (N = 3; \*\*\* *p* < 0.001). (D,E). Cell adhesion is mediated by Ca<sup>2+</sup> entry through Orai3. MTT-based cell adhesion assay in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup> (D) and following Orai3 activation with 2-APB (E) (N = 3; \*\*\* *p* < 0.001; NS Non-Significant). (F). MTT-based cell adhesion assay showing that Orai3 overexpression enhances cell adhesion (N = 3; \*\*\* *p* < 0.001; NS Non-Significant).

Very few pharmacological agents are known to modulate the Orai3 channel. Among them, 2-APB had been shown to activate Orai3 when used at 50 μM [33,34]. However, at this concentration, 2-APB inhibits Orai1 activity [34]. Besides, past studies reported the involvement of Orai1 in MDA-231 cell migration [22]. Given these data, we chose to use MDA-231 cell line stably transfected with shOrai1 to avoid any bias due to 2-APB-mediated Orai1 inhibition (Figure S4D). Our results showed that shOrai1 cells exhibit a cell migration speed reduced by  $68.0 \pm 3.6\%$  compared to shCtl cells (Figure 3B). Incubation of the cell with 2-APB (50 μM) during 6 h has no effect on shCtl cells (Figure 3B). Interestingly, 2-APB treatment increases cell migration speed by  $90.0 \pm 10\%$  in shOrai1 cells compared to untreated shOrai1 cells (Figure 3B).

During cell migration, adhesion plays a pivotal role [35,36]. First, we studied cell adhesion using a kinetic protocol from 15 min to 12 h of cell adhesion in MDA-231 (Figure 3C) and MDA-BrM2 (Figure S4D) cell lines. Orai3 silencing decreased MDA-231 cell adhesion

by  $21.0 \pm 4.1$  and  $18.0 \pm 4.8\%$  at 4 h and 6 h, respectively (Figure 3C). The corresponding values for the MDA-BrM2 cell line are a decrease of  $18.0 \pm 2.1\%$ ,  $15.0 \pm 4.1\%$ ,  $23.0 \pm 3.3\%$  and  $29.0 \pm 4.7\%$  after 1 h, 2 h, 4 h and 6 h, respectively (Figure S4D). After 6 h of cell adhesion, we did not observe any differences in cell adhesion neither in MDA-231 (Figure 3C) nor in MDA-BrM2 (Figure S4D) cells transfected with siOrai3 when compared to their respective siCtl cells. We therefore chose 4 h and 6 h cell adhesion times in order to investigate the impact of a reduced extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. We showed that the reduction in cell adhesion in low  $\text{Ca}^{2+}$  medium (by  $28.0 \pm 0.7\%$ ) is similar to that measured in cells transfected with siOrai3 and grown in 1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  ( $25.0 \pm 1.9\%$ ) (Figure 3D). Moreover, siOrai3 does not affect cell adhesion when cells are grown in the low  $\text{Ca}^{2+}$  medium (Figure 3D). Similar results were obtained in the MDA-BrM2 cell line (Figure S4F).

To support these results, we incubated shOrai1 MDA-231 cells in the presence of 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) for 4 h and 6 h and measured the adhesion rate. We found that 2-APB increased adhesion of MDA-231 shOrai1 cells by  $29.0 \pm 1.7\%$  at 4 h and by  $33.0 \pm 0.9\%$  at 6 h (Figure 3E). Furthermore, overexpression of Orai3 in the MDA-231 cell line increases cell adhesion by  $23.0 \pm 1.1\%$  and  $17.0 \pm 2.3\%$  at 4 h and 6 h, respectively (Figure 3F). Orai3 overexpression in the MDA-BrM2 cell line also increased cell adhesion by  $25.0 \pm 6.1\%$  and  $18.0 \pm 3.2\%$  at 4 h and 6 h, respectively (Figure S4G).

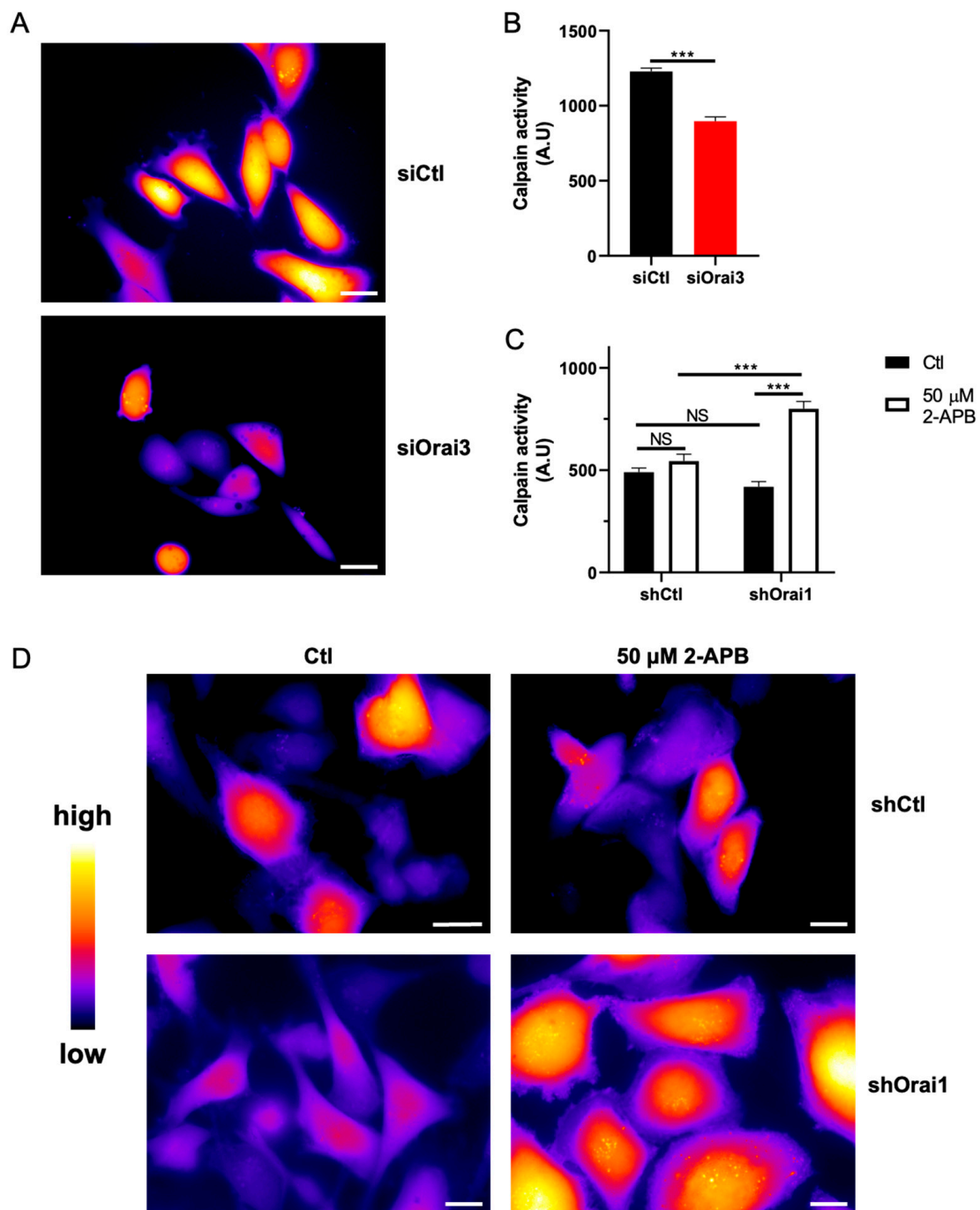
### 3.3. Orai3, by Regulating $\text{Ca}^{2+}$ Entry, Controls Calpain Activity

Among  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent actors involved in cell migration, calpains are known to play a major role in cell migration [37]. Since calpain contributes to the remodeling of focal adhesions, this process becomes  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent [38]. We therefore sought to understand whether the decrease in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  due to siOrai3 is associated with a decrease in the activity of calpain. Using the fluorescent calpain substrate CMAC, t-BOC-Leu-Met, we found that siOrai3 reduced calpain activity by  $25.0 \pm 4.4\%$  in the MDA-231 cell line (Figure 4A,B) and by  $38.0 \pm 3.2\%$  in the MDA-BrM2 cell line (Figure S5A,B) when compared to siCtl. To go further, we have also shown that treatment with 2-APB (50  $\mu\text{M}$ ) increased the activity of calpain in MDA-231 shOrai1 cells by almost  $50.0 \pm 6.9\%$  (Figure 4C,D). Furthermore, we employed an atomic force microscope to evaluate adhesion forces in MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines within the first 10 s of cell-matrix contact by means of single-cell force spectroscopy. We have found that siOrai3 has no impact on the initial adhesion forces in both cell lines (Figure S5C,D).

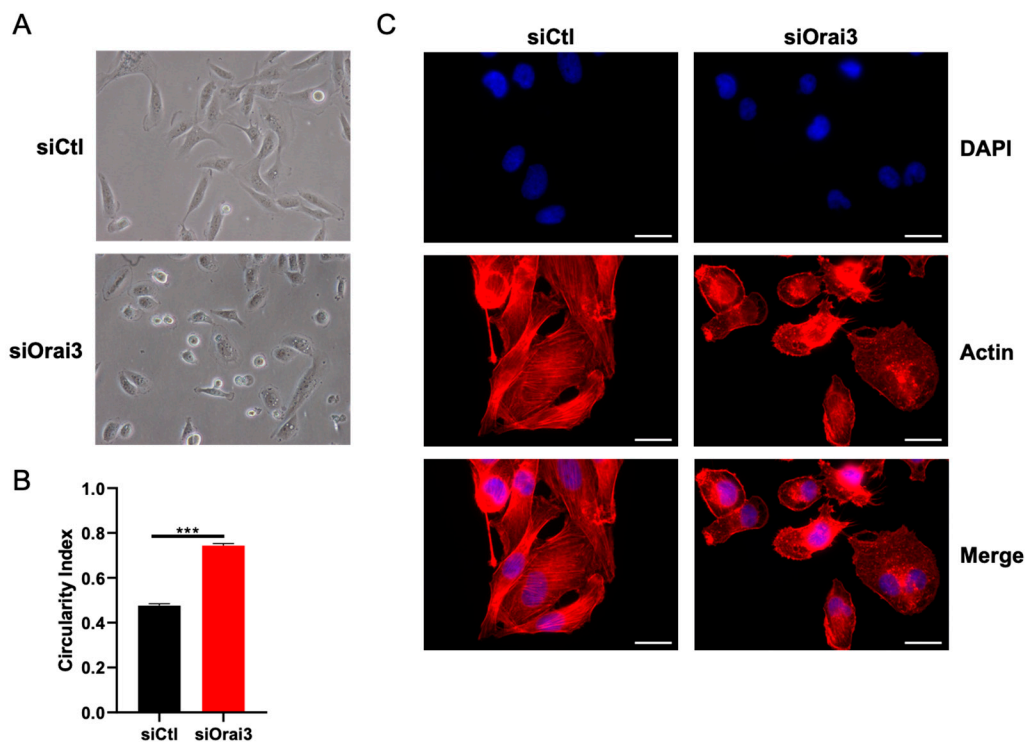
### 3.4. Orai3 Maintains an Elongated Cell Morphology through a $\text{Ca}^{2+}$ -Independent Mechanism

Cell migration is also governed by a rearrangement of the cytoskeleton and more particularly by cycles of polymerization and depolymerization of actin filaments which in turn affect the cell morphology [39,40]. Thus, we first studied the cell morphology of MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with siCtl or siOrai3. MDA-231 cells transfected with siOrai3 exhibited a more rounded phenotype compared to siCtl cells. The circularity index (CI) of siOrai3 MDA-231 cells amounts to  $0.75 \pm 1.3$ , while cells transfected with siCtl have a circularity index of  $0.49 \pm 0.8$  (Figure 5A,B). Similar results were obtained for the MDA-BrM2 cell line. The circularity index of siCtl BrM2 cells is  $0.57 \pm 1.5$  and  $0.79 \pm 0.4$  in siOrai3 MDA-BrM2 cells (Figure S6A,B).

Many studies reported an involvement of F-actin in regulating cell morphology [40,41]. Therefore, we hypothesized a possible participation of F-actin polymerization in determining the morphology of both cell lines transfected or not with siOrai3. Using fluorescence microscopy, we showed that the Orai3 downregulation causes an alteration in the polymerization of F-actin. MDA-231 (Figure 5C) as well as MDA-BrM2 (Figure S6C) cells transfected with a siCtl exhibit fibers formed from F-actin while the cells lacking Orai3 do not have this F-actin architecture.



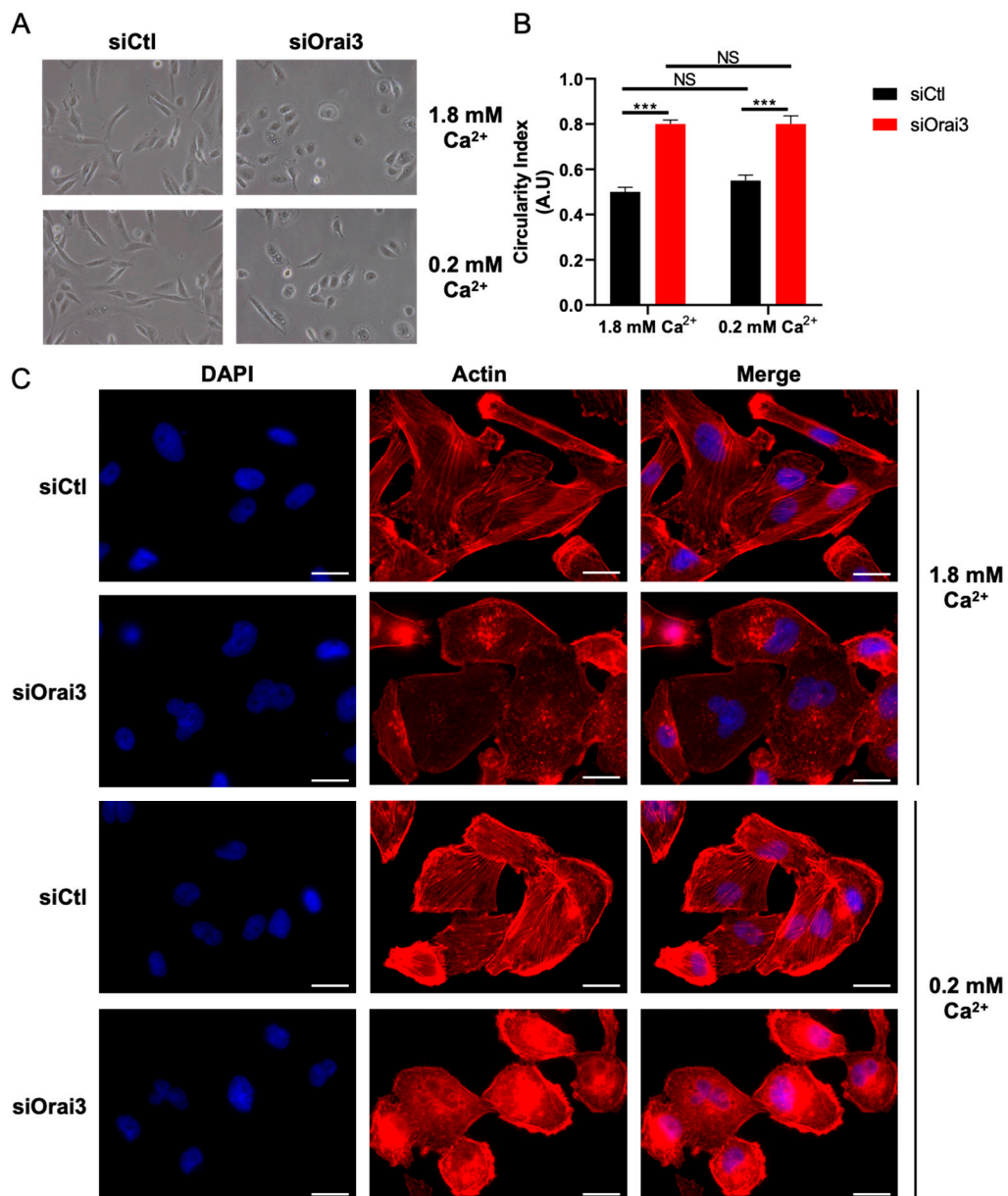
**Figure 4.** Orai3 silencing impairs MDA-231 cell adhesion. (A,B). Orai3 silencing decreased calpain activity. Representative fluorescence images (A) and fluorescence quantification (B) of calpain substrate CMAC, t-BOC-Leu-Met (siCtl n = 209; siOrai3 n = 211; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C,D). Orai3 activation with 2-APB enhanced calpain activity. Measurement (C) and representative fluorescence pictures (D) of calpain substrate CMAC, t-BOC-Leu-Met (shCtl Ctl n = 243; shCtl 2-APB n = 201; shOrai1 Ctl n = 233; shOrai1 2-APB n = 211; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). Scale bar: 10  $\mu$ m.



**Figure 5.** Orai3 modulates cell morphology. (A,B). siOrai3 MDA-231 cells present a rounded morphology. Representative images (A) and calculation of the circularity index (B) of MDA-231 cell morphology (siCtl  $n = 246$ ; siOrai3  $n = 312$ ;  $N = 3$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ). (C). Actin cytoskeleton architecture depends on Orai3 expression levels. Fluorescent rhodamine phalloidin staining reveals the actin architecture of siCtl and siOrai3 MDA-231 cells ( $N = 3$ ). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

Furthermore, Orai3 overexpression does not further modify cell morphology of both cell lines (Figure S6D,E).

Since cell migration of MDA-231 and MDA-BrM2 cells is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent, we evaluated the potential role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the morphological changes regulated by Orai3. We thus cultured the cells in a normal (1.8 mM) or in low  $\text{Ca}^{2+}$  medium (0.2 mM). To our surprise, siCtl MDA-231 cells transfected with siCtl and cultured in a low  $\text{Ca}^{2+}$  medium do not change their morphology (CI siCtl 1.8 mM =  $0.49 \pm 3.2$ ; CI siCtl 0.2 mM =  $0.52 \pm 3.5$ ). Moreover, siOrai3 MDA-231 cells cultured in low  $\text{Ca}^{2+}$  medium exhibit a similar cell morphology when compared to the siOrai3 cells cultured in normal  $\text{Ca}^{2+}$  medium (CI siOrai3 1.8 mM =  $0.81 \pm 1.8$ ; CI siOrai3 0.2 mM =  $0.83 \pm 4.2$ ) (Figure 6A,B). The morphology changes are supported by the polymerization of F-actin. Indeed, siCtl cells cultured in both normal and low  $\text{Ca}^{2+}$  conditions showed F-actin filaments. On the contrary, siOrai3 cells cultured in both culture media display a modified actin architecture compared to siCtl cells (Figure 6C). In siCtl MDA-BrM2 cells, we observed a small but significant increase of the circularity index under low  $\text{Ca}^{2+}$  medium conditions (CI of  $0.63 \pm 2.9$  while the cells cultured in normal  $\text{Ca}^{2+}$  medium have a CI of  $0.55 \pm 1.7$ ). Silencing of Orai3 induced similar morphological changes in both culture media (IC siOrai3 1.8 mM =  $0.77 \pm 2.3$ ; IC siOrai3 0.2 mM =  $0.79 \pm 0.9$ ) (Figure S7A,B). Regarding F-actin architecture, similar to siOrai3 MDA-231 cells, siOrai3 MDA-BrM2 cells also exhibit an altered actin architecture (in normal and low  $\text{Ca}^{2+}$ ) while siCtl MDA-BrM2 cells show long F-actin filaments (Figure S7C).

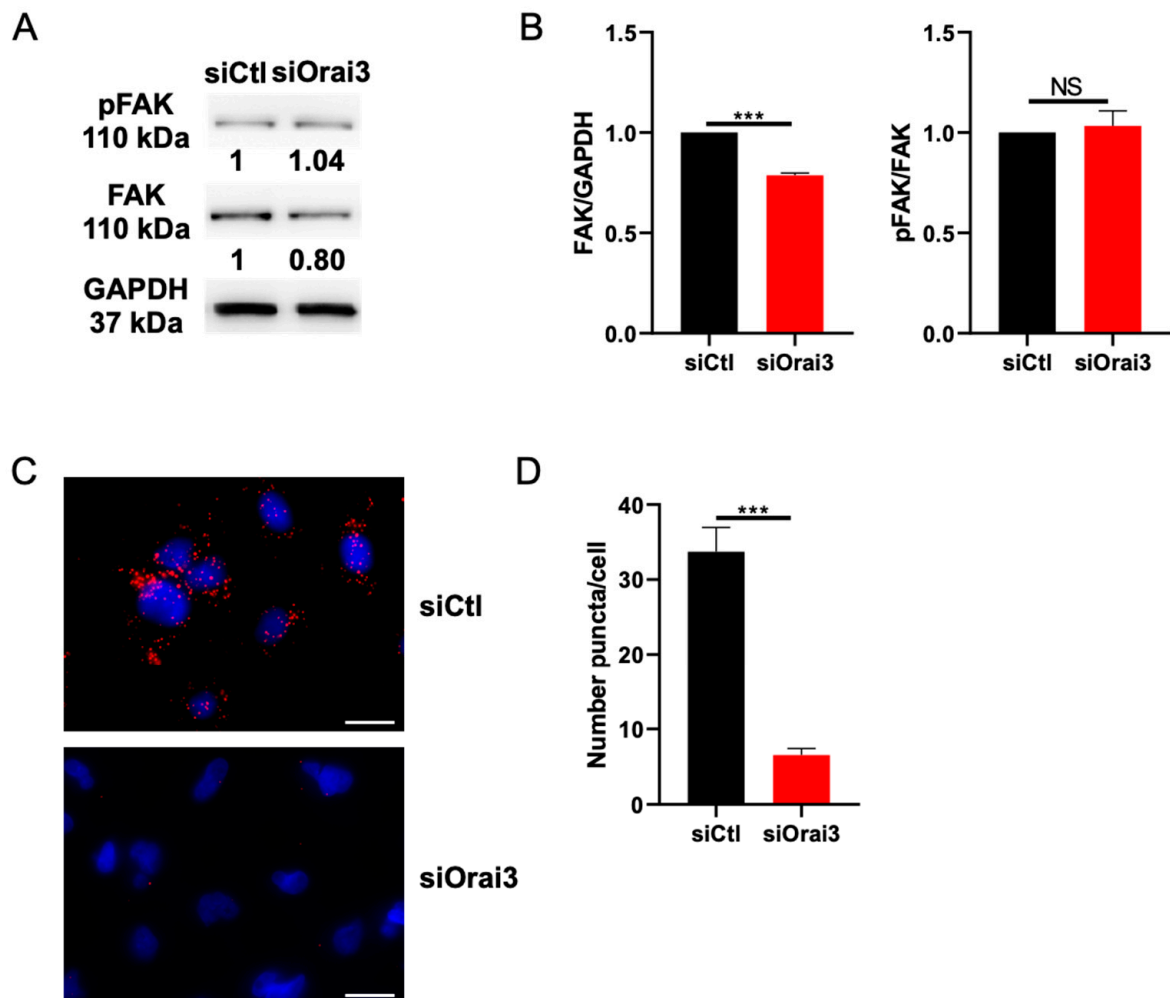


**Figure 6.** Cell morphology is maintained by the presence of Orai3 and not its activity. (A,B). The presence, not the activity of Orai3 regulates cell morphology. Representative images (A) and calculation of the circularity index (B) of MDA-231 morphology (siCtl 1.8 mM n = 207; siOrai3 1.8 mM n = 211; siCtl 0.2 mM n = 209; siOrai3 0.2 mM n = 198; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). (C) Fluorescent rhodamine phalloidin staining showing the actin architecture of siCtl and siOrai3 MDA-231 cells cultivated in 1.8 mM or 0.2 Ca<sup>2+</sup> medium (N = 3). Scale bar: 10  $\mu$ m.

### 3.5. Orai3 Interacts with FAK and Regulates Its Expression

One of the most well-known proteins that regulates cell adhesion processes as well as the polymerization of actin is the FAK protein [42,43]. We therefore evaluated the expression of this protein and its phosphorylation in MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with siCtl or siOrai3. Using Western Blot analysis, we showed that the cells lacking Orai3 channel have a reduced FAK expression:  $32.0 \pm 1.3\%$  less in MDA-231 cells (Figure 7A,B) and  $35.0 \pm 2.9\%$  less in MDA-BrM2 cells (Figure S8A) when compared to their respective controls. Interestingly, even though total FAK expression decreased, the phosphorylation rate of FAK shows no differences in siOrai3 compared to siCtl (Figure 7B). Similar results were obtained on Orai3-overexpressing MDA-231 cells (Figure S8E).





**Figure 7.** Orai3 modulates and interacts with focal adhesion kinase (FAK). (A,B). Involvement of Orai3 in FAK total expression. Representative Western blot (A) and quantification (B) of FAK expression and FAK phosphorylation in MDA-231 cells (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). (C,D). Orai3 interacts with FAK. Representative immunofluorescence pictures (C) and Quantification (D) of the interaction between FAK and Orai3 (siCtl n = 341; siOrai3 n = 312; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Scale bar: 10  $\mu$ m.

We therefore studied a possible interaction of Orai3 with FAK using the co-immunoprecipitation and the PLA techniques. Indeed, interactions between ion channels and FAK leading to its activation have been reported [44]. We first showed that FAK and Orai3 form an interacting complex in MDA-231 and MDA-BrM2 cells (Figure S8B). To verify this interaction, we used the PLA technique. During this experiment, we assessed whether FAK and Orai3 could directly interact with each other. Our results showed that Orai3 and FAK are located very close to each other (<40 nm) and can possibly interact. We counted an average of  $33 \pm 4$  amplification puncta per cell in siCtl cells while we counted only  $7 \pm 1$  in siOrai3 MDA-231 cells (Figure 7C,D). Likewise, a similar result was obtained in the MDA-BrM2 cell line (siCtl:  $48 \pm 2$  puncta per cell; siOrai3:  $10 \pm 1$  puncta) (Figure S8C,D). FAK is pivotal in the formation of focal adhesions which in turn are necessary for cell migration and signaling leading to F-actin polymerization. We therefore also evaluated the expression of another major component of focal adhesions, the  $\beta 1$  integrin. Our results showed that  $\beta 1$  integrin expression following transfection with siOrai3 decreased by  $32 \pm 2.1\%$  in MDA-231 cells and by  $29 \pm 4.3\%$  in MDA-BrM2 cells (Figure S8F,G).

#### 4. Discussion

Ca<sup>2+</sup> channels, in particular Orai channels, have important roles in regulating biological processes [45,46]. The dysregulation of their expression and/or activity is involved in the control of different traits of breast cancer behavior such as proliferation, apoptosis and resistance to chemotherapy [23–25,47]. Here, we focused on studying the role of the Orai3 channel in the cell migration mechanisms of the most aggressive type of breast cancer.

The key findings of our study are: (i) Orai3 regulates basal-like breast cancer cell migration via a modulation of adhesive capacities. This likely occurs through a regulation of the basal Ca<sup>2+</sup> entry and intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. (ii) Orai3 regulates cell morphology and polymerization of F-actin filaments by interacting with FAK.

Orai3 has mainly been studied in ER<sup>+</sup> breast cancer cell lines where it participates in the SOCE [23]. However, very few studies have been conducted to understand the role of Orai3 in the basal-like ER<sup>−</sup> type breast cancer cell lines. Motiani et al. showed in 2010 that Orai1 (and not Orai3) is one of the major components in the regulation of SOCE in the MDA-231 line [48]. Recently, Monteith's team made it clear that Orai3 does not constitute a SOC in the ER<sup>−</sup> breast cancer cell line MDA-MB-468. In this work, we confirm that Orai3 is not involved in SOCE [49] in ER<sup>−</sup> breast cancer cell lines MDA-231 and MDA-BrM2. We show for the first time that this channel participates in the basal entry of Ca<sup>2+</sup> into these two ER<sup>−</sup> cell models. Besides, we show that Orai3-mediated Ca<sup>2+</sup> entry participates in the regulation of the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration.

Here, we demonstrated the involvement of Orai3 in the regulation of the migration of MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines. Orai3 silencing decreases cell migration by approximately 50% in these cells. This effect is not linked to an impaired viability of the cells. Our results suggest a specific effect of Orai3 depending on the ER status of breast cancer cells. In ER<sup>+</sup> luminal breast cancer cells this channel regulates proliferation and survival [23,24], whereas in ER<sup>−</sup> basal-like breast cancer cells Orai3 rather regulates migration without affecting cell proliferation and/or survival.

The involvement of Orai3 in the migration of MDA-231 and MDA-BrM2 cells requires both the channel protein and the channel function. The fact that migration and adhesion of siOrai3 cells cultured in normal Ca<sup>2+</sup> medium is not different from that of cells cultured in low Ca<sup>2+</sup> medium suggests the involvement of a common pathway of Orai3 and Ca<sup>2+</sup> in the regulation of these two cellular processes. Cell migration is a dynamic process requiring an interaction between the cell and the extracellular matrix through focal adhesions [50]. The remodeling of the latter is essential for cell migration. In this context the process of deadhesion is as essential as cell adhesion [51]. In the late 1990s a family of proteins, calpains, were reported to have a significant role in cell migration and adhesion [52–54]. Here, we found that Orai3, by its channel function, drives cell migration and adhesion processes by modulating calpain activity. Interestingly, similarly to our results, it has been shown in MDA-MB-435S (an ER<sup>−</sup> breast cancer cell line) that stores independent Ca<sup>2+</sup> entry through Orai1, in association with potassium channel SK3 (K<sub>Ca</sub>2.3), tunes calpain activation to steer cell migration [55,56]. Here we bring a new aspect of how Orai channels regulate cell migration. Orai1 supports cell migration of MDA-231 cells by mediating SOCE [22], while Orai3 drives cell migration via its basal activity and a modulation of calpain activity. However, further studies are needed for understanding molecular pathways involved in Orai3-mediated calpain activation.

During cell migration actin holds a special place. Actin, in the form of stress fibers, provides most of the mechanical forces involved in cell migration [57]. Cell migration necessitates actin remodeling [58]. Here we show a modification of the F-actin cytoskeleton when Orai3 is downregulated. In fact, the F-actin polymerization is altered in the absence of Orai3. This disorganization is the basis for the rounded morphology of the MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with siOrai3. To our surprise, the morphological changes of siOrai3 cells, in particular of MDA-231 cells, is independent of the ambient Ca<sup>2+</sup> concentration. Regarding the MDA-BrM2 cell line, we also reported a slight regulation of the architecture of the actin cytoskeleton by Ca<sup>2+</sup> as was reported by Pardo-Pastor et al. [41].

They showed that the PIEZO2-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry facilitates the architecture of the actin cytoskeleton.

F-actin polymerization is regulated by many factors including FAK [59]. FAK is a tyrosine kinase controlling various cellular processes including cell migration as well as the formation and remodeling of focal adhesions [60] and promoting actin dynamics [42,43]. We found that siOrai3 decreases total FAK expression by 32% in MDA-231 and 35% in MDA-BrM2 cells without any change in the amount of phosphorylated FAK.

Consistent with our results, several studies have reported the pivotal role of FAK in actin polymerization [61–63]. Also, FAK requires phosphorylation to mediate actin remodeling [64]. Since we found no Orai3-dependent changes in FAK phosphorylation, we suggest that Orai3 may interact with FAK and regulate its expression in order to support FAK turnover, and thus initiate signaling that leads to F-actin polymerization. Such an interaction between FAK and ion channels, particularly potassium channels, has already been reported [44,65]. Clearly, further studies are needed regarding the mechanisms of interaction between Orai3 and FAK.

In conclusion, we show that Orai3 mediates basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry in basal-like breast cancer cells. Orai3 regulates breast cancer cell migration through two mechanisms: (i) through a regulation of calpain activity and cell adhesion by regulating intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, and (ii) via the remodeling of actin cytoskeleton architecture by regulating FAK expression, probably through a  $\text{Ca}^{2+}$ -independent mechanism.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells10123487/s1>. Table S1: siRNA sequences. Table S2: Primers sequences. Table S3: Primary antibodies, dilution and manufacturer. Figure S1: A. Quantification of Orai3 expression evaluated by Western blot represented in Figure 1A (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). B. Orai3 expression evaluated by qPCR 72 h after transfection with siOrai3 in MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). C–E. Orai1, STIM1 and STIM2 expression in MDA-231 (C,D) and MDA-BrM2 (C,E) cell lines evaluated by Western blot 72 h after transfection with siOrai3 (N = 3; NS Non Significant). F,G. Orai1, Orai2, STIM1 and STIM2 expression in MDA-231 (F) and MDA-BrM2 (G) cell lines evaluated by qPCR 72h after transfection with siOrai3 (N = 3; NS Non Significant). Figure S2: A,B. Cell proliferation assay, using MTT-based assay, in MDA-231 (A) and MDA-BrM2 (B) cells transfected with siOrai3 (N = 3; NS Non Significant). C. Cell viability assay, using MTT-based assay, in MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with siOrai3 (I) (N = 3; NS Non-Significant). D. Cell directionality of MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines transfected with siCtrl or siOrai3 (MDA-231 siCtrl n = 49; MDA-231 siOrai3 n = 43; MDA-BrM2 siCtrl n = 39; MDA-BrM2 siOrai3 n = 42; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). E. Quantification of Orai3 overexpression evaluated by Western blot and represented in Figure 1F (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). F. Orai3 overexpression in MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines evaluated by qPCR 72h after transfection with ORAI3 (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). G. Cell viability assay, using MTT-based assay, in MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with ORAI3 (N = 3; NS Non-Significant). Figure S3: A–C. Traces (A,B) and quantification (C) of SOCE measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (A,C) and MDA-BrM2 (B,C) cell lines transfected with siCtrl or siOrai3 (MDA-231 siCtrl n = 198; MDA-231 siOrai3 n = 156; MDA-BrM2 siCtrl n = 134; MDA-BrM2 siOrai3 n = 142; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). D/E/F. Traces (D,E) and quantification (F) of basal  $\text{Ca}^{2+}$  entry measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (D,F) and MDA-BrM2 (E,F) cell lines transfected with siCtrl or siOrai1 (MDA-231 siCtrl n = 90; MDA-231 siOrai3 n = 88; MDA-BrM2 siCtrl n = 94; MDA-BrM2 siOrai3 n = 89; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Figure S4: A. Migration assay using Boyden chambers with MDA-BrM2 cells transfected with siOrai3 in the presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (A) (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). B,C. Cell viability assay, using MTT-based assay, in MDA-231 (B) and MDA-BrM2 (C) cells transfected with siOrai3 (N = 3; NS Non-Significant). D. Orai1 expression evaluated by Western blot 72 h after stable transfection with shOrai1 in MDA-231 shCtrl and shOrai1 cells (N = 3). E. Cell adhesion assay using MTT-based technique in MDA-BrM2 cell lines (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). F. MTT-based cell adhesion assay of MDA-BrM2 cell line transfected with siOrai3 in presence or absence of  $\text{Ca}^{2+}$  (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). G. MTT-based cell adhesion assay of MDA-BrM2 cell line transfected with ORAI3 (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Figure S5: A,B. Representative fluorescence pictures (A) and quantification (B) of calpain substrate CMAC, t-BOC-Leu-Met in MDA-BrM2 cell line (siCtrl n = 200; siOrai3 n = 197; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). C/D.

Measurement of adhesion forces by means of single cell force spectroscopy in MDA-231 (C) and MDA-BrM2 (D) cell lines (MDA-231 siCtl n = 7; MDA-231 siOrai3 n = 7; MDA-BrM2 siCtl n = 7; MDA-BrM2 siOrai3 n = 7; N = 3; NS Non-Significant). Figure S6: A,B. Representative images (A) and summary of the circularity index (B) of MDA-BrM2 morphology (siCtl n = 312; siOrai3 n = 299; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). C. Fluorescent rhodamine phalloidin staining showing the actin architecture of siCtl and siOrai3 MDA-BrM2 cells (N = 3) (Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ). D,E. Representative images and summary of the circularity index of MDA-231 (D) and MDA-BrM2 (E) morphology transfected with CTL or ORAI3 (MDA-231 CTL n = 211; MDA-231 ORAI3 n = 228; MDA-BrM2 CTL n = 231; MDA-231 ORAI3 n = 237; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). Figure S7: A,B. Representative pictures (A) and summary of the circularity index (B) of MDA-BrM2 morphology (siCtl 1.8 mM n = 254; siOrai3 1.8 mM n = 257; siCtl 0.2 mM n = 199; siOrai3 0.2 mM n = 231; N = 3; \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). C. Fluorescent rhodamine phalloidin staining showing the actin architecture of siCtl and siOrai3 MDA-BrM2 cells cultivated in 1.8 mM or 0.2  $\text{Ca}^{2+}$  medium (N = 3) (Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ ). Figure S8: A. Representative Western blot and quantification of FAK expression and FAK phosphorylation in MDA-BrM2 cells transfected with siCtl or siOrai3 (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). B. Representative Western blot of Orai3 and FAK expression after immunoprecipitation using anti-FAK antibody (N = 3; IP Immunoprecipitation). C,D. Representative fluorescence images (C) and quantification (D) of the interaction between FAK and Orai3, evaluated by PLA, in MDA-BrM2 cells (siCtl n = 401; siOrai3 n = 292; N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). E. Representative Western blot and quantification of FAK expression and FAK phosphorylation in MDA-BrM2 cells transfected with CTL or ORAI3 (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ). F/G. Representative Western blot and quantification of  $\beta 1$  integrin expression in MDA-231 (F) and MDA-BrM2 (G) cells transfected with siCtl or siOrai3 (N = 3; \*\*\*  $p < 0.001$ ; NS Non-Significant). Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

**Author Contributions:** M.C., S.K., L.R.-D., A.S. and H.O.-A. designed the study. M.C. and S.K. performed and analyzed the in vitro experiments. M.C. and H.O.-A. wrote the manuscript. M.C., S.K., L.R.-D., L.M.T., Z.P., A.S. and H.O.-A. approved the final draft of the manuscript. A.S. and H.O.-A. supervised the study. M.C., A.S. and H.O.-A. provided the funding for the project. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** M.C. is grateful for the funding from the “Ministère français de l’Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l’Innovation”, and the “Cancéropôle Nord-Ouest” and the “Université de Picardie Jules Verne”. A.S. and L.M.T. are supported by the Research Training Group Chembion (Deutsche Forschungsgemeinschaft GRK 2515/1). This work was supported by the “Université de Picardie Jules Verne”, the “Région Hauts-de-France”, the “Ligue contre le cancer”, and the “Cancéropôle Nord-Ouest”.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The study did not report any data.

**Acknowledgments:** We acknowledge Joan Massagué for kindly providing MDA-MB-231 BrM2 cell line. We deeply thank Guillaume Collin and Hamid Morjani for kindly offering MDA-MB-231 shCtl and MDA-MB-231 shOrai1 cell lines. We are also grateful to Stéphanie Guénin from the “Centre de ressources régionales en biologie moléculaire” of the University of Picardie Jules Verne for the technical support and the equipment availability.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived with Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 1749–1768. [[CrossRef](#)]
2. Chaffer, C.L.; Weinberg, R.A. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **2011**, *331*, 1559–1564. [[CrossRef](#)]
3. Gupta, G.P.; Massague, J. Cancer metastasis: Building a framework. *Cell* **2006**, *127*, 679–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Peart, O. Metastatic Breast Cancer. *Radiol. Technol.* **2017**, *88*, 519M–539M. [[PubMed](#)]
5. Seyfried, T.N.; Huysentruyt, L.C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, *18*, 43–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Horwitz, R.; Webb, D. Cell migration. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, R756–R759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Yamaguchi, H.; Wyckoff, J.; Condeelis, J. Cell migration in tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2005**, *17*, 559–564. [[CrossRef](#)]

8. Ciobanasu, C.; Faivre, B.; Le Clainche, C. Actin dynamics associated with focal adhesions. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 941292. [[CrossRef](#)]
9. Lebart, M.C.; Benyamin, Y. Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes. *FEBS J.* **2006**, *273*, 3415–3426. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Janiszewska, M.; Primi, M.C.; Izzard, T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J. Biol. Chem.* **2020**, *295*, 2495–2505. [[CrossRef](#)]
11. Leloup, L.; Wells, A. Calpains as potential anti-cancer targets. *Expert Opin. Ther. Targets* **2011**, *15*, 309–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zuidema, A.; Wang, W.; Sonnenberg, A. Crosstalk between Cell Adhesion Complexes in Regulation of Mechanotransduction. *Bioessays* **2020**, *42*, e2000119. [[CrossRef](#)]
13. Deliot, N.; Constantin, B. Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 2512–2522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hammad, A.S.; Machaca, K. Store Operated Calcium Entry in Cell Migration and Cancer Metastasis. *Cells* **2021**, *10*, 1246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Pratt, S.J.P.; Hernandez-Ochoa, E.; Martin, S.S. Calcium signaling: Breast cancer's approach to manipulation of cellular circuitry. *Biophys. Rev.* **2020**, *12*, 1343–1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tsai, F.C.; Kuo, G.H.; Chang, S.W.; Tsai, P.J. Ca<sup>2+</sup> signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 409245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Feske, S.; Gwack, Y.; Prakriya, M.; Srikanth, S.; Puppel, S.-H.; Tanasa, B.; Hogan, P.G.; Lewis, R.S.; Daly, M.; Rao, A. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **2006**, *441*, 179–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hou, X.; Burstein, S.R.; Long, S.B. Structures reveal opening of the store-operated calcium channel Orai. *eLife* **2018**, *7*, e36758. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Liu, X.; Wu, G.; Yu, Y.; Chen, X.; Ji, R.; Lu, J.; Li, X.; Zhang, X.; Yang, X.; Shen, Y. Molecular understanding of calcium permeation through the open Orai channel. *PLoS Biol.* **2019**, *17*, e3000096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Trebak, M.; Putney, J.W., Jr. ORAI Calcium Channels. *Physiology* **2017**, *32*, 332–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Hammadi, M.; Chopin, V.; Matifat, F.; Dhennin-Duthille, I.; Chasseraud, M.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Human ether a-gogo K<sup>+</sup> channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry. *J. Cell. Physiol.* **2012**, *227*, 3837–3846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yang, S.; Zhang, J.J.; Huang, X.Y. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **2009**, *15*, 124–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Faouzi, M.; Hague, F.; Potier, M.; Ahidouch, A.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 542–551. [[CrossRef](#)]
24. Faouzi, M.; Kischel, P.; Hague, F.; Ahidouch, A.; Benzerdjeb, N.; Sevestre, H.; Penner, R.; Ouadid-Ahidouch, H. ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1833*, 752–760. [[CrossRef](#)]
25. Hasna, J.; Hague, F.; Despoix, L.; Geerts, D.; Leroy, C.; Tulasne, D.; Ouadid-Ahidouch, H.; Kischel, P. Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: The p53 connection. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 693–707. [[CrossRef](#)]
26. Motiani, R.K.; Zhang, X.; Harmon, K.E.; Keller, R.S.; Matrougui, K.; Bennett, J.A.; Trebak, M. Orai3 is an estrogen receptor  $\alpha$ -regulated Ca<sup>2+</sup> channel that promotes tumorigenesis. *FASEB J.* **2013**, *27*, 63–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Bos, P.D.; Zhang, X.H.F.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R.R.; Nguyen, D.X.; Minn, A.J.; van de Vijver, M.J.; Gerald, W.L.; Foekens, J.A.; et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* **2009**, *459*, 1005–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Badaoui, M.; Mimsy-Julienne, C.; Saby, C.; VAN Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 24653–24671. [[CrossRef](#)]
29. Radoslavova, S.; Folcher, A.; Lefebvre, T.; Kondratska, K.; Guénin, S.; Dhennin-Duthille, I.; Gautier, M.; Prevarskaya, N.; Ouadid-Ahidouch, H. Orai1 Channel Regulates Human-Activated Pancreatic Stellate Cell Proliferation and TGF $\beta$ 1 Secretion through the AKT Signaling Pathway. *Cancers* **2021**, *13*, 2395. [[CrossRef](#)]
30. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dieterich, P.; Klages, R.; Preuss, R.; Schwab, A. Anomalous dynamics of cell migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 459–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Rosser, B.G.; Powers, S.P.; Gores, G.J. Calpain activity increases in hepatocytes following addition of ATP. Demonstration by a novel fluorescent approach. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 23593–23600. [[CrossRef](#)]
33. Schindl, R.; Bergsmann, J.; Frischauf, I.; Derler, I.; Fahrner, M.; Muik, M.; Fritsch, R.; Groschner, K.; Romanin, C. 2-aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20261–20267. [[CrossRef](#)]
34. Zhang, X.; Xin, P.; Yoast, R.E.; Emrich, S.M.; Johnson, M.T.; Pathak, T.; Benson, J.C.; Azimi, I.; Gill, D.L.; Monteith, G.R.; et al. Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels. *Cell Calcium* **2020**, *91*, 102281. [[CrossRef](#)]

35. De Pascalis, C.; Etienne-Manneville, S. Single and collective cell migration: The mechanics of adhesions. *Mol. Biol. Cell* **2017**, *28*, 1833–1846. [[CrossRef](#)]
36. Huttenlocher, A.; Sandborg, R.R.; Horwitz, A.F. Adhesion in cell migration. *Current opinion in cell biology* **1995**, *7*, 697–706. [[CrossRef](#)]
37. Franco, S.J.; Huttenlocher, A. Regulating cell migration: Calpains make the cut. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3829–3838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Wells, A.; Huttenlocher, A.; Lauffenburger, D.A. Calpain proteases in cell adhesion and motility. *Int. Rev. Cytol.* **2005**, *245*, 1–16.
39. Kenny, P.A.; Lee, G.Y.; Myers, C.A.; Neve, R.M.; Semeiks, J.R.; Spellman, P.T.; Lorenz, K.; Lee, E.H.; Barcellos-Hoff, M.H.; Petersen, O.W.; et al. The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression. *Mol. Oncol.* **2007**, *1*, 84–96. [[CrossRef](#)]
40. Vautrin-Glabik, A.; Botia, B.; Kischel, P.; Ouadid-Ahidouch, H.; Rodat-Despoix, L. IP3R3 silencing induced actin cytoskeletal reorganization through ARHGAP18/RhoA/mDia1/FAK pathway in breast cancer cell lines. *Biochimica et biophysica acta. Mol. Cell Res.* **2018**, *1865*, 945–958.
41. Pardo-Pastor, C.; Rubio-Moscardo, F.; Vogel-González, M.; Serra, S.A.; Afthinos, A.; Mrkonjic, S.; Destaing, O.; Abenza, J.F.; Fernández-Fernández, J.M.; Trepát, X.; et al. Piezo2 channel regulates RhoA and actin cytoskeleton to promote cell mechanobiological responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 1925–1930. [[CrossRef](#)]
42. Sieg, D.J.; Hauck, C.R.; Schlaepfer, D.D. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 2677–2691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Westhoff, M.A.; Serrels, B.; Fincham, V.J.; Frame, M.C.; Carragher, N.O. SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 8113–8133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Wei, J.F.; Wei, L.; Zhou, X.; Lu, Z.-Y.; Francis, K.; Hu, X.-Y.; Liu, Y.; Xiong, W.-C.; Zhang, X.; Banik, N.L.; et al. Formation of Kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *217*, 544–557. [[CrossRef](#)]
45. Chalmers, S.B.; Monteith, G.R. ORAI channels and cancer. *Cell Calcium* **2018**, *74*, 160–167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sallinger, M.; Berlansky, S.; Frischauf, I. Orai channels: Key players in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Curr. Opin. Physiol.* **2020**, *17*, 42–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Fiorio Pla, A.; Kondratska, K.; Prevarskaya, N. STIM and ORAI proteins: Crucial roles in hallmarks of cancer. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2016**, *310*, C509–C519. [[CrossRef](#)]
48. Motiani, R.K.; Abdullaev, I.F.; Trebak, M. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: Selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *The J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19173–19183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Azimi, I.; Milevskiy, M.J.G.; Chalmers, S.B.; Yapa, K.T.D.S.; Robitaille, M.; Henry, C.; Baillie, G.J.; Thompson, E.W.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. 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* **2019**, *11*, 208. [[CrossRef](#)]
50. Maziveyi, M.; Alahari, S.K. Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue. *Oncotarget* **2017**, *8*, 48471–48487. [[CrossRef](#)]
51. Greenwood, J.A.; Murphy-Ullrich, J.E. Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility. *Microsc. Res. Tech.* **1998**, *43*, 420–432. [[CrossRef](#)]
52. Croce, K.; Flaumenhaft, R.; Rivers, M.; Furie, B.; Furie, B.C.; Herman, I.M.; Potter, D.A. Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 36321–36327. [[CrossRef](#)]
53. Huttenlocher, A.; Palecek, S.P.; Lu, Q.; Zhang, W.; Mellgren, R.L.; Lauffenburger, D.A.; Ginsberg, M.H.; Horwitz, A.F. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32719–32722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Potter, D.A.; Tirnauer, J.S.; Janssen, R.; Croall, D.E.; Hughes, C.N.; Fiacco, K.A.; Mier, J.W.; Maki, M.; Herman, I.M. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J. Cell Biol.* **1998**, *141*, 647–662. [[CrossRef](#)]
55. Chantome, A.; Potier-Cartereau, M.; Clarysse, L.; Fromont, G.; Lambot, S.M.; Guéguinou, M.; Pages, J.-C.; Collin, C.; Oullier, T.; Girault, A.; et al. Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4852–4861. [[CrossRef](#)]
56. Gueguinou, M.; Crottès, D.; Chantôme, A.; Rapetti-Mauss, R.; Potier-Cartereau, M.; Clarysse, L.; Girault, A.; Fourbon, Y.; Jézéquel, P.; Guérin-Charbonnel, C.; et al. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Oncogene* **2017**, *36*, 3640–3647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Burridge, K.; Guilluy, C. Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension. *Exp. Cell Res.* **2016**, *343*, 14–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ridley, A.J. Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *36*, 103–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 56–68. [[CrossRef](#)]
60. Zaidel-Bar, R.; Ballestrem, C.; Kam, Z.; Geiger, B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4605–4613. [[CrossRef](#)]

61. Roa-Espitia, A.L.; Hernández-Rendón, E.R.; Baltiérrez-Hoyos, R.; Muñoz-Gotera, R.J.; Cote-Vélez, A.; Jiménez, I.; González-Márquez, H.; Hernández-González, E.O. Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation. *Biol. Open* **2016**, *5*, 1189–1199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Salgado-Lucio, M.L.; Ramírez-Ramírez, D.; Jorge-Cruz, C.Y.; Roa-Espitia, A.L.; Hernández-González, E.O. FAK regulates actin polymerization during sperm capacitation via the ERK2/GEF-H1/RhoA signaling pathway. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs239186. [[CrossRef](#)]
63. Serrels, B.; Serrels, A.; Brunton, V.G.; Holt, M.; McLean, G.W.; Gray, C.H.; Jones, G.E.; Frame, M.C. Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 1046–1056. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Li, S.Y.; Mruk, D.D.; Cheng, C.Y. Focal adhesion kinase is a regulator of F-actin dynamics: New insights from studies in the testis. *Spermatogenesis* **2013**, *3*, e25385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Cherubini, A.; Hofmann, G.; Pillozzi, S.; Guasti, L.; Crociani, O.; Cilia, E.; Di Stefano, P.; Degani, S.; Balzi, S.; Olivotto, M.; et al. Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to  $\beta$ 1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 2972–2983. [[CrossRef](#)]

# Orai3 Calcium Channel Regulates Breast Cancer Cell Migration through Calcium-Dependent and -Independent Mechanisms

Mohamed Chamli <sup>1</sup>, Sana Kouba <sup>1</sup>, Lise Rodat-Despoix <sup>1</sup>, Luca Matteo Todesca <sup>2</sup>, Zoltán Pethő <sup>2</sup>, Albrecht Schwab <sup>2</sup> and Halima Ouadid-Ahidouch <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, UR UPJV 4667, University of Picardie Jules Verne, 33 rue Saint Leu, 80000 Amiens France; mohamedchamlali80@hotmail.fr (M.C.); sana.kouba@u-picardie.fr (S.K.); lise.despoix@u-picardie.fr (L.R.D.); halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr (H.O.A.)

<sup>2</sup> Institute of Physiology II, University of Münster, Robert-Koch-Str. 27b, 48149 Münster, Germany; todesca@uni-muenster.de (L.M.T.); pethoe@uni-muenster.de (Z.P.); aschwab@uni-muenster.de (A.S.)

\* Correspondence: halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr (H.O.A); Tel.: +33 322827646

## 1. Transient Transfections

Table S1. siRNA sequences.

siRNA	Sequence
<i>siCtl</i>	5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3' (Eurogentec)
<i>siOrai3</i>	5'-GGGUCAAGUUUGUGCCCAU-3' (Eurogentec)

## 2. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Table S2. Primers sequences.

Name	Forward primer	Reverse primer
<i>Orai1</i>	5'-AGGTGATGAGCCTCAACGAG-3'	5'-CTGATCATGAGCGCAAACAG-3'
<i>Orai2</i>	5'-TACCTGAGCAGGGCCAAG-3'	5'-GGTACTGGTACTGCGTCTCAA-3'
<i>Orai3</i>	5'-CCAAGCTCAAAGCTTCCAGCC-3'	5'-CAAAGAGGTGCACAGCCACCA-3'
<i>STIM1</i>	5'-CTTCAGCACAGTCCCTGTCA-3'	5'-TGTGGAGCTGCCTCAGTA-3'
<i>STIM2</i>	5'-AAACACAGCCATCTGCACAG-3'	5'-GGGAAGTGTCTTCCTTTGA-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGGGCCATCCACAGTCTTC-3'	5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTG-3'

## 3. Western Blot

Table S3. Primary antibodies, dilution and manufacturer.

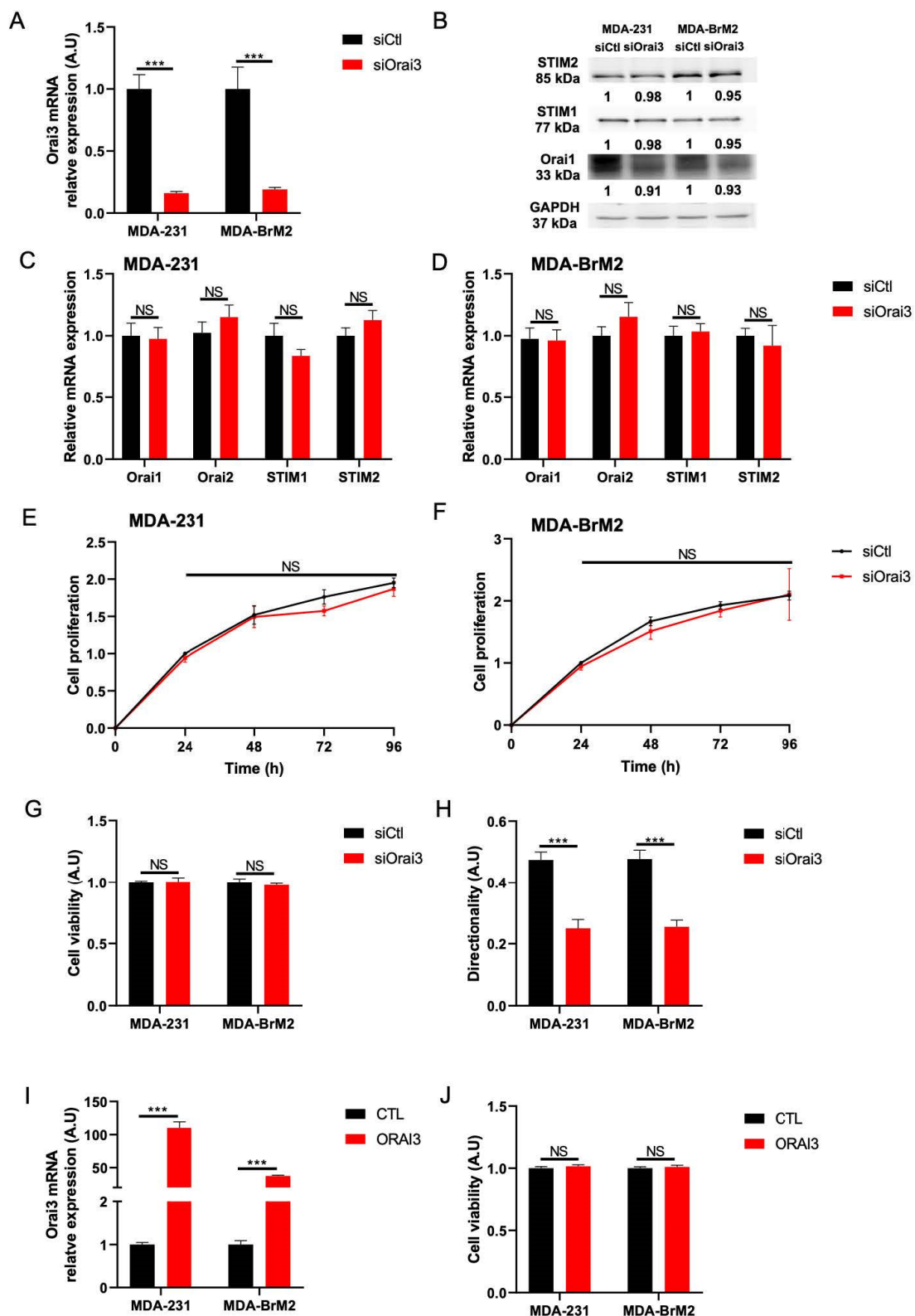
<i>Orai3</i>	1/1000	Abcam
<i>Orai1</i>	1/500	Sigma
<i>STIM1</i>	1/1000	Cell signalling
<i>STIM2</i>	1/1000	Abcam
<i>FAK</i>	1/1000	Cell Signalling
<i>Phospho-FAK<sup>Y397</sup></i>	1/1000	Cell Signalling
<i>GAPDH</i>	1/5000	Abcam

## 4. Single-Cell Force Spectroscopy

The absolute strength of breast cancer cell adhesion to a collagen I matrix was determined by means of single cell force spectroscopy using an atomic force microscope (AFM, CellHesion® 200 module, JPK, Berlin, Germany) as previously described [1]. Prior to all experiments, a tipless cantilever (ARROW-TL1, NanoWorld, Switzerland) was coated with 8 µL 1 mg/mL wheat germ agglutinin (WGA, Sigma) diluted in PBS for 20 min. MDA-

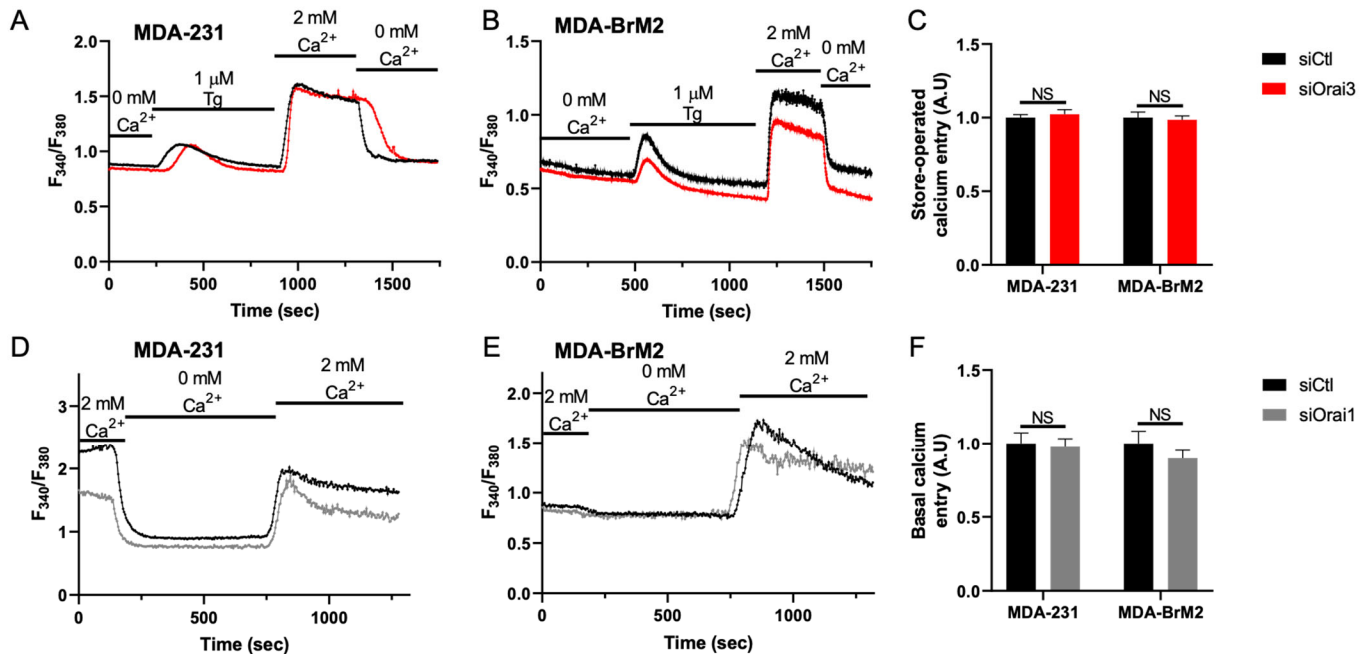


231 and MDA-BrM2 cells were detached with EDTA (0,02%)/trypsin solution and resuspended in a 15 mL Falcon tube on ice. 10  $\mu$ L of the cell suspension was then seeded into a 35 mm diameter glass bottom dish (Ibidi, Gräfelfing, Germany) containing 2 mL Ringer's solution (NaCl 122,5 mM, KCl 5,4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,8 mM, D-glucose 5,5 mM, pH 7,4). Half of the dish surface was coated with gelatin, the other half with collagen I. The cantilever was smoothly positioned under optical control above a spherical cell. A maximum loading force of <1 nN and 2 – 10s contact time were used to firmly attach the breast cancer cell to the front part of the WGA-coated cantilever which was then lifted. The procedure of the "cell picking" was highly standardized in order to minimize variations in cell geometry and adhesion forces between the coated cantilever and the picked cell. The following parameters were used during experiments: pulling length was set to 100  $\mu$ m to ensure a complete separation of the cells from the matrix; approach and retraction speed were set to 5  $\mu$ m/s. The cell attached to the cantilever was lowered onto the collagen I matrix under optical control with a maximal loading force of 1 nN. After 2s or 10s of contact, the cantilever was lifted and the force required for detaching was derived from the corresponding force-distance curve. Adhesion of each cell was measured 20 times. We performed  $n = 7$  independent experiments for every condition.

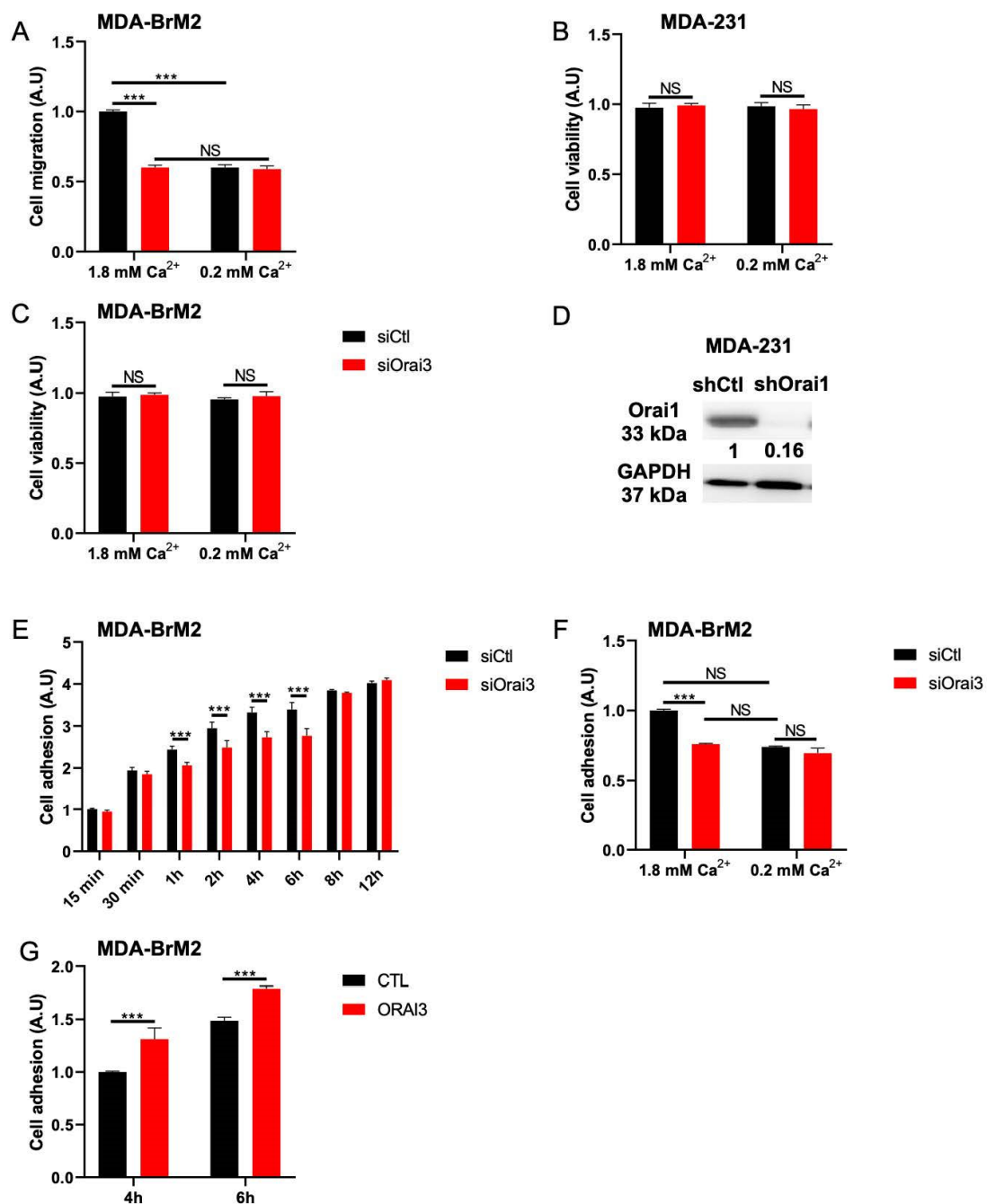


**Figure S1.** **A.** Orai3 expression evaluated by qPCR 72h after transfection with siOrai3 in MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines (N = 3; \*\*\* p < 0.001). **B.** Orai1, STIM1 and STIM2 expression in MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines evaluated by Western blot 72h after transfection with siOrai3 (N = 3). **C/D.** Orai1, Orai2, STIM1 and STIM2 expression in MDA-231 (C) and MDA-BrM2 (D) cell lines evaluated by qPCR 72h after transfection with siOrai3 (N = 3; NS Non Significant). **E/F.** Cell proliferation assay, using MTT-based assay, in MDA-231 (E) and MDA-BrM2 (F) cells transfected with siOrai3 (N = 3; NS Non Significant). **G.** Cell viability assay, using MTT-based assay, in MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with siOrai3 (I) or ORAI3 (J) (N = 3; NS Non Significant). **H.** Cell directionality of MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines transfected

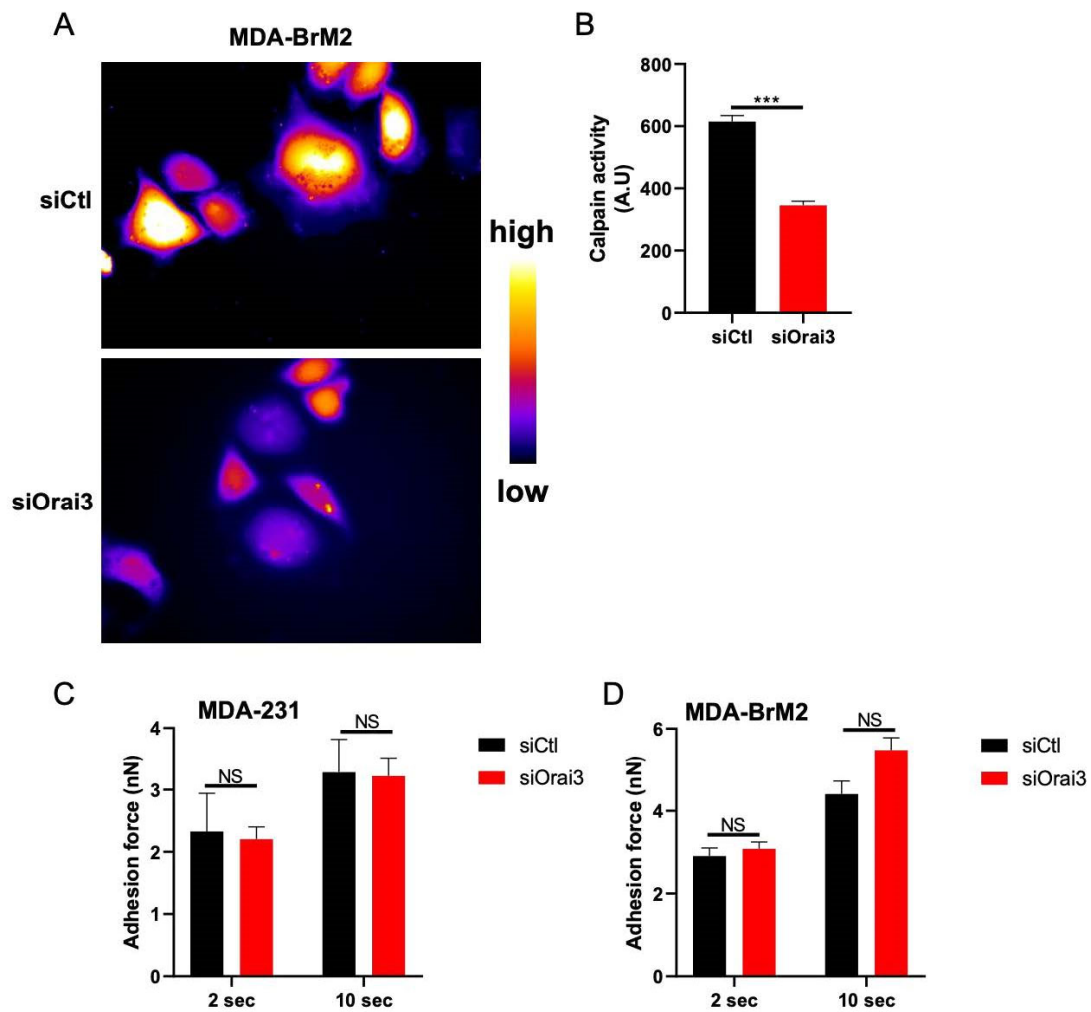
with siCtl or siOrai3 (MDA-231 siCtl n = 49; MDA-231 siOrai3 n = 43; MDA-BrM2 siCtl n = 39; MDA-BrM2 siOrai3 n = 42; N = 3; \*\*\* p < 0.001). I. Orai3 overexpression in MDA-231 and MDA-BrM2 cell lines evaluated by qPCR 72h after transfection with ORAI3 (N = 3; \*\*\* p < 0.001). J. Cell viability assay, using MTT-based assay, in MDA-231 and MDA-BrM2 cells transfected with ORAI3 (N = 3; NS Non Significant).



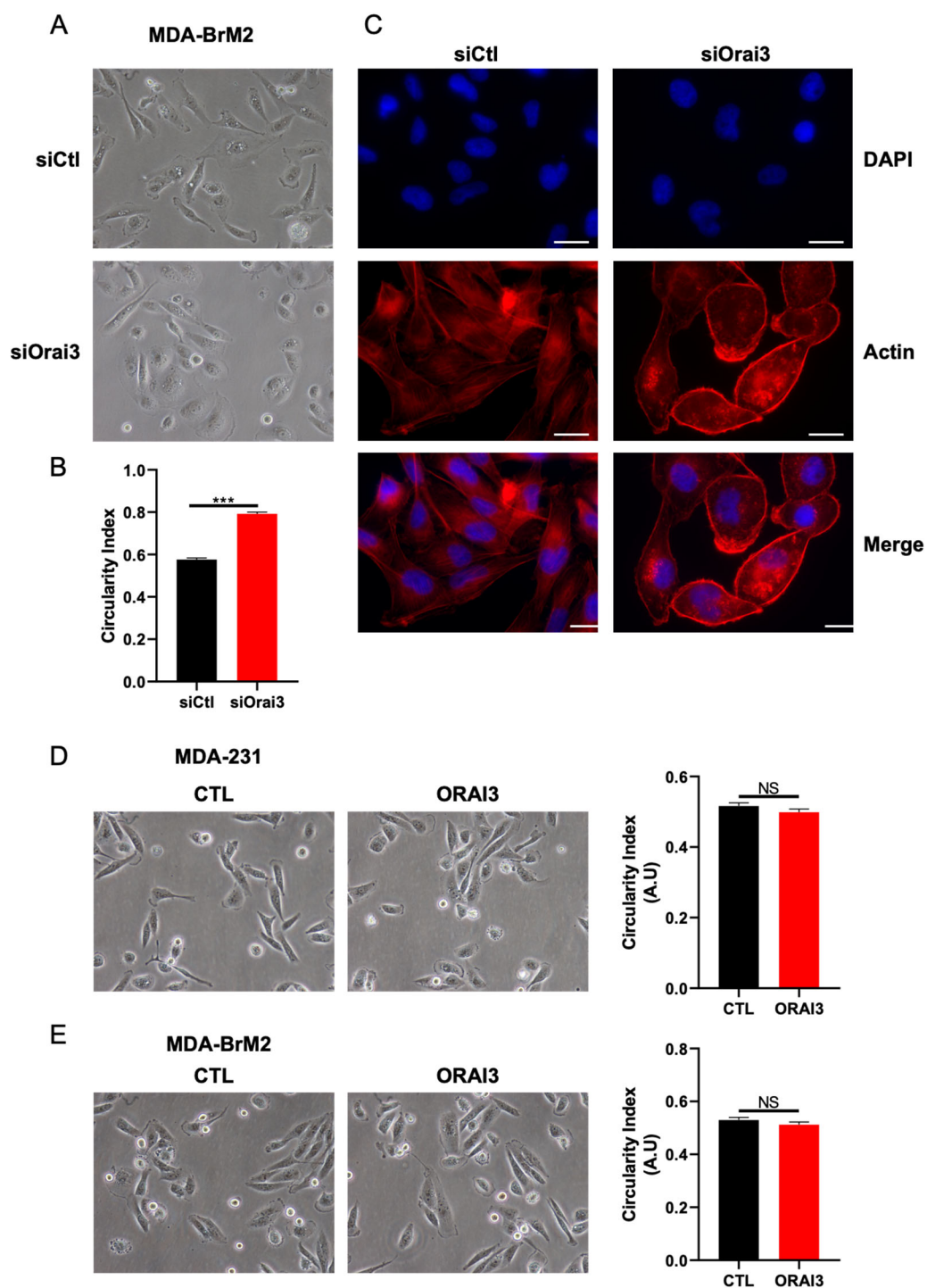
**Figure S2.** A/B/C. Traces (A/B) and quantification (C) of SOCE measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (A/C) and MDA-BrM2 (B/C) cell lines transfected with siCtl or siOrai3 (MDA-231 siCtl n = 198; MDA-231 siOrai3 n = 156; MDA-BrM2 siCtl n = 134; MDA-BrM2 siOrai3 n = 142; N = 3; \*\*\* p < 0.001). D/E/F. Traces (D/E) and quantification (F) of basal Ca<sup>2+</sup> entry measured by the calculation of the  $F_{340}/F_{380}$  in MDA-231 (D/F) and MDA-BrM2 (E/F) cell lines transfected with siCtl or siOrai1 (MDA-231 siCtl n = 90; MDA-231 siOrai3 n = 88; MDA-BrM2 siCtl n = 94; MDA-BrM2 siOrai3 n = 89; N = 3; \*\*\* p < 0.001).



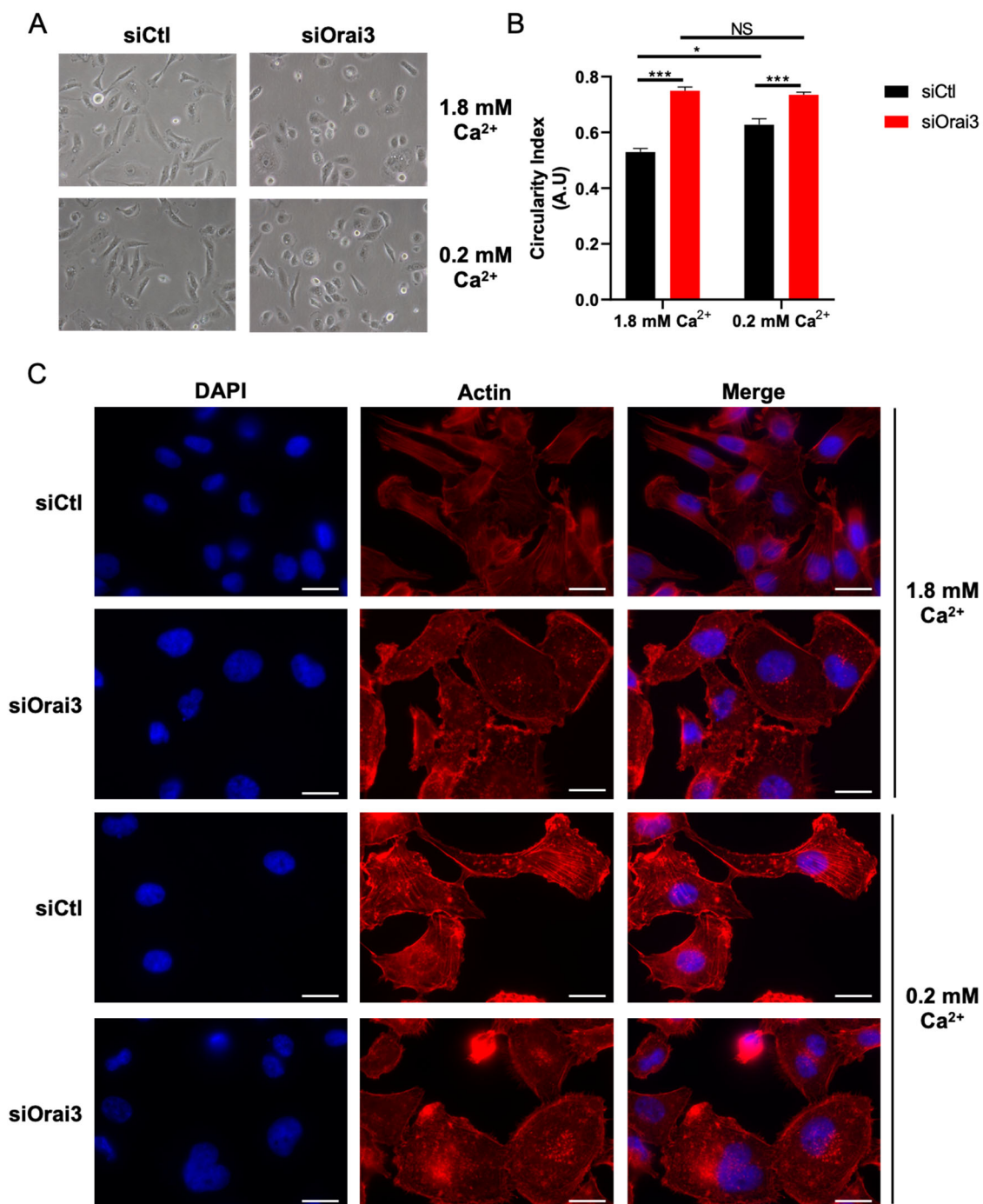
**Figure S3.** A. Migration assay using Boyden chambers with MDA-BrM2 cells transfected with siOrai3 in the presence or absence of Ca<sup>2+</sup> (A) (N = 3; \*\*\* p < 0.001; NS Non Significant). B/C. Cell viability assay, using MTT-based assay, in MDA-231 (B) and MDA-BrM2 (C) cells transfected with siOrai3 (N = 3; NS Non Significant). D. Orai1 expression evaluated by Western blot 72h after stable transfection with shOrai1 in MDA-231 shCtl and shOrai1 cells (N = 3). E. Cell adhesion assay using MTT-based technique in MDA-BrM2 cell lines (N = 3; \*\*\* p < 0.001). F. MTT-based cell adhesion assay of MDA-BrM2 cell line transfected with siOrai3 in presence or absence of Ca<sup>2+</sup> (N = 3; \*\*\* p < 0.001; NS Non Significant). G. MTT-based cell adhesion assay of MDA-BrM2 cell line transfected with ORAI3 (N = 3; \*\*\* p < 0.001).



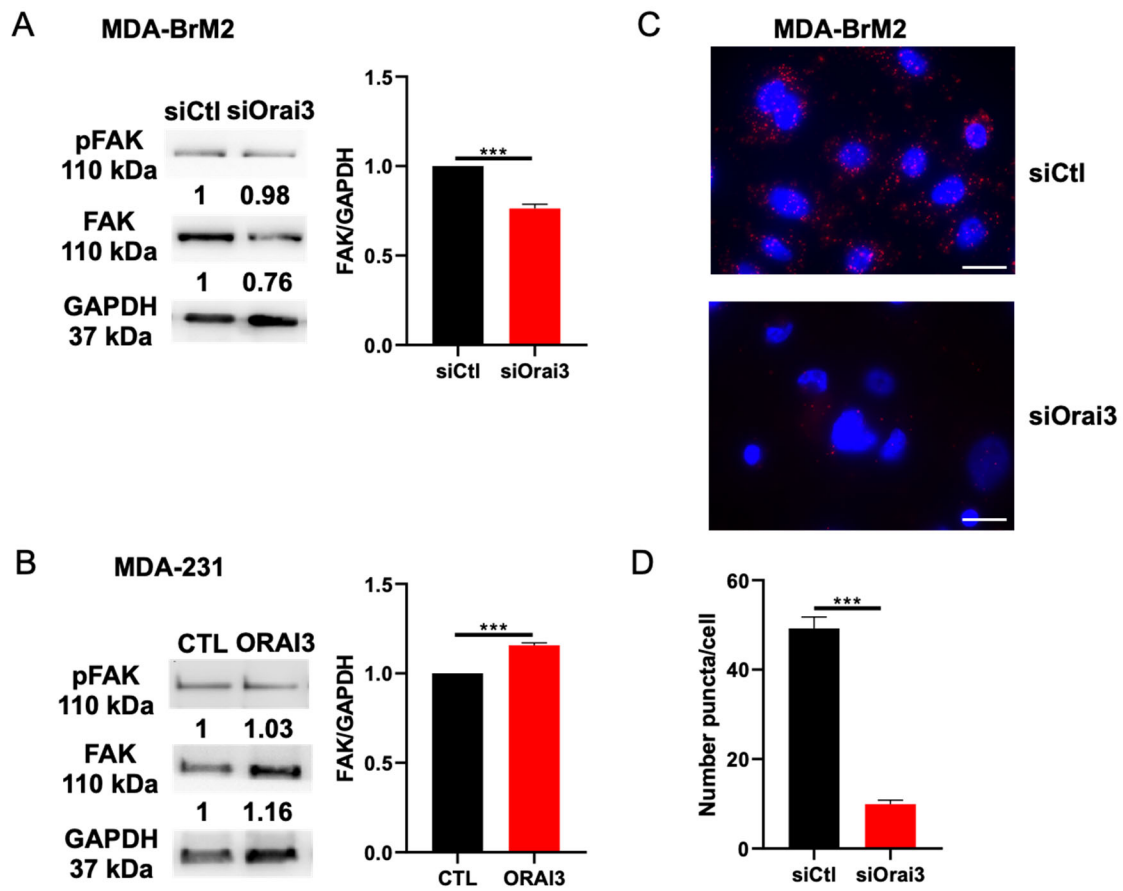
**Figure S4.** A/B. Representative fluorescence pictures (A) and quantification (B) of calpain substrate CMAC, t-BOC-Leu-Met in MDA-BrM2 cell line (siCtl n= 200; siOrai3 n= 197; N = 3; \*\*\* p < 0.001). C/D. Measurement of adhesion forces by means of single cell force spectroscopy in MDA-231 (C) and MDA-BrM2 (D) cell lines (MDA-231 siCtl n= 7; MDA-231 siOrai3 n= 7; MDA-BrM2 siCtl n = 7; MDA-BrM2 siOrai3 n = 7; N = 3; NS Non Significant).



**Figure S5.** A/B. Representative images (A) and summary of the circularity index (B) of MDA-BrM2 morphology (siCtl n= 312; siOrai3 n= 299; N = 3; \*\*\* p < 0.001). C. Fluorescent rhodamine phalloidin staining showing the actin architecture of siCtl and siOrai3 MDA-BrM2 cells (N = 3) (Scale bar: 10  $\mu$ m). D/E. Representative images and summary of the circularity index of MDA-231 (D) and MDA-BrM2 (E) morphology transfected with CTL or ORAI3 (MDA-231 CTL n= 211; MDA-231 ORAI3 n= 228; MDA-BrM2 CTL n= 231; MDA-231 ORAI3 n= 237; N = 3; \*\*\* p < 0.001).



**Figure S6.** A/B. Representative pictures (A) and summary of the circularity index (B) of MDA-BrM2 morphology (siCtl 1.8 mM n= 254; siOrai3 1.8 mM n= 257; siCtl 0.2 mM n= 199; siOrai3 0.2 mM n= 231; N = 3; \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001; NS Non Significant). C. Fluorescent rhodamine phalloidin staining showing the actin architecture of siCtl and siOrai3 MDA-BrM2 cells cultivated in 1.8 mM or 0.2 Ca<sup>2+</sup> medium (N = 3) (Scale bar: 10  $\mu$ m).



**Figure S7.** **A.** Representative Western blot and quantification of FAK expression and FAK phosphorylation in MDA-BrM2 cells transfected with siCtl or siOrai3 (N = 3; \*\*\* p < 0.001). **B.** Representative Western blot and quantification of FAK expression and FAK phosphorylation in MDA-BrM2 cells transfected with CTL or ORAI3 (N = 3; \*\*\* p < 0.001). **C/D.** Representative fluorescence images (C) and quantification (D) of the interaction between FAK and Orai3, evaluated by PLA, in MDA-BrM2 cells (siCtl n = 401; siOrai3 n = 292; N = 3; \*\*\* p < 0.001) (Scale bar: 10  $\mu$ m).

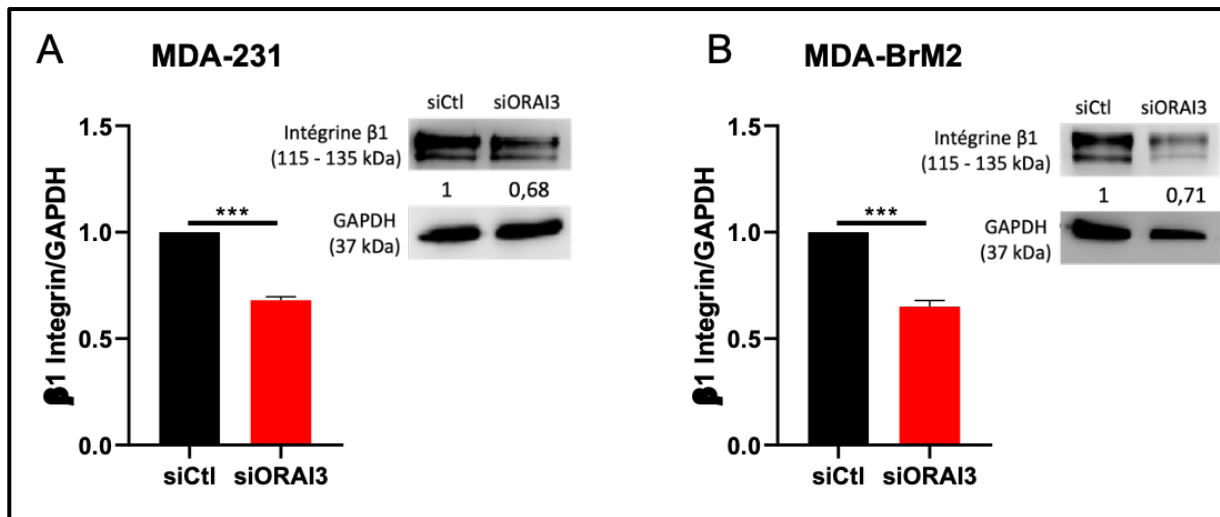
## References

1. Bulk, E., et al., *KCa3.1 channel inhibition leads to an ICAM-1 dependent increase of cell-cell adhesion between A549 lung cancer and HMEC-1 endothelial cells*. *Oncotarget*, 2017. 8(68): p. 112268-112282.



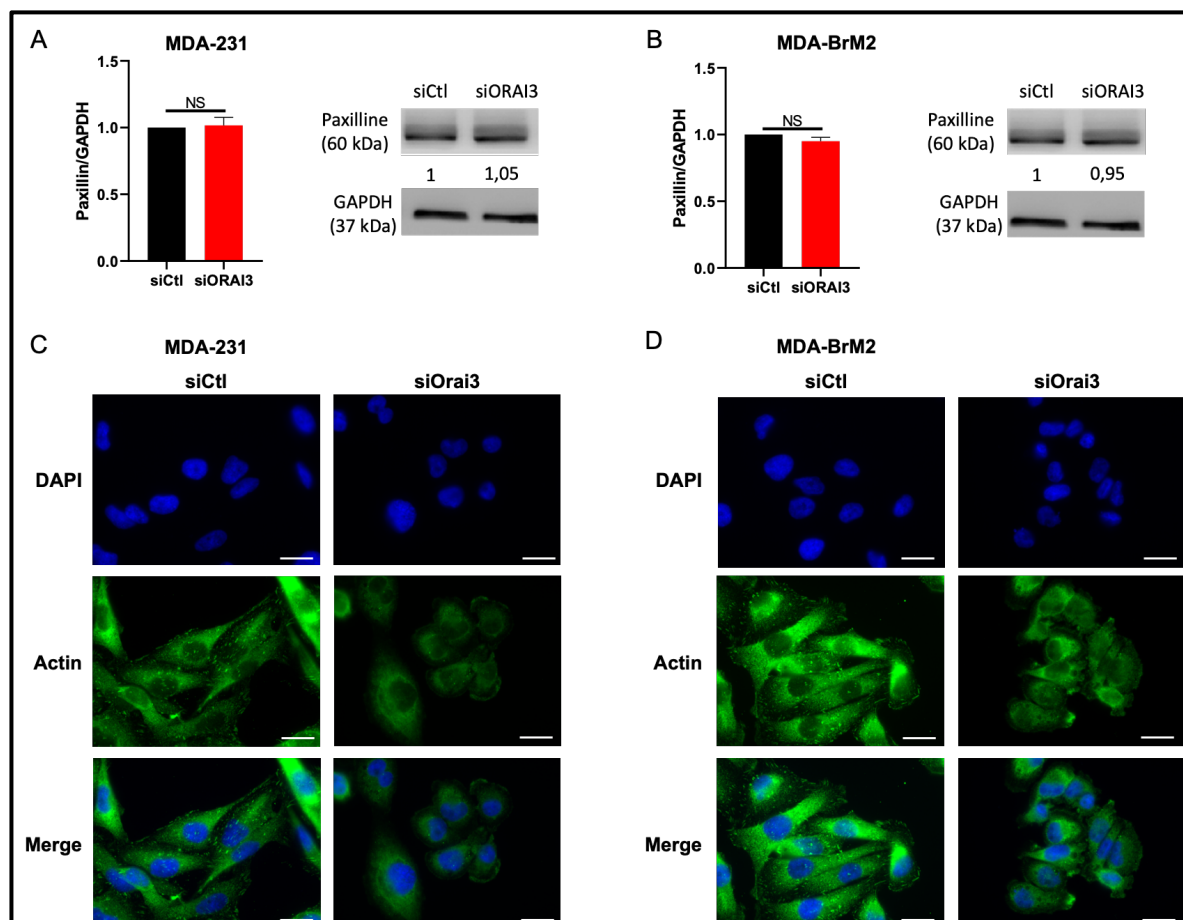
Résultats complémentaires : ORAI3 régule l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  et la localisation de la paxilline

Au cours de notre travail, nous avons démontré que la migration des cellules MDA-231 et MDA-BrM2 est en partie régit par les processus d'adhésion cellulaire. Ainsi, en plus de la calpaïne, nous avons cherché à comprendre si d'autres acteurs sont impliqués dans l'adhésion des cellules cancéreuses mammaires ER<sup>-</sup>. Nous nous sommes intéressés à l'intégrine  $\beta 1$  qui est connue pour permettre l'adhésion des cellules au substrat (Anderson *et al.* 2014). Par ailleurs, il a été démontré que l'expression des intégrines  $\beta 1$  est augmentée dans un contexte de cancer (Danen *et al.* 1994, Matsuoka *et al.* 2000, Lee *et al.* 2013). De plus, leur rôle dans les processus de migration et d'invasion est bien connu (Borrirukwanit *et al.* 2014, Cheng *et al.* 2015, Missan *et al.* 2015). Ainsi, nous avons donc évalué l'expression de cet acteur dans le cadre d'une invalidation fonctionnelle d'ORAI3 dans les cellules MDA-231 et MDA-BrM2. Nous avons ainsi montré par Western Blot que les cellules qui n'expriment pas le canal ORAI3 ont une diminution de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  de  $32 \pm 1,8 \%$  dans les cellules MDA-231 (**Figure 35A**) et de  $29 \pm 3,1 \%$  dans les cellules MDA-BrM2 (**Figure 35B**) par rapport à leur contrôle respectif.



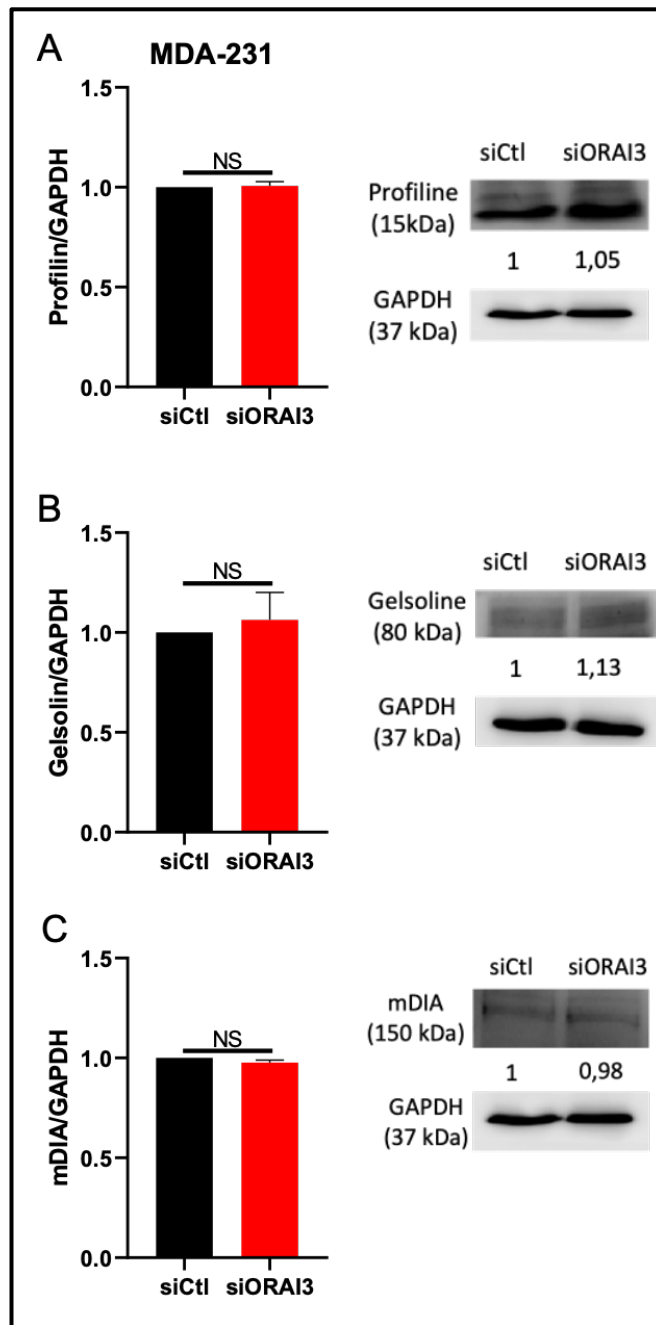
**Figure 35** : ORAI3 régule l'expression de l'intégrine  $\beta 1$ . **A**. Western blot et quantification de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  dans les cellules MDA-231 transfectées par siCtrl ou siORAI3. **B**. Western blot et quantification de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  dans les cellules MDA-BrM2 transfectées par siCtrl ou siORAI3. (N = 3 ; \*\*\* p < 0,001)

Par ailleurs, la paxilline, l'un des composants des complexes d'adhésion focaux, est une protéine critique dans les processus adhésifs et migratoires (Deramaut *et al.* 2014, Lopez-Colome *et al.* 2017). En effet, la paxilline est l'une des protéines majeures dans la transduction du signal initié par les intégrines (Mekhdjian *et al.* 2017, Soto-Ribeiro *et al.* 2019). Ainsi, nous avons mesuré l'expression de la paxilline dans les cellules MDA-231 et MDA-BrM2. Durant notre étude, nous avons montré que l'expression de la paxilline n'est aucunement impacté par la transfection de siORAI3 (**Figure 36A**, **Figure 36B**). En revanche, et de façon surprenante, nous avons, par immunofluorescence, découvert une différence quant à la localisation de la paxilline dans nos deux modèles cellulaires en fonction de l'expression d'ORAI3. En effet, les cellules siCtl (MDA-231 et MDA-BrM2) présentent un marquage typique de la paxilline, à savoir un marquage ponctiforme (membranaire) (**Figure 36C**, **Figure 36D**). Les cellules siORAI3, quant à elles, perdent ce type de marquage (**Figure 36C**, **Figure 36D**). De plus, il semble que les cellules siORAI3 arborent un marquage diffus et péri-nucléaire de la paxilline ouvrant ainsi la possibilité d'une régulation de la paxilline par ORAI3 à un niveau post-traductionnel.



**Figure 36 : ORAI3 module la localisation de la paxilline.** A/B. Western blot et quantification de l'expression de la paxilline dans les cellules MDA-231 (A) et MDA-BrM2 (B) transfectées par siCtl ou siORAI3. C/D. Immunomarquage fluorescent de la paxilline montrant le marquage ponctiforme dans les cellules siCtl et diffus dans les cellules siORAI3, dans les lignées MDA-231 (C) et MDA-BrM2 (D). (N = 3 ; NS Non Significatif)

Durant notre étude, nous avons également démontré l'implication d'ORAI3 dans les processus cellulaires architecturaux dans le cancer du sein ER<sup>+</sup>. En effet, nous avons rapporté que ORAI3, par son expression et non son activité, régule l'architecture actinique *via* une interaction avec la protéine FAK. Pour aller plus loin, nous avons également étudié une potentielle régulation par ORAI3 de partenaires d'interaction de l'actine tels que : la profiline et la gelsoline, connues pour être responsables de la dépolymérisation de l'actine (Southwick 2000, Krishnan et Moens 2009). Ainsi, nous avons montré dans la lignée MDA-231 que l'expression de ces deux protéines n'est pas régulée par ORAI3 (**Figure 37A**, **Figure 37B**). Par ailleurs, afin de préciser le rôle d'ORAI3 dans le maintien de l'architecture des filaments d'actine F, nous avons également étudié l'expression de la protéine mDIA. mDIA est une protéine effectrice de la voie de signalisation des Rho GTPases. De plus, elle est connue pour participer dans la polymérisation des fibres de stress composées d'actine F. Nous avons montré que l'expression de mDIA ne varie pas entre les conditions siCtl et siORAI3 (**Figure 37C**) suggérant ainsi que la régulation, par ORAI3, des filaments d'actine F dans les cellules MDA-231 est sous-jacente à l'interaction ORAI3-FAK.

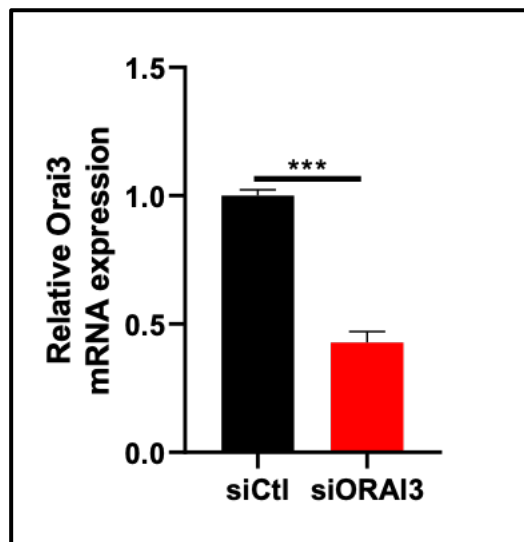


**Figure 37 : ORAI3 ne module pas l'expression de la profiline, gelsoline et mDIA. A.** Western blot et quantification de l'expression de la profiline dans les cellules MDA-231 transfectées par siCtl ou siORAI3. **B.** Western blot et quantification de l'expression de la gelsoline dans les cellules MDA-231 transfectées par siCtl ou siORAI3. **C.** Western blot et quantification de l'expression de mDIA dans les cellules MDA-231 transfectées par siCtl ou siORAI3. (N = 3 ; NS Non Significatif)

## PARTIE 2 : ORAI3 MODULE LA PROLIFERATION, MAIS PAS LA MIGRATION, DES CELLULES CANCEREUSES MAMMAIRES LUMINALES ER<sup>+</sup>.

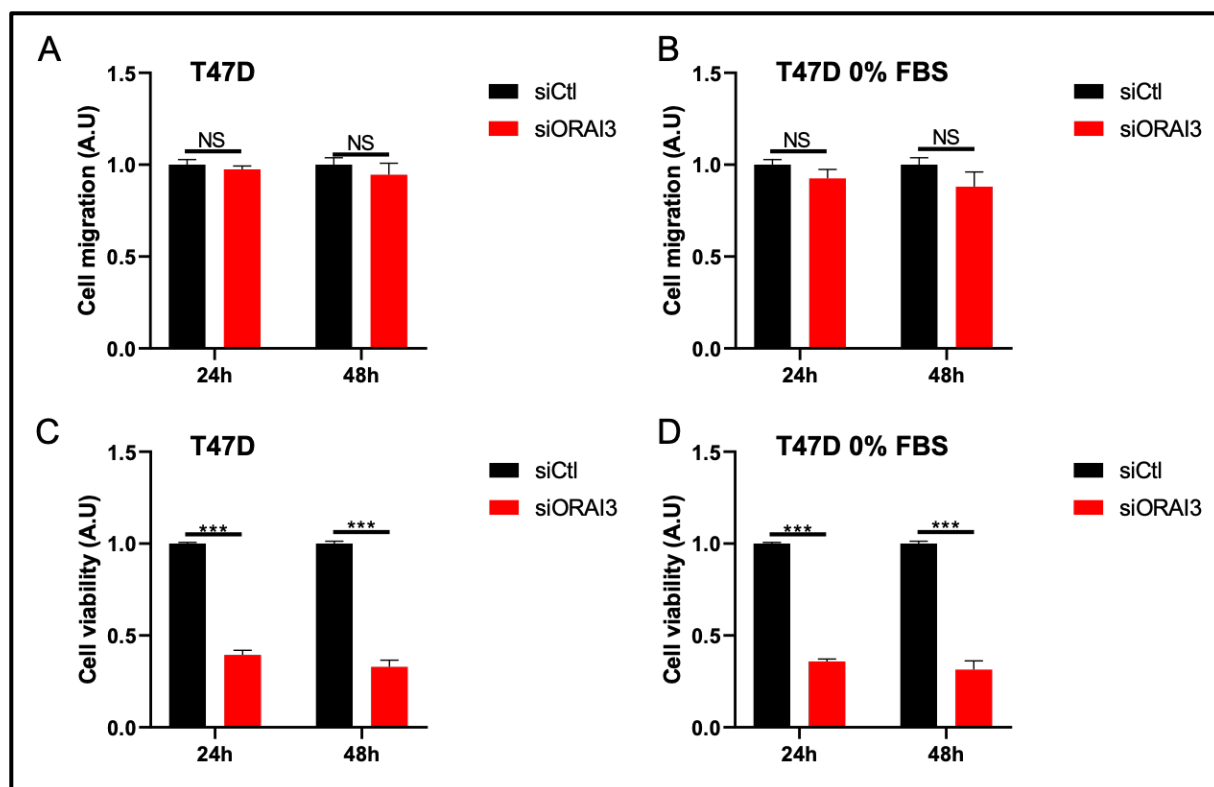
De nos jours, il est largement connu que ORAI3 régule un panel de processus biologiques dans les cellules cancéreuses mammaires lumineales ER<sup>+</sup>. En effet, ORAI3 module la prolifération et la survie cellulaires dans ces cellules (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013) mais également l'invasion cellulaire (Motiani *et al.* 2013). Ainsi, nous avons donc étudié l'impact de siORAI3 dans les processus migratoires des cellules cancéreuses mammaires lumineales ER<sup>+</sup>.

Dans ce travail, nous avons choisi de travailler sur une lignée cancéreuses mammaires ER<sup>+</sup> de type luminal (T47).



**Figure 38** : Validation de la transfection de siORAI3 dans les cellules T47D. Expression transcriptionnelle d'ORAI3 après transfection de siCtrl ou siOrai3. (N = 3 ; \*\*\* < 0,001)

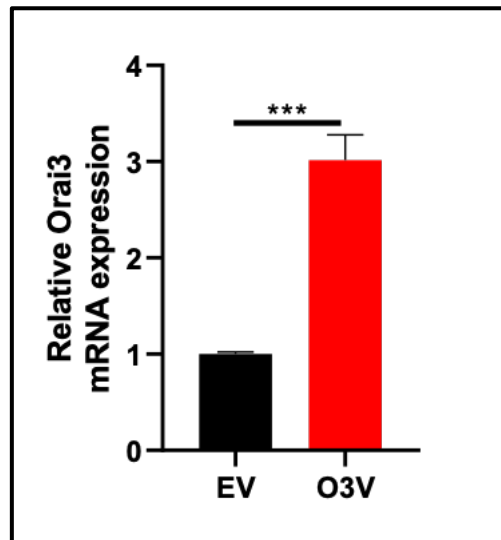
L'extinction de l'expression d'ORAI3 par siARN diminue l'expression transcriptionnelle d'ORAI3 de  $54 \pm 4,8$  % dans les cellules T47D par rapport aux cellules transfectées par un siARN Contrôle (**Figure 38**).



**Figure 39** : ORAI3 n'est pas impliqué dans la migration des cellules T47D mais affecte la viabilité cellulaire. A/B. Quantification de la migration cellulaire, par chambre de Boyden, des cellules T47D après transfection de siOrai3 cultivées dans un milieu de culture normal (A) ou de sevrage (B). C/D. Quantification de la viabilité cellulaire, par test au MTT, des cellules T47D après transfection de siOrai3 cultivées dans un milieu de culture normal (C) ou de sevrage (D). (N = 3 ; \*\*\* < 0,001 ; NS Non Significatif)

Nous avons ensuite étudié l'impact d'ORAI3 sur les capacités migratoires des cellules T47D par chambre de Boyden. Après 24h et 48h de culture dans un milieu de culture normal supplémenté de SVF (5 %), un comptage des cellules ayant migrées a été effectué. Nous n'avons observé aucune réduction de la migration des cellules T47D dans la condition siORAI3 par rapport à la condition siCtl (**Figure 39A**). Nous avons également réalisé la même expérience mais en absence de sérum dans le milieu de culture (0 % SVF) afin d'augmenter la vitesse de migration (Nagelkerke *et al.* 2013). Nous n'avons observé aucune modification dans le nombre de cellules migrantes dans les cellules transfectées avec siORAI3 par rapport aux cellules transfectées avec siCtl (**Figure 39B**). Par contre, nous avons remarqué que la viabilité des cellules est diminuée de  $60 \pm 2,1$  % à 24h, et  $65 \pm 3,8$  % à 48h dans les cellules siORAI3 par rapport au cellules siCtl cultivées dans milieu normal (**Figure 39C**). Des résultats similaires ont

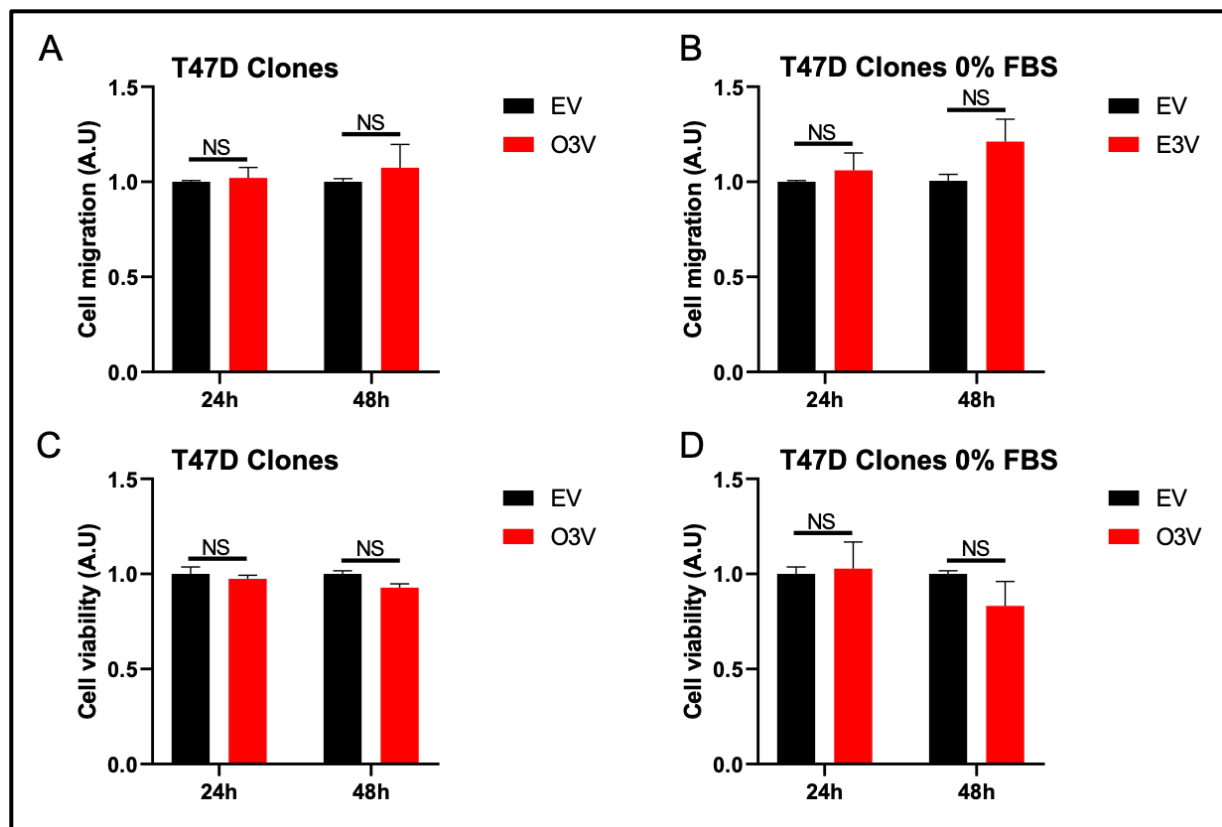
été obtenus lorsque les cellules ont été cultivées dans un milieu sans SVF. Les cellules siORAI3 présentent, dans ce cas, une réduction de la viabilité de  $63 \pm 1,6 \%$  et de  $66 \pm 6,3 \%$  à 24h et 48h respectivement (**Figure 39D**). Ces derniers résultats concernant la viabilité cellulaire confirment les résultats publiés par notre équipe sur les lignées cellulaires cancéreuses luminales ER<sup>+</sup> (Faouzi *et al.* 2011).



**Figure 40** : Quantification de l'expression transcriptionnelle d'ORAI3 dans les cellules T47D surexprimant stablement ORAI3. (N = 3 ; \*\*\* < 0,001)

Pour s'affranchir de l'implication d'ORAI3 dans la viabilité cellulaire, nous avons cherché à comprendre si la surexpression d'ORAI3 impacte la migration des cellules cancéreuses luminales ER<sup>+</sup>. En effet, une étude antérieure menée par le laboratoire a démontré que la surexpression d'ORAI3 n'affecte pas la viabilité des cellules ER<sup>+</sup> (Hasna *et al.* 2018). Pour cela, nous avons utilisé des clones cellulaires T47D surexprimant stablement ORAI3 (**Figure 40**). Nos résultats indiquent clairement que la surexpression n'affecte ni la migration (**Figure 41A**, **Figure 41B**), ni la viabilité (**Figure 41C**, **Figure 41D**) des cellules T47D.

Ainsi, pour conclure, nous montrons durant cette étude que l'implication d'ORAI3 dans les processus migratoires des cellules cancéreuses mammaires est propre au type basal ER<sup>-</sup>, tandis qu'ORAI3 régule la prolifération et la viabilité cellulaires dans le type luminal ER<sup>+</sup>.



**Figure 41 : La surexpression d’ORAI3 n’augmente pas la migration des cellules T47D.**  
 A/B. Quantification de la migration cellulaire, par chambre de Boyden, des cellules T47D surexprimant ORAI3 ou non cultivées dans un milieu de culture normal (A) ou de sevrage (B).  
 C/D. Quantification de la viabilité cellulaire, par test au MTT, des cellules T47D après surexpression ou non d’ORAI3 et cultivées dans un milieu de culture normal (C) ou de sevrage (D). (N = 3 ; NS Non Significatif)



# DISCUSSION

Si l'implication des canaux calciques ORAI3 dans les processus tumoraux est établie, les mécanismes par lesquels ils régulent la migration cellulaire sont encore mal connus. L'intervention des canaux ORAI3 est ainsi décrite dans plusieurs types de cancers, tels que le cancer du poumon (Ay *et al.* 2013, Benzerdjeb *et al.* 2016, Daya *et al.* 2021), colorectal (Ibrahim *et al.* 2019, Zhu *et al.* 2021), de la prostate (Dubois *et al.* 2014), du sein (Motiani *et al.* 2010, Faouzi *et al.* 2011, Hasna *et al.* 2018), du pancréas (Dubois *et al.* 2021) ainsi que dans le myélome multiple et les leucémies (Yanamandra *et al.* 2011). Par exemple, les travaux menés au laboratoire ont clairement permis d'établir le rôle prolifératif d'ORAI3 dans le cancer du sein (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013), et cela de façon dépendante des œstrogènes (Motiani *et al.* 2013). De plus, le laboratoire a également mis en évidence l'implication d'ORAI3 dans l'agressivité tumorale, et plus particulièrement dans la résistance aux traitements chimiothérapeutiques dans le cancer du sein (Hasna *et al.* 2018) et le cancer du poumon (Daya *et al.* 2021). De plus, avec parcimonie, une étude a rapporté l'implication d'ORAI3 dans les processus invasifs dans le cancer du sein (Motiani *et al.* 2013). Cependant, les données concernant le rôle d'ORAI3 dans les processus migratoires demeurent très insuffisantes.

Ainsi, l'objectif de ma thèse a été de déterminer le rôle d'ORAI3 et de sa signature calcique dans les processus migratoires du cancer du sein et d'identifier les voies de signalisation impliquées.

Pour répondre à cette problématique, nous avons travaillé sur trois lignées cancéreuses mammaires : deux lignées très migrantes et invasives MDA-231 et M-BrM2 (lignées cellulaires cancéreuses basales ER<sup>-</sup>), et la lignée peu agressive T47D (lignée cellulaire cancéreuse luminale ER<sup>+</sup>). **Les résultats obtenus durant ce travail, font l'objet d'une publication dans le journal Cells, MDPI.**

ORAI3 régule la migration des cellules cancéreuses mammaires de type basal *via* une modulation de la concentration calcique intracellulaire et des capacités adhésives cellulaires.

Les canaux calciques, et plus particulièrement les canaux ORAI, sont impliqués de façon importante dans la régulation des processus biologiques (Chalmers et Monteith 2018, Sallinger *et al.* 2020).

Durant notre travail, nous montrons, dans des cellules cancéreuses mammaires de type basal, que le canal ORAI3 régule la migration cellulaire en modulant

1. Les capacités adhésives des cellules, vraisemblablement *via* une régulation de l'entrée basale de  $\text{Ca}^{2+}$  qui active la calpaïne.
2. La morphologie cellulaire en régulant la polymérisation de l'actine *via* une interaction avec FAK.

Le canal ORAI3 a été principalement étudié dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires lumineales ER<sup>+</sup> dans lesquelles il participe à la SOCE (Motiani *et al.* 2010, Faouzi *et al.* 2011). Cependant, très peu d'études ont été menées pour comprendre le rôle d'ORAI3 dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires basales ER<sup>-</sup>. Motiani et ses collaborateurs ont montré en 2010 que ORAI1, à l'inverse d'ORAI3, est l'un des composants majeurs de la régulation de la SOCE dans la lignée MDA-231 (Motiani *et al.* 2010). Plus récemment, l'équipe de Monteith a clairement indiqué qu'ORAI3 ne constitue pas un canal SOC dans la lignée cellulaire cancéreuse basale ER<sup>-</sup> MDA-MB-468 (Azimi *et al.* 2019). Dans ce travail, nous confirmons qu'ORAI3 n'est pas impliqué dans la SOCE dans les lignées cellulaires cancéreuses ER<sup>-</sup>, à la fois dans les lignées cellulaires MDA-231 et MDA-BrM2. De plus, nous montrons, pour la première fois, que ce canal participe à l'entrée basale de  $\text{Ca}^{2+}$  dans ces deux modèles de cellules cancéreuses mammaires ER<sup>-</sup>. Nous mettons également en évidence que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  supportée par ORAI3 participe à la régulation de la concentration calcique intracellulaire. Par ailleurs, il a été décrit que l'acide arachidonique atténue la migration des cellules MDA-231 indépendamment de son rôle d'activateur des canaux ORAI3 dans leur conformation de canal ARC (hétéromérisation avec ORAI1) permettant ainsi d'éliminer cette modalité d'activation des canaux ORAI3 dans nos modèles cellulaires (Cantonero *et al.* 2020).

Nos résultats suggèrent un effet spécifique d'ORAI3 en fonction du statut oestrogénique des cellules cancéreuses mammaires. En effet, l'invalidation fonctionnelle d'ORAI3 par siARN diminue la migration cellulaire de 50 % et 55 %, tandis que la surexpression d'ORAI3 augmente la migration de 15 % et 17 %, dans les lignées cellulaires MDA-231 et MDA-BrM2

respectivement, sans affecter la viabilité cellulaire contrairement à la lignée cancéreuse luminale ER<sup>+</sup> T47D dans laquelle ni siORAI3, ni la surexpression d'ORAI3 ne modifient la migration cellulaire. Dans cette lignée, siORAI3 affecte la prolifération et la survie cellulaires.

Ainsi dans les cellules cancéreuses mammaires lumineales ER<sup>+</sup>, ORAI3, *via* la SOCE, régule la prolifération et la survie cellulaires, ainsi que la résistance à la chimiothérapie (Faouzi *et al.* 2011, Faouzi *et al.* 2013, Hasna *et al.* 2018). Tandis que dans les cellules cancéreuses mammaires de type basal, ORAI3, activé de manière basale, contrôle plutôt la migration, sans affecter la prolifération et / ou la survie cellulaire. En 2013, Motiani et ses collaborateurs ont rapporté que l'expression d'ORAI3 est régulée par les ER (Motiani *et al.* 2013). De plus, la même équipe a également démontré que les cellules cancéreuses lumineales ER<sup>+</sup> présentent une expression protéique d'ORAI3 accrue par rapport aux cellules cancéreuses basales ER<sup>-</sup> (Motiani *et al.* 2010). Ainsi, dans nos modèles cellulaires ER<sup>-</sup>, le fait que le taux d'expression soit différent entre les lignées cancéreuses mammaires ER<sup>+</sup> et ER<sup>-</sup> pourraient expliquer le contraste existant entre les deux types de lignées cancéreuses mammaires (SOCE dans les lignées cellulaires ER<sup>+</sup> et activité basale dans les lignées ER<sup>-</sup>).

L'implication d'ORAI3 dans la migration des cellules MDA-231 et MDA-BrM2 nécessite sa fonction canalaire : entrée de Ca<sup>2+</sup>. Le fait que les cellules siORAI3 cultivées dans un milieu de culture pauvre en Ca<sup>2+</sup> n'aient pas montré d'effet additif sur la migration et l'adhésion par rapport aux cellules cultivées dans un milieu de culture normal suggère l'implication d'une voie commune impliquant ORAI3 et le Ca<sup>2+</sup> dans la régulation de ces deux processus cellulaires.

La migration cellulaire est un processus cellulaire dynamique nécessitant une interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire à travers des adhérences focales (Maziveyi et Alahari 2017). Le remodelage de ces derniers est essentiel dans la migration cellulaire. En effet, lors des processus de migration, le processus de détachement des cellules est aussi essentiel que l'adhésion cellulaire (Greenwood et Murphy-Ullrich 1998). À la fin des années 1990, une famille de protéines, les calpaïnes, ont été mis en évidence dans la modulation des processus migratoires et adhésifs cellulaires (Huttenlocher *et al.* 1997, Potter *et al.* 1998, Croce *et al.* 1999). Au cours de cette étude, nous avons constaté que ORAI3, par sa capacité à faire entrer le calcium dans les cellules, entraîne les processus de migration et d'adhésion cellulaires en modulant l'activité de la calpaïne. De manière intéressante, et de manière similaire à nos résultats, il a été montré dans la lignée cellulaire cancéreuse ER<sup>-</sup> MDA-MB-435S que l'entrée de Ca<sup>2+</sup> *via* ORAI1, indépendamment des stocks calciques intracellulaires, et en association

avec le canal potassique SK3, module l'activité de la calpaïne, et de ce fait, la migration cellulaire (Chantome *et al.* 2013, Gueguinou *et al.* 2017). Nous apportons, durant notre étude, un nouvel aspect mécanistique par lequel les canaux ORAI régulent la migration cellulaire. Dans la lignée cellulaire MDA-231, ORAI1 régule la migration cellulaire *via* la SOCE (Yang *et al.* 2009), tandis qu'ORAI3 contrôle la migration cellulaire *via* une activité basale et une modulation de l'activité de la calpaïne, comme nous le rapportons dans cette étude. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour comprendre les voies moléculaires impliquées dans l'activation de la calpaïne médiée par Orai3.

ORAI3, indépendamment de sa fonction canalaire et en interagissant avec FAK, maintient le cytosquelette d'actine.

Lors de la migration cellulaire, l'actine tient une place de choix. En effet, l'actine, sous forme de fibres de stress, supporte et fournit la plupart des forces mécaniques impliquées dans la migration cellulaire (Burrige et Guilluy 2016). De plus, l'actine subit un remodelage durant les processus migratoires (Ridley 2015). Nous montrons, par immunofluorescence, une modification du cytosquelette d'actine F lorsque l'expression d'ORAI3 est inhibée moléculairement. En effet, les filaments d'actine F disparaissent complètement en l'absence d'ORAI3. Cette désorganisation du cytosquelette actinique est à la base de la morphologie arrondie des cellules MDA-231 et MDA-BrM2 transfectées avec siORAI3. A notre grande surprise, nos résultats montrent, en particulier sur les cellules MDA-231, la non-implication du  $Ca^{2+}$  dans le changement de morphologie cellulaire ainsi que dans la désorganisation du cytosquelette d'actine au sein des cellules siORAI3. Concernant la lignée cellulaire MDA-BrM2, nous avons rapporté une légère régulation de l'architecture du cytosquelette d'actine par le  $Ca^{2+}$  comme il a été rapporté par Pardo-Pastor et ses collaborateurs (Pardo-Pastor *et al.* 2018). En effet, ils ont mis en évidence que l'activité des canaux calciques PIEZO2 participe à la régulation de l'architecture du cytosquelette d'actine. De plus, ils ont également démontré l'implication la voie de signalisation Rho/mDIA dans la régulation de l'architecture du cytosquelette actinique de façon dépendante du  $Ca^{2+}$  (Pardo-Pastor *et al.* 2018). Le fait que nous n'ayons pas observé de différence d'expression de mDIA durant notre étude nous conforte dans l'idée d'une indépendance vis-à-vis du  $Ca^{2+}$  dans le maintien de la polymérisation de l'actine F.

La polymérisation de l'actine F est régulée par de nombreux régulateurs dont FAK (Mitra *et al.* 2005). FAK représente une protéine de type tyrosine kinase contrôlant diverses voies de signalisation, notamment la migration cellulaire, la formation et le remodelage des complexes d'adhésions focaux (Zaidel-Bar *et al.* 2003), ainsi que la régulation de l'architecture de l'actine (Sieg *et al.* 1999, Westhoff *et al.* 2004).

Dans notre travail, nous avons montré que siORAI3 n'affecte pas la phosphorylation de FAK. Par contre, il diminue l'expression totale de FAK de 32 % dans les cellules MDA-231 et de 35 % dans les cellules MDA-BrM2.

Plusieurs études ont rapporté le rôle pivot de FAK dans la polymérisation de l'actine (Serrels *et al.* 2007, Roa-Espitia *et al.* 2016, Salgado-Lucio *et al.* 2020). En revanche, FAK nécessite une

phosphorylation pour conduire au remodelage du cytosquelette d'actine (Li *et al.* 2013). Curieusement, dans notre étude, la phosphorylation de FAK n'est pas affectée par les niveaux d'expression d'ORAI3. Ainsi, nous suggérons qu'ORAI3 pourrait interagir avec FAK et réguler son expression afin de soutenir le renouvellement de FAK, et ainsi initier la voie de signalisation menant à la polymérisation de l'actine F. Conformément à notre hypothèse, nous montrons l'interaction directe par l'extrême proximité entre FAK et ORAI3 que nous avons observé durant notre étude. Fait intéressant, il a déjà été rapporté une interaction entre FAK et les canaux ioniques, en particulier les canaux potassiques (Cherubini *et al.* 2005, Wei *et al.* 2008), ouvrant ainsi la voie à d'autres études concernant les mécanismes d'interaction entre ORAI3 et FAK. Par ailleurs, nous avons observé une diminution de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  dans les cellules siORAI3. Cette diminution pourrait conduire à la diminution de l'expression de FAK. En effet, nous émettons l'hypothèse d'une interaction entre ORAI3 et l'intégrine  $\beta 1$ . Ce type d'interaction, entre les canaux ioniques et les intégrines, a déjà été mis en évidence dans le cancer colorectal entre le canal potassique Kv11.1 et l'intégrine  $\beta 1$  (Iorio *et al.* 2020).

En conclusion, nous montrons, dans les cancers mammaires triples négatifs et les plus agressifs, que le canal calcique ORAI3 est fonctionnel et permet une entrée basale du  $\text{Ca}^{2+}$  qui régule la concentration calcique cytosolique basale. De plus, il régule la migration des cellules cancéreuses mammaires par deux mécanismes :

1. *Via* une régulation de l'activité de la calpaïne et de l'adhésion cellulaire en participant au maintien de la concentration calcique intracellulaire
2. *Via* le remodelage de l'architecture du cytosquelette d'actine en régulant l'expression de FAK et de l'intégrine  $\beta 1$ , par un mécanisme indépendant du  $\text{Ca}^{2+}$ .

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

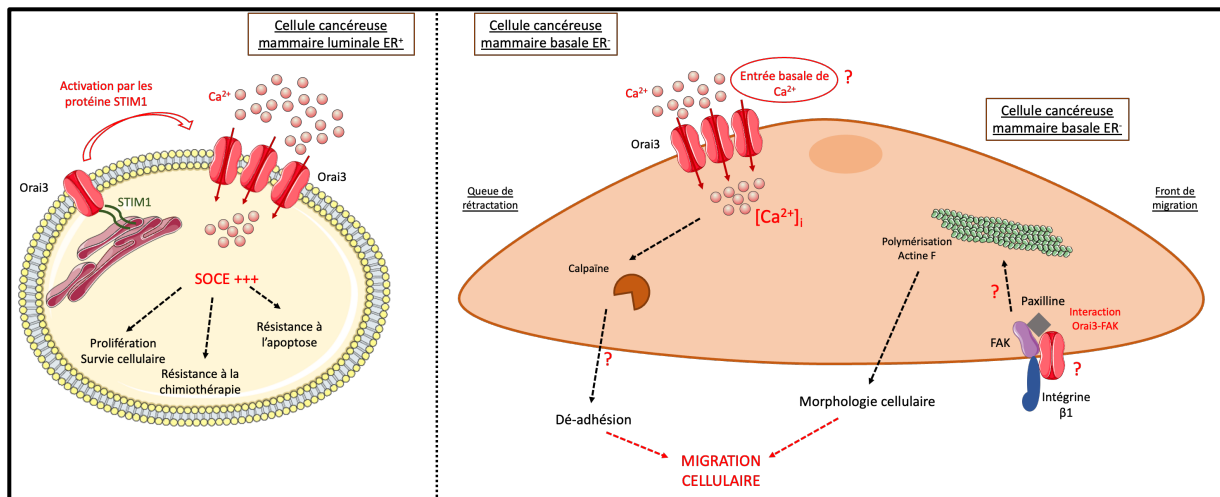


Mon travail de thèse fait suite aux études antérieures menées au laboratoire sur l'implication du canal ORAI3 dans l'agressivité tumorale mammaire. L'objectif était de comprendre par quels mécanismes ORAI3 module les capacités migratoires des cellules cancéreuses mammaires humaines.

Ainsi, durant ce travail, nous avons mis en évidence :

- Une corrélation positive entre le niveau d'expression d'ORAI3 et les capacités migratoires des cellules cancéreuses mammaires humaines de type basal ER<sup>-</sup>. En effet, la diminution ou l'augmentation de l'expression d'ORAI3 module la migration de ces cellules.
- Une activité basale d'ORAI3 permettant le maintien de la concentration calcique intracellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires basales ER<sup>-</sup>.
- Une régulation de la migration dépendante du Ca<sup>2+</sup> *via* la modulation des capacités adhésives cellulaire, et plus précisément de l'activité de la calpaïne.
- La perte d'ORAI3 est à l'origine d'un remodelage du cytosquelette d'actine.
- La régulation de l'architecture actinique par ORAI3 est un processus indépendant du Ca<sup>2+</sup>.
- ORAI3 régule la polymérisation de l'actine en interagissant avec FAK et en régulant son expression.

L'ensemble des résultats que nous avons apporté durant ce travail suggère le rôle primordial d'ORAI3 dans la régulation des processus migratoires des cellules cancéreuses mammaires humaines (**Figure 42**).



**Figure 42 :** Représentation schématique du rôle d’ORAI3 dans les processus migratoires des cellules cancéreuses mammaires basales ER<sup>+</sup>.

Afin de compléter ce travail, des manipulations expérimentales complémentaires restent à réaliser, notamment :

- Nous avons mis en évidence l’activité basale d’ORAI3, modulant la concentration calcique intracellulaire. Le laboratoire a décrit le rôle des canaux potassiques Kv10.1 dans l’entrée calcique constitutive par ORAI1 qui en réponse régule la migration des cellules MDA-231 (Hammadi *et al.* 2012). En effet, l’activité de Kv10.1 permet de maintenir un gradient électrochimique pour le Ca<sup>2+</sup> permettant son entrée *via* les canaux ORAI1 (Hammadi *et al.* 2012). Ainsi, nous émettons l’hypothèse de l’existence d’un couplage canaux K<sup>+</sup>/ORAI3 assurant une entrée calcique basale. Des données ont rapporté l’implication du canal potassique KCa3.1 dans la régulation du potentiel membranaire des cellules MDA-231 (Zhang *et al.* 2016). De plus, son inhibition pharmacologique, par TRAM-34 ou le clotrimazole, réduit la migration de ces cellules (Zhang *et al.* 2016). Pour confirmer ou infirmer cette hypothèse, il serait intéressant de déterminer l’existence d’un tel mécanisme en modulant séparément ou en combiné l’activité ou l’expression de ces deux canaux et d’en étudier la conséquence sur la migration cellulaire.
- De manière intéressante, nous avons rapporté que l’activité d’ORAI3 régule la migration cellulaire *via* l’activité de la calpaïne. La calpaïne est connue pour son rôle protéolytique au sein des complexes d’adhésion focaux. Ainsi, l’étude plus précise des substrats de la calpaïne lors de son activation par ORAI3 serait également intéressante.

Dans ce but, nous planifierons d'inhiber, de façon pharmacologique, la calpaïne puis d'évaluer l'expression des protéines formant les complexes d'adhésion focaux. Par ailleurs, nous aimerions également étudier une potentielle co-localisation entre ORAI3 et la calpaïne permettant ainsi d'affiner le mécanisme d'activation de la calpaïne par ORAI3.

- De plus, nous planifions également d'étudier les mouvements calciques intracellulaires, médiés par ORAI3, responsables de l'activité de la calpaïne. Nous pensons qu'ORAI3 est exprimé de façon différentielle au sein des cellules cancéreuses mammaires basales. Le gradient de concentration existant dans une cellule migrante nous indique une forte concentration calcique au niveau de la queue de rétraction et une concentration réduite au front de migration (Brundage *et al.* 1991). Ainsi, l'étude des mouvements calciques, par microscopie confocale, pourraient préciser la localisation exacte de l'influx calcique dans les cellules afin d'affiner notre compréhension du mécanisme migratoire que nous avons mis en évidence.
- Nous avons également mis en évidence une interaction entre FAK et ORAI3 qui serait responsable de l'architecture actinique dans les cellules MDA-231 et MDA-BrM2. Par ailleurs, nous avons montré une diminution de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$ , suggérant ainsi l'existence d'un complexe ORAI3/FAK/Intégrine  $\beta 1$ . Cette potentielle interaction sera étudié par co-immunoprécipitation et PLA. Afin de déterminer si cette interaction se produit au niveau des radeaux lipidiques, nous prévoyons d'utiliser la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine, connue pour désorganiser ces radeaux lipidique (Mahammad et Parmryd 2015), et étudier la formation du complexe précédemment cité dans ces conditions.
- Durant ce travail, nous avons également montré que la localisation de la paxilline est modulé par ORAI3. Nous tenons à élucider le mécanisme sous-jacent à ce processus. Il a été démontré, dans les ostéoclastes bovins, que l'agrégation de la paxilline au sein des complexes d'adhésions focaux est précédée par une augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire (Silber *et al.* 2012). Ainsi, nous aimerions étudier cette piste dans des cellules transfectées par siORAI3 cultivées dans un milieu de culture pauvre en  $Ca^{2+}$ .
- Par ailleurs, lors de la formation de métastases, une augmentation de l'expression et de l'activité de protéases (les MMP notamment) est primordiale dans les processus d'envahissement tissulaire. De plus, Motiani et ses collaborateurs ont montré que ORAI3 serait impliqué dans l'invasion cellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires luminales ER<sup>+</sup> (Motiani *et al.* 2013). Nous allons également rechercher la

potentielle implication d'ORAI3 dans ce processus cellulaire dans les cellules cancéreuses mammaires basales ER<sup>-</sup>. Ce processus sera étudié en utilisant un modèle de chambre de Boyden modifiée recouverte de Matrigel (mimant la matrice extracellulaire) sur nos modèles cellulaires où l'expression sera régulée à la baisse par siORAI3 et à la hausse par la transfection d'un plasmide surexprimant ORAI3. De plus, nous étudierons également l'expression et la sécrétion des MMP dans nos conditions.

- Enfin, le laboratoire collabore, de façon permanente, avec le service d'Anatomie et Cytologie Pathologique du Centre Hospitalier Universitaire Amiens – Picardie. Cette collaboration nous permettra également d'étudier l'expression d'ORAI3 dans les tissus de patients et plus spécifiquement d'étudier son expression en fonction de paramètres cliniques liés à l'agressivité tumorale, tels que l'envahissement des ganglions et la présence ou non de métastases chez les patientes. Cette étude nous permettrait de proposer ORAI3 en tant que marqueur pronostic et cible thérapeutique dans le cancer du sein triple négatif.

# BIBLIOGRAPHIE

Al-Thoubaity, F. K. (2020). "Molecular classification of breast cancer: A retrospective cohort study." Ann Med Surg (Lond) **49**: 44-48.

Alam, M. S. (2018). "Proximity Ligation Assay (PLA)." Curr Protoc Immunol **123**(1): e58.

Allen, W. E., et al. (1997). "Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages." Journal of cell science **110 ( Pt 6)**: 707-720.

Anderson, L. R., et al. (2014). "Structural and mechanical functions of integrins." Biophysical reviews **6**(2): 203-213.

Andisha, N. M., et al. (2019). "The relationship between phosphorylation status of focal adhesion kinases, molecular subtypes, tumour microenvironment and survival in patients with primary operable ductal breast cancer." Cell Signal **60**: 91-99.

Arnaout, M. A., et al. (2005). "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." Annu Rev Cell Dev Biol **21**: 381-410.

Arthur, J. S. and C. Crawford (1996). "Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interactions." Biochimica et biophysica acta **1293**(2): 201-206.

Arthur, J. S., et al. (2000). "Disruption of the murine calpain small subunit gene, Capn4: calpain is essential for embryonic development but not for cell growth and division." Molecular and cellular biology **20**(12): 4474-4481.

Augoff, K., et al. (2020). "Invadopodia: clearing the way for cancer cell invasion." Ann Transl Med **8**(14): 902.

Ay, A. S., et al. (2013). "Orai3 constitutes a native store-operated calcium entry that regulates non small cell lung adenocarcinoma cell proliferation." PloS one **8**(9): e72889.

Aysola, K., et al. (2013). "Triple Negative Breast Cancer - An Overview." Hereditary Genet **2013**(Suppl 2).

Azimi, I., et al. (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).

Azimi, I., et al. (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).

Badaoui, M., et al. (2018). "Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway." Oncotarget **9**(37): 24653-24671.

Baki, A., et al. (1996). "Autolysis parallels activation of mu-calpain." The Biochemical journal **318 ( Pt 3)**: 897-901.

Benzerdjeb, N., et al. (2016). "Orai3 is a predictive marker of metastasis and survival in resectable lung adenocarcinoma." Oncotarget **7**(49): 81588-81597.

Berridge, M. J. (2007). "Inositol trisphosphate and calcium oscillations." Biochem Soc Symp(74): 1-7.

Berridge, M. J., et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nature reviews. Molecular cell biology **4**(7): 517-529.

Berridge, M. J., et al. (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nature reviews. Molecular cell biology **1**(1): 11-21.

Blandin, A. F., et al. (2015). "beta1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer." Frontiers in pharmacology **6**: 279.

Bogeski, I., et al. (2010). "Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling." Sci Signal **3**(115): ra24.

Borowiec, A. S., et al. (2014). "Calcium channels, external calcium concentration and cell proliferation." Eur J Pharmacol **739**: 19-25.

Borrirukwanit, K., et al. (2014). "High threshold of beta1 integrin inhibition required to block collagen I-induced membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) activation of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)." Cancer cell international **14**(1): 99.

Bos, P. D., et al. (2009). "Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain." Nature **459**(7249): 1005-1009.

Bottaro, D. P. and L. A. Liotta (2003). "Cancer: Out of air is not out of action." Nature **423**(6940): 593-595.

Boyce, B. F., et al. (1999). "Factors regulating the growth of metastatic cancer in bone." Endocr Relat Cancer **6**(3): 333-347.

Brabletz, T., et al. (2018). "EMT in cancer." Nat Rev Cancer **18**(2): 128-134.

Brandman, O., et al. (2007). "STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> levels." Cell **131**(7): 1327-1339.

Bravo-Cordero, J. J., et al. (2012). "Directed cell invasion and migration during metastasis." Current opinion in cell biology **24**(2): 277-283.

Brundage, R. A., et al. (1991). "Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils." Science **254**(5032): 703-706.

Bugyi, B. and M. F. Carlier (2010). "Control of actin filament treadmilling in cell motility." Annu Rev Biophys **39**: 449-470.

Burnette, D. T., et al. (2014). "A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells." The Journal of cell biology **205**(1): 83-96.

Burridge, K. (1981). "Are stress fibres contractile?" Nature **294**(5843): 691-692.

Burridge, K. and M. Chrzanowska-Wodnicka (1996). "Focal adhesions, contractility, and signaling." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 463-518.

Burridge, K. and C. Guilluy (2016). "Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension." Exp Cell Res **343**(1): 14-20.

Cai, X. (2007). "Molecular evolution and structural analysis of the Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel subunit, Orai." J Mol Biol **368**(5): 1284-1291.

Cai, X., et al. (2016). "The Orai1 Store-operated Calcium Channel Functions as a Hexamer." The Journal of biological chemistry **291**(50): 25764-25775.

Calalb, M. B., et al. (1995). "Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases." Molecular and cellular biology **15**(2): 954-963.

Calderwood, D. A. (2004). "Integrin activation." Journal of cell science **117**(Pt 5): 657-666.

Calderwood, D. A., et al. (1999). "The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation." The Journal of biological chemistry **274**(40): 28071-28074.

Cantonero, C., et al. (2020). "Arachidonic Acid Attenuates Cell Proliferation, Migration and Viability by a Mechanism Independent on Calcium Entry." International journal of molecular sciences **21**(9).

Carafoli, E., et al. (2001). "Generation, control, and processing of cellular calcium signals." Crit Rev Biochem Mol Biol **36**(2): 107-260.

Carragher, N. O., et al. (1999). "Degraded collagen fragments promote rapid disassembly of smooth muscle focal adhesions that correlates with cleavage of pp125(FAK), paxillin, and talin." The Journal of cell biology **147**(3): 619-630.

Case, R. M., et al. (2007). "Evolution of calcium homeostasis: from birth of the first cell to an omnipresent signalling system." Cell calcium **42**(4-5): 345-350.

Chaffer, C. L. and R. A. Weinberg (2011). "A perspective on cancer cell metastasis." Science **331**(6024): 1559-1564.

Chalmers, S. B. and G. R. Monteith (2018). "ORAI channels and cancer." Cell calcium **74**: 160-167.

Chan, K. T., et al. (2010). "Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK)." The Journal of biological chemistry **285**(15): 11418-11426.

Chantome, A., et al. (2013). "Pivotal role of the lipid Raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases." Cancer research **73**(15): 4852-4861.

Chatterjee, S. J. and L. McCaffrey (2014). "Emerging role of cell polarity proteins in breast cancer progression and metastasis." Breast Cancer (Dove Med Press) **6**: 15-27.

Chavis, P., et al. (1996). "Functional coupling between ryanodine receptors and L-type calcium channels in neurons." Nature **382**(6593): 719-722.

Chen, J., et al. (2006). "Regulation of outside-in signaling and affinity by the beta2 I domain of integrin alphaLbeta2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(35): 13062-13067.

Chen, Y. F., et al. (2013). "Remodeling of calcium signaling in tumor progression." Journal of biomedical science **20**: 23.

Chen, Y. F., et al. (2011). "Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(37): 15225-15230.

Cheng, Y. J., et al. (2015). "Silencing profilin-1 inhibits gastric cancer progression via integrin beta1/focal adhesion kinase pathway modulation." World J Gastroenterol **21**(8): 2323-2335.

Cherubini, A., et al. (2005). "Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling." Mol Biol Cell **16**(6): 2972-2983.

Chou, S. Z. and T. D. Pollard (2019). "Mechanism of actin polymerization revealed by cryo-EM structures of actin filaments with three different bound nucleotides." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **116**(10): 4265-4274.

Chua, B. T., et al. (2000). "Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases." The Journal of biological chemistry **275**(7): 5131-5135.

Ciobanasu, C., et al. (2012). "Actin dynamics associated with focal adhesions." International journal of cell biology **2012**: 941292.

Ciriello, G., et al. (2013). "Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers." Nat Genet **45**(10): 1127-1133.

Cluzel, C., et al. (2005). "The mechanisms and dynamics of (alpha)v(beta)3 integrin clustering in living cells." The Journal of cell biology **171**(2): 383-392.

Condeelis, J. (1993). "Life at the leading edge: the formation of cell protrusions." Annu Rev Cell Biol **9**: 411-444.

Cortasio, C. L., et al. (2011). "Calpain-mediated proteolysis of paxillin negatively regulates focal adhesion dynamics and cell migration." The Journal of biological chemistry **286**(12): 9998-10006.

Cortasio, C. L., et al. (2008). "Calpain 2 and PTP1B function in a novel pathway with Src to regulate invadopodia dynamics and breast cancer cell invasion." The Journal of cell biology **180**(5): 957-971.

Covault, J., et al. (1991). "Calcium-activated proteolysis of intracellular domains in the cell adhesion molecules NCAM and N-cadherin." Brain Res Mol Brain Res **11**(1): 11-16.

Croce, K., et al. (1999). "Inhibition of calpain blocks platelet secretion, aggregation, and spreading." The Journal of biological chemistry **274**(51): 36321-36327.

Cross, B. M., et al. (2014). "Cellular calcium dynamics in lactation and breast cancer: from physiology to pathology." American journal of physiology. Cell physiology **306**(6): C515-526.

Cross, B. M., et al. (2013). "SPCA2 regulates Orai1 trafficking and store independent Ca<sup>2+</sup> entry in a model of lactation." PloS one **8**(6): e67348.

Cserni, G., et al. (2018). "The new TNM-based staging of breast cancer." Virchows Arch **472**(5): 697-703.

Dai, X., et al. (2015). "Breast cancer intrinsic subtype classification, clinical use and future trends." American journal of cancer research **5**(10): 2929-2943.

Danen, E. H., et al. (1994). "Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression." Histopathology **24**(3): 249-256.

Dang, D. K., et al. (2019). "A Ca(2+)-ATPase Regulates E-cadherin Biogenesis and Epithelial-Mesenchymal Transition in Breast Cancer Cells." Mol Cancer Res **17**(8): 1735-1747.

Daya, H. A., et al. (2021). "Orai3-Mediates Cisplatin-Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Enriching Cancer Stem Cell Population through PI3K/AKT Pathway." Cancers **13**(10).

Dedieu, S., et al. (2003). "Myoblast migration is prevented by a calpain-dependent accumulation of MARCKS." Biol Cell **95**(9): 615-623.

DeHaven, W. I., et al. (2008). "Complex actions of 2-aminoethyldiphenyl borate on store-operated calcium entry." The Journal of biological chemistry **283**(28): 19265-19273.

Deliot, N. and B. Constantin (2015). "Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration." Biochimica et biophysica acta **1848**(10 Pt B): 2512-2522.



Demuro, A., et al. (2011). "Subunit stoichiometry of human Orai1 and Orai3 channels in closed and open states." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**(43): 17832-17837.

Deramaudt, T. B., et al. (2014). "Altering FAK-paxillin interactions reduces adhesion, migration and invasion processes." PloS one **9**(3): e92059.

Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 83-117.

Dhennin-Duthille, I., et al. (2011). "High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters." Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology **28**(5): 813-822.

Dourdin, N., et al. (2001). "Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts." The Journal of biological chemistry **276**(51): 48382-48388.

Du, X., et al. (1995). "Calpain cleavage of the cytoplasmic domain of the integrin beta 3 subunit." The Journal of biological chemistry **270**(44): 26146-26151.

Dubois, C., et al. (2021). "ORAI3 silencing alters cell proliferation and promotes mitotic catastrophe and apoptosis in pancreatic adenocarcinoma." Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research **1868**(7): 119023.

Dubois, C., et al. (2014). "Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer." Cancer cell **26**(1): 19-32.

Eide, B. L., et al. (1995). "Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK." Molecular and cellular biology **15**(5): 2819-2827.

Elce, J. S., et al. (1997). "Autolysis, Ca<sup>2+</sup> requirement, and heterodimer stability in m-calpain." The Journal of biological chemistry **272**(17): 11268-11275.

Eliyatkın, N., et al. (2015). "Molecular Classification of Breast Carcinoma: From Traditional, Old-Fashioned Way to A New Age, and A New Way." J Breast Health **11**(2): 59-66.

Engel, R. H. and V. G. Kaklamani (2007). "HER2-positive breast cancer: current and future treatment strategies." Drugs **67**(9): 1329-1341.

Esposito, M. and Y. Kang (2014). "Targeting tumor-stromal interactions in bone metastasis." Pharmacol Ther **141**(2): 222-233.

Etienne-Manneville, S. (2018). "Cytoplasmic Intermediate Filaments in Cell Biology." Annu Rev Cell Dev Biol **34**: 1-28.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta." Cell **106**(4): 489-498.

Evans, J. H. and J. J. Falke (2007). "Ca<sup>2+</sup> influx is an essential component of the positive-feedback loop that maintains leading-edge structure and activity in macrophages." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(41): 16176-16181.

Faouzi, M., et al. (2011). "Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells." Journal of cellular physiology **226**(2): 542-551.

Faouzi, M., et al. (2013). "ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells." Biochimica et biophysica acta **1833**(3): 752-760.

Farooqui, R. and G. Fenteany (2005). "Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement." Journal of cell science **118**(Pt 1): 51-63.

Feng, M., et al. (2010). "Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors." Cell **143**(1): 84-98.

Feske, S., et al. (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-185.

Feske, S., et al. (2005). "A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients." J Exp Med **202**(5): 651-662.

Fischer, W. and U. Krugel (2007). "P2Y receptors: focus on structural, pharmacological and functional aspects in the brain." Curr Med Chem **14**(23): 2429-2455.

Fletcher, D. A. and R. D. Mullins (2010). "Cell mechanics and the cytoskeleton." Nature **463**(7280): 485-492.

Foulkes, W. D., et al. (2010). "Triple-negative breast cancer." N Engl J Med **363**(20): 1938-1948.

Franco, S., et al. (2004). "Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion." Exp Cell Res **299**(1): 179-187.

Franco, S. J. and A. Huttenlocher (2005). "Regulating cell migration: calpains make the cut." Journal of cell science **118**(Pt 17): 3829-3838.

Franco, S. J., et al. (2004). "Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics." Nat Cell Biol **6**(10): 977-983.

Friedl, P. and K. Wolf (2010). "Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model." The Journal of cell biology **188**(1): 11-19.

Friedl, P., et al. (1998). "Cell migration strategies in 3-D extracellular matrix: differences in morphology, cell matrix interactions, and integrin function." Microsc Res Tech **43**(5): 369-378.

Frischauf, I., et al. (2009). "Molecular determinants of the coupling between STIM1 and Orai channels: differential activation of Orai1-3 channels by a STIM1 coiled-coil mutant." The Journal of biological chemistry **284**(32): 21696-21706.

Frischauf, I., et al. (2008). "The STIM/Orai coupling machinery." Channels **2**(4): 261-268.

Fujita, H., et al. (1997). "Characterization of gelsolin truncates that inhibit actin depolymerization by severing activity of gelsolin and cofilin." Eur J Biochem **248**(3): 834-839.

Gallardo, E., et al. (2011). "Limb-girdle muscular dystrophy 2A." Handb Clin Neurol **101**: 97-110.

Gammons, J., et al. (2021). "Cardiac-Specific Deletion of Orai3 Leads to Severe Dilated Cardiomyopathy and Heart Failure in Mice." J Am Heart Assoc **10**(8): e019486.

Gao, J. J. and S. M. Swain (2018). "Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review." Oncologist **23**(5): 556-565.

Garnotel, R., et al. (2000). "Human blood monocytes interact with type I collagen through alpha x beta 2 integrin (CD11c-CD18, gp150-95)." J Immunol **164**(11): 5928-5934.

Gil-Parrado, S., et al. (2002). "Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members." The Journal of biological chemistry **277**(30): 27217-27226.

Girault, A., et al. (2021). "The N and C-termini of SPCA2 regulate differently Kv10.1 function: role in the collagen 1-induced breast cancer cell survival." American journal of cancer research **11**(1): 251-263.

Girault, J. A., et al. (1999). "The N-termini of FAK and JAKs contain divergent band 4.1 domains." Trends Biochem Sci **24**(2): 54-57.

Glading, A., et al. (2004). "Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation." Molecular and cellular biology **24**(6): 2499-2512.

Glading, A., et al. (2002). "Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility." Trends Cell Biol **12**(1): 46-54.

Global Burden of Disease Cancer, C., et al. (2019). "Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study." JAMA Oncol **5**(12): 1749-1768.

Goldstein, L. S. (1991). "The kinesin superfamily: tails of functional redundancy." Trends Cell Biol **1**(4): 93-98.

Goll, D. E., et al. (1991). "Studies of the alpha-actinin/actin interaction in the Z-disk by using calpain." The Journal of biological chemistry **266**(13): 8501-8510.

Goll, D. E., et al. (2003). "The calpain system." Physiological reviews **83**(3): 731-801.

Gonczy, P., et al. (1999). "Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo." The Journal of cell biology **147**(1): 135-150.

Gonzalez-Cobos, J. C., et al. (2013). "Store-independent Orai1/3 channels activated by intracrine leukotriene C4: role in neointimal hyperplasia." Circulation research **112**(7): 1013-1025.

Goodson, H. V. and E. M. Jonasson (2018). "Microtubules and Microtubule-Associated Proteins." Cold Spring Harb Perspect Biol **10**(6).

Grabmayr, H., et al. (2020). "STIM Proteins: An Ever-Expanding Family." International journal of molecular sciences **22**(1).

Greenwood, J. A. and J. E. Murphy-Ullrich (1998). "Signaling of de-adhesion in cellular regulation and motility." Microsc Res Tech **43**(5): 420-432.

Griffiths, G. S., et al. (2011). "Bit-1 mediates integrin-dependent cell survival through activation of the NFkappaB pathway." The Journal of biological chemistry **286**(16): 14713-14723.

Grigoriev, I., et al. (2008). "STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER." Current biology : CB **18**(3): 177-182.

Guan, C. B., et al. (2007). "Long-range Ca<sup>2+</sup> signaling from growth cone to soma mediates reversal of neuronal migration induced by slit-2." Cell **129**(2): 385-395.

Gueguinou, M., et al. (2017). "The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca(2+) homeostasis." Oncogene **36**(25): 3640-3647.

Guilbert, A., et al. (2009). "Evidence that TRPM7 is required for breast cancer cell proliferation." American journal of physiology. Cell physiology **297**(3): C493-502.

Guilbert, A., et al. (2013). "Transient receptor potential melastatin 7 is involved in oestrogen receptor-negative metastatic breast cancer cells migration through its kinase domain." European journal of cancer **49**(17): 3694-3707.

Gupta, G. P. and J. Massague (2006). "Cancer metastasis: building a framework." Cell **127**(4): 679-695.

Guroff, G. (1964). "A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain." The Journal of biological chemistry **239**: 149-155.

Guttman, R. P., et al. (1997). "Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis." The Journal of biological chemistry **272**(3): 2005-2012.

Gwack, Y., et al. (2007). "Biochemical and functional characterization of Orai proteins." The Journal of biological chemistry **282**(22): 16232-16243.

Hall, A. (1994). "Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton." Annu Rev Cell Biol **10**: 31-54.

Hammad, A. S. and K. Machaca (2021). "Store Operated Calcium Entry in Cell Migration and Cancer Metastasis." Cells **10**(5).

Hammadi, M., et al. (2012). "Human ether a-gogo K(+) channel 1 (hEag1) regulates MDA-MB-231 breast cancer cell migration through Orai1-dependent calcium entry." Journal of cellular physiology **227**(12): 3837-3846.

Han, Y., et al. (1999). "Tumor necrosis factor-alpha-inducible I kappa B alpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation." The Journal of biological chemistry **274**(2): 787-794.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.

Hasna, J., et al. (2018). "Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: the p53 connection." Cell death and differentiation **25**(4): 693-707.

Hassiotou, F. and D. Geddes (2013). "Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge." Clin Anat **26**(1): 29-48.

Hata, S., et al. (2001). "Domain II of m-calpain is a Ca(2+)-dependent cysteine protease." FEBS Lett **501**(2-3): 111-114.

Heissig, B., et al. (2021). "The Multifaceted Role of Plasminogen in Cancer." International journal of molecular sciences **22**(5).

Herlitze, S., et al. (2003). "Targeting mechanisms of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels." J Bioenerg Biomembr **35**(6): 621-637.

Herman, I. M. (1993). "Actin isoforms." *Current opinion in cell biology* **5**(1): 48-55.

Herrmann, H. and U. Aebi (2004). "Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds." *Annu Rev Biochem* **73**: 749-789.

Hewavitharana, T., et al. (2007). "Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway." *Cell calcium* **42**(2): 173-182.

Hirai, S., et al. (1991). "Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain." *FEBS Lett* **287**(1-2): 57-61.

Hoffman, L., et al. (2013). "Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II isoforms differentially impact the dynamics and structure of the actin cytoskeleton." *Biochemistry* **52**(7): 1198-1207.

Hoffman, P. N., et al. (1987). "Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(10): 3472-3476.

Holmes, K. C., et al. (1990). "Atomic model of the actin filament." *Nature* **347**(6288): 44-49.

Holzmann, C., et al. (2015). "Differential Redox Regulation of Ca(2+)(+) Signaling and Viability in Normal and Malignant Prostate Cells." *Biophys J* **109**(7): 1410-1419.

Honda, K., et al. (1998). "Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion." *The Journal of cell biology* **140**(6): 1383-1393.

Hong, Y. M., et al. (2014). "Significance of the expression of integrin beta1, VEGF and MVD in hypopharyngeal squamous cell carcinoma." *Genet Mol Res* **13**(3): 6455-6465.

Honnappa, S., et al. (2009). "An EB1-binding motif acts as a microtubule tip localization signal." *Cell* **138**(2): 366-376.

Horwitz, A. R. and J. T. Parsons (1999). "Cell migration--movin' on." *Science* **286**(5442): 1102-1103.

Horwitz, R. and D. Webb (2003). "Cell migration." *Current biology : CB* **13**(19): R756-759.

Hosfield, C. M., et al. (1999). "Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation." *The EMBO journal* **18**(24): 6880-6889.

Hotulainen, P. and P. Lappalainen (2006). "Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells." *The Journal of cell biology* **173**(3): 383-394.

Hou, X., et al. (2018). "Structures reveal opening of the store-operated calcium channel Orai." *eLife* **7**.

Hou, X., et al. (2012). "Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai." *Science* **338**(6112): 1308-1313.

Howell, L. P., et al. (1994). "Application of the Scarff-Bloom-Richardson tumor grading system to fine-needle aspirates of the breast." *Am J Clin Pathol* **101**(3): 262-265.

Hu, H. Z., et al. (2004). "2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3." *The Journal of biological chemistry* **279**(34): 35741-35748.

Huang, C., et al. (1997). "Proteolysis of platelet cortactin by calpain." *The Journal of biological chemistry* **272**(31): 19248-19252.

Huang, Z. H., et al. (2011). "Slit-2 repels the migration of olfactory ensheathing cells by triggering Ca<sup>2+</sup>-dependent cofilin activation and RhoA inhibition." *Journal of cell science* **124**(Pt 2): 186-197.

Huff-Lonergan, E., et al. (1996). "Proteolysis of specific muscle structural proteins by mu-calpain at low pH and temperature is similar to degradation in postmortem bovine muscle." *J Anim Sci* **74**(5): 993-1008.

Huttenlocher, A., et al. (1997). "Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain." *The Journal of biological chemistry* **272**(52): 32719-32722.

Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* **69**(1): 11-25.

Ibrahim, S., et al. (2019). "Expression Profiling of Calcium Channels and Calcium-Activated Potassium Channels in Colorectal Cancer." *Cancers* **11**(4).

Ikura, M. (1996). "Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins." *Trends Biochem Sci* **21**(1): 14-17.

Innocenti, M. (2018). "New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration." *Cell Adh Migr* **12**(5): 401-416.

lorio, J., et al. (2020). "KV11.1 Potassium Channel and the Na(+)/H(+) Antiporter NHE1 Modulate Adhesion-Dependent Intracellular pH in Colorectal Cancer Cells." *Frontiers in pharmacology* **11**: 848.

Isenberg, G., et al. (1980). "An actin-binding protein from *Acanthamoeba* regulates actin filament polymerization and interactions." *Nature* **288**(5790): 455-459.

Ivaska, J. (2011). "Vimentin: Central hub in EMT induction?" *Small GTPases* **2**(1): 51-53.

Jachetti, E., et al. (2015). "Tenascin-C Protects Cancer Stem-like Cells from Immune Surveillance by Arresting T-cell Activation." *Cancer research* **75**(10): 2095-2108.

James, P., et al. (1989). "Modulation of erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain." *The Journal of biological chemistry* **264**(14): 8289-8296.

Janouskova, H., et al. (2012). "Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high-grade glioma." *Cancer research* **72**(14): 3463-3470.

Jardin, I., et al. (2018). "TRPC6 Channels Are Required for Proliferation, Migration and Invasion of Breast Cancer Cell Lines by Modulation of Orai1 and Orai3 Surface Exposure." *Cancers* **10**(9).

Javed, A. and A. Lteif (2013). "Development of the human breast." *Semin Plast Surg* **27**(1): 5-12.

Kappel, S., et al. (2020). "The Number and Position of Orai3 Units within Heteromeric Store-Operated Ca(2+) Channels Alter the Pharmacology of ICRAC." *International journal of molecular sciences* **21**(7).

Katoh, K. (2017). "Activation of Rho-kinase and focal adhesion kinase regulates the organization of stress fibers and focal adhesions in the central part of fibroblasts." *PeerJ* **5**: e4063.

Kawasaki, T., et al. (2010). "Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca<sup>2+</sup> level via the store-operated Ca<sup>2+</sup> channel." *The Journal of biological chemistry* **285**(33): 25720-25730.

Keck, M., et al. (2019). "Cardiac inflammatory CD11b/c cells exert a protective role in hypertrophied cardiomyocyte by promoting TNFR2- and Orai3- dependent signaling." *Scientific reports* **9**(1): 6047.

Keller, H. and P. Egli (1998). "Protrusive activity, cytoplasmic compartmentalization, and restriction rings in locomoting blebbing Walker carcinosarcoma cells are related to detachment of cortical actin from the plasma membrane." *Cell Motil Cytoskeleton* **41**(2): 181-193.

Kenny, P. A., et al. (2007). "The morphologies of breast cancer cell lines in three-dimensional assays correlate with their profiles of gene expression." *Molecular oncology* **1**(1): 84-96.

Kerstein, P. C., et al. (2017). "Calpain-Mediated Proteolysis of Talin and FAK Regulates Adhesion Dynamics Necessary for Axon Guidance." *J Neurosci* **37**(6): 1568-1580.

Khananshvil, D. (2014). "Sodium-calcium exchangers (NCX): molecular hallmarks underlying the tissue-specific and systemic functions." *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **466**(1): 43-60.

Kikuchi, K. and K. Takahashi (2008). "WAVE2- and microtubule-dependent formation of long protrusions and invasion of cancer cells cultured on three-dimensional extracellular matrices." *Cancer science* **99**(11): 2252-2259.

Kim, M., et al. (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." *Science* **301**(5640): 1720-1725.

Klein, C. A. (2008). "Cancer. The metastasis cascade." *Science* **321**(5897): 1785-1787.

Krebs, J. (2017). "The Plasma Membrane Calcium Pump (PMCA): Regulation of Cytosolic Ca(2+), Genetic Diversities and Its Role in Sub-plasma Membrane Microdomains." *Adv Exp Med Biol* **981**: 3-21.

Kretsinger, R. H. and C. E. Nockolds (1973). "Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description." *The Journal of biological chemistry* **248**(9): 3313-3326.

Krishnan, K. and P. D. J. Moens (2009). "Structure and functions of profilins." *Biophysical reviews* **1**(2): 71-81.

Kubbutat, M. H. and K. H. Vousden (1997). "Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability." *Molecular and cellular biology* **17**(1): 460-468.

Kulkarni, S., et al. (2002). "Calpain cleaves RhoA generating a dominant-negative form that inhibits integrin-induced actin filament assembly and cell spreading." The Journal of biological chemistry **277**(27): 24435-24441.

Kurosaka, S. and A. Kashina (2008). "Cell biology of embryonic migration." Birth Defects Res C Embryo Today **84**(2): 102-122.

Larsson, C. (2006). "Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton." Cell Signal **18**(3): 276-284.

Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell migration: a physically integrated molecular process." Cell **84**(3): 359-369.

Lebart, M. C. and Y. Benyamin (2006). "Calpain involvement in the remodeling of cytoskeletal anchorage complexes." FEBS J **273**(15): 3415-3426.

Leduc, C. and S. Etienne-Manneville (2015). "Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects." Current opinion in cell biology **32**: 102-112.

Lee, E. Y. and W. J. Muller (2010). "Oncogenes and tumor suppressor genes." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(10): a003236.

Lee, Y. C., et al. (2013). "Targeting constitutively activated beta1 integrins inhibits prostate cancer metastasis." Mol Cancer Res **11**(4): 405-417.

Lehtimäki, J. I., et al. (2021). "Generation of stress fibers through myosin-driven reorganization of the actin cortex." eLife **10**.

Leloup, L. and A. Wells (2011). "Calpains as potential anti-cancer targets." Expert Opin Ther Targets **15**(3): 309-323.

Li, J., et al. (2015). "Orai3 Surface Accumulation and Calcium Entry Evoked by Vascular Endothelial Growth Factor." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(9): 1987-1994.

Li, M., et al. (2006). "Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7." J Gen Physiol **127**(5): 525-537.

Li, S. Y., et al. (2013). "Focal adhesion kinase is a regulator of F-actin dynamics: New insights from studies in the testis." Spermatogenesis **3**(3): e25385.

Li, Z., et al. (2007). "Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activation." The Journal of biological chemistry **282**(40): 29448-29456.

Lin, F. and H. J. Worman (1997). "Expression of nuclear lamins in human tissues and cancer cell lines and transcription from the promoters of the lamin A/C and B1 genes." Exp Cell Res **236**(2): 378-384.

Lintz, M., et al. (2017). "The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells." J Biomech Eng **139**(2).

Liou, J., et al. (2005). "STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx." Current biology : CB **15**(13): 1235-1241.

Lis, A., et al. (2007). "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with distinct functional properties." Current biology : CB **17**(9): 794-800.

Liu, X., et al. (2019). "Molecular understanding of calcium permeation through the open Orai channel." PLoS biology **17**(4): e3000096.

Lokuta, M. A., et al. (2003). "Calpain regulates neutrophil chemotaxis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(7): 4006-4011.

Lopez-Colome, A. M., et al. (2017). "Paxillin: a crossroad in pathological cell migration." Journal of hematology & oncology **10**(1): 50.

Lyle, K. S., et al. (2012). "Microtubule dynamics regulation contributes to endothelial morphogenesis." Bioarchitecture **2**(6): 220-227.

MacLennan, D. H. and E. G. Kranias (2003). "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility." Nature reviews. Molecular cell biology **4**(7): 566-577.

Mahammad, S. and I. Parmryd (2015). "Cholesterol depletion using methyl-beta-cyclodextrin." Methods Mol Biol **1232**: 91-102.

Makowska, K. A., et al. (2015). "Specific Myosins Control Actin Organization, Cell Morphology, and Migration in Prostate Cancer Cells." Cell Rep **13**(10): 2118-2125.

Marchi, S. and P. Pinton (2014). "The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications." The Journal of physiology **592**(5): 829-839.

Martin, S., et al. (2012). "Integrins and p53 pathways in glioblastoma resistance to temozolomide." Frontiers in oncology **2**: 157.

Martinkova, E., et al. (2010). "alpha5beta1 integrin antagonists reduce chemotherapy-induced premature senescence and facilitate apoptosis in human glioblastoma cells." Int J Cancer **127**(5): 1240-1248.

Maruyama, T., et al. (1997). "2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release." J Biochem **122**(3): 498-505.

Matsuoka, T., et al. (2000). "Increased expression of alpha2beta1-integrin in the peritoneal dissemination of human gastric carcinoma." Int J Mol Med **5**(1): 21-25.

Mattila, P. K. and P. Lappalainen (2008). "Filopodia: molecular architecture and cellular functions." Nature reviews. Molecular cell biology **9**(6): 446-454.

Maughan, K. L., et al. (2010). "Treatment of breast cancer." Am Fam Physician **81**(11): 1339-1346.

Maziveyi, M. and S. K. Alahari (2017). "Cell matrix adhesions in cancer: The proteins that form the glue." Oncotarget **8**(29): 48471-48487.

McGinnis, K. M., et al. (1999). "Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates." Biochemical and biophysical research communications **263**(1): 94-99.

McNally, B. A., et al. (2009). "Structural determinants of ion permeation in CRAC channels." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(52): 22516-22521.

Mekhdjian, A. H., et al. (2017). "Integrin-mediated traction force enhances paxillin molecular associations and adhesion dynamics that increase the invasiveness of tumor cells into a three-dimensional extracellular matrix." Mol Biol Cell **28**(11): 1467-1488.

Melloni, E., et al. (1996). "Modulation of the calpain autoproteolysis by calpastatin and phospholipids." Biochemical and biophysical research communications **229**(1): 193-197.

Menter, D. G. and R. N. Dubois (2012). "Prostaglandins in cancer cell adhesion, migration, and invasion." International journal of cell biology **2012**: 723419.

Mignen, O. and T. J. Shuttleworth (2000). "I(A<sub>1</sub>ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel." The Journal of biological chemistry **275**(13): 9114-9119.

Mignen, O., et al. (2003). "Ca<sup>2+</sup> selectivity and fatty acid specificity of the noncapacitative, arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup> (ARC) channels." The Journal of biological chemistry **278**(12): 10174-10181.

Mignen, O., et al. (2007). "STIM1 regulates Ca<sup>2+</sup> entry via arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane." The Journal of physiology **579**(Pt 3): 703-715.

Mikoshiba, K. (2007). "The IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel and its cellular function." Biochem Soc Symp(74): 9-22.

Missan, D. S., et al. (2015). "Integrin alpha3beta1 signaling through MEK/ERK determines alternative polyadenylation of the MMP-9 mRNA transcript in immortalized mouse keratinocytes." PloS one **10**(3): e0119539.

Missiaen, L., et al. (2001). "2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca<sup>2+</sup> pump and the non-specific Ca<sup>2+</sup> leak from the non-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> stores in permeabilized A7r5 cells." Cell calcium **29**(2): 111-116.

Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." Nature **312**(5991): 237-242.

Mitra, S. K., et al. (2005). "Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility." Nature reviews. Molecular cell biology **6**(1): 56-68.

Monteith, G. R., et al. (2007). "Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport." Nat Rev Cancer **7**(7): 519-530.

Morozevich, G. E., et al. (2012). "Integrin alpha5beta1 simultaneously controls EGFR-dependent proliferation and Akt-dependent pro-survival signaling in epidermoid carcinoma cells." Aging (Albany NY) **4**(5): 368-374.

Mostafavi-Pour, Z., et al. (2003). "Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration." The Journal of cell biology **161**(1): 155-167.

Motiani, R. K., et al. (2010). "A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells." The Journal of biological chemistry **285**(25): 19173-19183.

Motiani, R. K., et al. (2013). "Emerging roles of Orai3 in pathophysiology." Channels **7**(5): 392-401.

Motiani, R. K., et al. (2013). "Orai3 is an estrogen receptor alpha-regulated Ca(2)(+) channel that promotes tumorigenesis." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology **27**(1): 63-75.

Muik, M., et al. (2008). "Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation." The Journal of biological chemistry **283**(12): 8014-8022.

Muller, P. A. and K. H. Vousden (2013). "p53 mutations in cancer." Nat Cell Biol **15**(1): 2-8.

Mullins, F. M., et al. (2009). "STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of CRAC channels." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**(36): 15495-15500.

Nagelkerke, A., et al. (2013). "Hypoxia stimulates migration of breast cancer cells via the PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response." Breast Cancer Res **15**(1): R2.

Nakai, J., et al. (1996). "Enhanced dihydropyridine receptor channel activity in the presence of ryanodine receptor." Nature **380**(6569): 72-75.

Naumanen, P., et al. (2008). "Mechanisms of actin stress fibre assembly." J Microsc **231**(3): 446-454.

Nishida, N., et al. (2006). "Angiogenesis in cancer." Vasc Health Risk Manag **2**(3): 213-219.

Nobes, C. D. and A. Hall (1995). "Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility." Biochem Soc Trans **23**(3): 456-459.

Nunes, J. B., et al. (2015). "OXPHOS dysfunction regulates integrin-beta1 modifications and enhances cell motility and migration." Hum Mol Genet **24**(7): 1977-1990.

Nurnberg, A., et al. (2011). "Nucleating actin for invasion." Nat Rev Cancer **11**(3): 177-187.

Oda, A., et al. (1993). "pp60src is an endogenous substrate for calpain in human blood platelets." The Journal of biological chemistry **268**(17): 12603-12608.

Ohta, Y., et al. (1986). "Type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase binds to actin filaments in a calmodulin-sensitive manner." FEBS Lett **208**(2): 423-426.

Pal, G. P., et al. (2003). "Crystal structure of a micro-like calpain reveals a partially activated conformation with low Ca<sup>2+</sup> requirement." Structure **11**(12): 1521-1526.

Palty, R., et al. (2017). "Sequential Steps of CRAC Channel Activation." Cell Rep **19**(9): 1929-1939.

Pandurangan, M., et al. (2014). "The calpain system and diabetes." Pathophysiology **21**(2): 161-167.

Pangburn, T. O., et al. (2012). "Targeted polymersome delivery of siRNA induces cell death of breast cancer cells dependent upon Orai3 protein expression." Langmuir **28**(35): 12816-12830.

Pantel, K. and R. H. Brakenhoff (2004). "Dissecting the metastatic cascade." Nat Rev Cancer **4**(6): 448-456.

Pardo-Pastor, C., et al. (2018). "Piezo2 channel regulates RhoA and actin cytoskeleton to promote cell mechanobiological responses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **115**(8): 1925-1930.

Patanaphan, V., et al. (1988). "Breast cancer: metastatic patterns and their prognosis." South Med J **81**(9): 1109-1112.

Paul, N. R., et al. (2015). "alpha5beta1 integrin recycling promotes Arp2/3-independent cancer cell invasion via the formin FHOD3." The Journal of cell biology **210**(6): 1013-1031.

Pearl, O. (2017). "Metastatic Breast Cancer." Radiol Technol **88**(5): 519M-539M.

Peinelt, C., et al. (2008). "2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels." The Journal of physiology **586**(13): 3061-3073.



Peppiatt, C. M., et al. (2003). "2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) antagonises inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium release, inhibits calcium pumps and has a use-dependent and slowly reversible action on store-operated calcium entry channels." *Cell calcium* **34**(1): 97-108.

Peretti, M., et al. (2019). "Original association of ion transporters mediates the ECM-induced breast cancer cell survival: Kv10.1-Orai1-SPCA2 partnership." *Scientific reports* **9**(1): 1175.

Periasamy, M. and A. Kalyanasundaram (2007). "SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease." *Muscle Nerve* **35**(4): 430-442.

Perou, C. M., et al. (1999). "Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(16): 9212-9217.

Piacentino, M. L., et al. (2020). "Epithelial-to-mesenchymal transition and different migration strategies as viewed from the neural crest." *Current opinion in cell biology* **66**: 43-50.

Pianetti, S., et al. (2001). "Her-2/neu overexpression induces NF-kappaB via a PI3-kinase/Akt pathway involving calpain-mediated degradation of I kappa B-alpha that can be inhibited by the tumor suppressor PTEN." *Oncogene* **20**(11): 1287-1299.

Pollard, T. D., et al. (2000). "Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **29**: 545-576.

Pollard, T. D. and J. A. Cooper (1984). "Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation." *Biochemistry* **23**(26): 6631-6641.

Polte, T. R. and S. K. Hanks (1995). "Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(23): 10678-10682.

Popp, O., et al. (2003). "The calpastatin-derived calpain inhibitor CP1B reduces mRNA expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and invasion by leukemic THP-1 cells." *Biol Chem* **384**(6): 951-958.

Potter, D. A., et al. (1998). "Calpain regulates actin remodeling during cell spreading." *The Journal of cell biology* **141**(3): 647-662.

Prakriya, M. (2013). "Store-operated Orai channels: structure and function." *Curr Top Membr* **71**: 1-32.

Prakriya, M., et al. (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." *Nature* **443**(7108): 230-233.

Prakriya, M. and R. S. Lewis (2001). "Potentiation and inhibition of Ca(2+) release-activated Ca(2+) channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP(3) receptors." *The Journal of physiology* **536**(Pt 1): 3-19.

Prakriya, M. and R. S. Lewis (2015). "Store-Operated Calcium Channels." *Physiological reviews* **95**(4): 1383-1436.

Pratt, S. J. P., et al. (2020). "Calcium signaling: breast cancer's approach to manipulation of cellular circuitry." *Biophysical reviews* **12**(6): 1343-1359.

Prevarskaya, N., et al. (2018). "Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies?" *Physiological reviews* **98**(2): 559-621.

Pring, M., et al. (2003). "Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments." *Biochemistry* **42**(2): 486-496.

Raffo, D., et al. (2011). "Role of MMPs in metastatic dissemination: implications for therapeutic advances." *Curr Pharm Biotechnol* **12**(11): 1937-1947.

Rappel, W. J. and L. Edelstein-Keshet (2017). "Mechanisms of Cell Polarization." *Curr Opin Syst Biol* **3**: 43-53.

Reinhardt, T. A., et al. (2004). "Null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca2+-ATPase isoform 2 impairs calcium transport into milk." *The Journal of biological chemistry* **279**(41): 42369-42373.

Reiske, H. R., et al. (1999). "Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration." *The Journal of biological chemistry* **274**(18): 12361-12366.

Ribatti, D., et al. (2020). "Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview." *Transl Oncol* **13**(6): 100773.

Ridley, A. J. (2015). "Rho GTPase signalling in cell migration." Current opinion in cell biology **36**: 103-112.

Ridley, A. J., et al. (2003). "Cell migration: integrating signals from front to back." Science **302**(5651): 1704-1709.

Rios, E. and G. Brum (1987). "Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle." Nature **325**(6106): 717-720.

Rios-Doria, J., et al. (2004). "Cleavage of beta-catenin by calpain in prostate and mammary tumor cells." Cancer research **64**(20): 7237-7240.

Roa-Espitia, A. L., et al. (2016). "Focal adhesion kinase is required for actin polymerization and remodeling of the cytoskeleton during sperm capacitation." Biol Open **5**(9): 1189-1199.

Roberts-Thomson, S. J., et al. (2010). "Plasma membrane calcium pumps and their emerging roles in cancer." World J Biol Chem **1**(8): 248-253.

Robinson, S. D., et al. (2009). "Alphav beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis." The Journal of biological chemistry **284**(49): 33966-33981.

Roche, J. (2018). "The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer." Cancers **10**(2).

Rodat-Despoix, L., et al. (2021). "Ion channels as key partners of cytoskeleton in cancer disease." Biochim Biophys Acta Rev Cancer **1876**(2): 188627.

Rogers, S. L., et al. (2003). "Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells." The Journal of cell biology **162**(6): 1079-1088.

Rorth, P. (2009). "Collective cell migration." Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 407-429.

Salgado-Lucio, M. L., et al. (2020). "FAK regulates actin polymerization during sperm capacitation via the ERK2/GEF-H1/RhoA signaling pathway." Journal of cell science **133**(8).

Saliba, Y., et al. (2015). "Emergence of Orai3 activity during cardiac hypertrophy." Cardiovasc Res **105**(3): 248-259.

Sallinger, M., et al. (2020). "Orai channels: key players in Ca(2+) homeostasis." Curr Opin Physiol **17**: 42-49.

Samanta, A., et al. (2018). "Transient Receptor Potential (TRP) Channels." Subcell Biochem **87**: 141-165.

Sanchez-Collado, J., et al. (2021). "Role of Orai3 in the Pathophysiology of Cancer." International journal of molecular sciences **22**(21).

Sarkar, S., et al. (2013). "Cancer development, progression, and therapy: an epigenetic overview." International journal of molecular sciences **14**(10): 21087-21113.

Sawaki, M., et al. (2019). "TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group)." Jpn J Clin Oncol **49**(3): 228-231.

Schaffner, F., et al. (2013). "Integrin alpha5beta1, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors." Cancers **5**(1): 27-47.

Schaller, M. D. (2001). "Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase." Biochimica et biophysica acta **1540**(1): 1-21.

Schaller, M. D., et al. (1992). "pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(11): 5192-5196.

Schaller, M. D., et al. (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." Molecular and cellular biology **14**(3): 1680-1688.

Schindl, R., et al. (2008). "2-aminoethoxydiphenyl borate alters selectivity of Orai3 channels by increasing their pore size." The Journal of biological chemistry **283**(29): 20261-20267.

Schlomann, U., et al. (2015). "ADAM8 as a drug target in pancreatic cancer." Nature communications **6**: 6175.

Schmoranzner, J., et al. (2003). "Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge." Journal of cell science **116**(Pt 22): 4513-4519.

Schwab, A., et al. (2008). "Potassium channels keep mobile cells on the go." Physiology **23**: 212-220.

Senger, F., et al. (2019). "Spatial integration of mechanical forces by alpha-actinin establishes actin network symmetry." *Journal of cell science* **132**(22).

Serrels, B., et al. (2007). "Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2/3 complex." *Nat Cell Biol* **9**(9): 1046-1056.

Seyfried, T. N. and L. C. Huysentruyt (2013). "On the origin of cancer metastasis." *Critical reviews in oncogenesis* **18**(1-2): 43-73.

Sheetz, M. P., et al. (1999). "Cell migration as a five-step cycle." *Biochem Soc Symp* **65**: 233-243.

Shen, J. X. and J. L. Yakel (2009). "Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system." *Acta Pharmacol Sin* **30**(6): 673-680.

Shen, Y. and M. D. Schaller (1999). "Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation." *Mol Biol Cell* **10**(8): 2507-2518.

Shiraha, H., et al. (2002). "Activation of m-calpain (calpain II) by epidermal growth factor is limited by protein kinase A phosphorylation of m-calpain." *Molecular and cellular biology* **22**(8): 2716-2727.

Shuttleworth, T. J. (2009). "Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins." *Cell calcium* **45**(6): 602-610.

Shuttleworth, T. J. (2012). "Orai3--the 'exceptional' Orai?" *The Journal of physiology* **590**(2): 241-257.

Siddiqui, I. A., et al. (2015). "Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy." *Ann N Y Acad Sci* **1348**(1): 20-31.

Sieg, D. J., et al. (1999). "Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration." *Journal of cell science* **112** ( Pt 16): 2677-2691.

Silber, A. S., et al. (2012). "Dynamic redistribution of paxillin in bovine osteoblasts stimulated with adenosine 5'-triphosphate." *J Mol Histol* **43**(5): 571-580.

Slack, J. K., et al. (2001). "Alterations in the focal adhesion kinase/Src signal transduction pathway correlate with increased migratory capacity of prostate carcinoma cells." *Oncogene* **20**(10): 1152-1163.

Smyth, J. T., et al. (2008). "Ca<sup>2+</sup>-store-dependent and -independent reversal of Stim1 localization and function." *Journal of cell science* **121**(Pt 6): 762-772.

Soboloff, J., et al. (2012). "STIM proteins: dynamic calcium signal transducers." *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**(9): 549-565.

Son, H. and A. Moon (2010). "Epithelial-mesenchymal Transition and Cell Invasion." *Toxicol Res* **26**(4): 245-252.

Sorimachi, H. and K. Suzuki (2001). "The structure of calpain." *J Biochem* **129**(5): 653-664.

Soto-Ribeiro, M., et al. (2019). "beta1D integrin splice variant stabilizes integrin dynamics and reduces integrin signaling by limiting paxillin recruitment." *Journal of cell science* **132**(8).

Southwick, F. S. (2000). "Gelsolin and ADF/cofilin enhance the actin dynamics of motile cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(13): 6936-6938.

Spina, E. and P. Cowin (2021). "Embryonic mammary gland development." *Semin Cell Dev Biol* **114**: 83-92.

Stein, H. (2007). "[The grading of invasive breast cancer according to Elston and Ellis]." *Pathologie* **28**(4): 307.

Steri, V., et al. (2014). "Acute depletion of endothelial beta3-integrin transiently inhibits tumor growth and angiogenesis in mice." *Circulation research* **114**(1): 79-91.

Stewart, T. A., et al. (2015). "Altered calcium signaling in cancer cells." *Biochimica et biophysica acta* **1848**(10 Pt B): 2502-2511.

Storr, S. J., et al. (2011). "The calpain system and cancer." *Nat Rev Cancer* **11**(5): 364-374.

Strobl, S., et al. (2000). "The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(2): 588-592.

Stupp, R., et al. (2010). "Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma." *J Clin Oncol* **28**(16): 2712-2718.

Sugawara, M., et al. (2016). "Dynamics of Actin Stress Fibers and Focal Adhesions during Slow Migration in Swiss 3T3 Fibroblasts: Intracellular Mechanism of Cell Turning." Biomed Res Int **2016**: 5749749.

Sulzmaier, F. J., et al. (2014). "FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications." Nat Rev Cancer **14**(9): 598-610.

Sun, Y. S., et al. (2017). "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." Int J Biol Sci **13**(11): 1387-1397.

Suzuki, K., et al. (2004). "Structure, activation, and biology of calpain." Diabetes **53 Suppl 1**: S12-18.

Suzuki, K., et al. (1981). "Limited autolysis of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions." J Biochem **90**(1): 275-278.

Szeverenyi, I., et al. (2008). "The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases." Hum Mutat **29**(3): 351-360.

Takagi, J., et al. (2001). "C-terminal opening mimics 'inside-out' activation of integrin alpha5beta1." Nat Struct Biol **8**(5): 412-416.

Tan, Y., et al. (2006). "Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli." The Journal of biological chemistry **281**(26): 17689-17698.

Tang, D. D. and B. D. Gerlach (2017). "The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration." Respir Res **18**(1): 54.

Tapon, N. and A. Hall (1997). "Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton." Current opinion in cell biology **9**(1): 86-92.

Tee, Y. H., et al. (2015). "Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton." Nat Cell Biol **17**(4): 445-457.

Theveneau, E. and R. Mayor (2013). "Collective cell migration of epithelial and mesenchymal cells." Cellular and molecular life sciences : CMLS **70**(19): 3481-3492.

Thompson, J., et al. (2010). "The N-terminal domain of Orai3 determines selectivity for activation of the store-independent ARC channel by arachidonic acid." Channels **4**(5): 398-410.

Thompson, J. L. and T. J. Shuttleworth (2012). "A plasma membrane-targeted cytosolic domain of STIM1 selectively activates ARC channels, an arachidonate-regulated store-independent Orai channel." Channels **6**(5): 370-378.

Thompson, J. L. and T. J. Shuttleworth (2013). "Exploring the unique features of the ARC channel, a store-independent Orai channel." Channels **7**(5): 364-373.

Tian, C., et al. (2016). "Store-operated CRAC channel inhibitors: opportunities and challenges." Future Med Chem **8**(7): 817-832.

Tiffner, A., et al. (2021). "Transmembrane Domain 3 (TM3) Governs Orai1 and Orai3 Pore Opening in an Isoform-Specific Manner." Front Cell Dev Biol **9**: 635705.

Toft, D. J. and V. L. Cryns (2011). "Minireview: Basal-like breast cancer: from molecular profiles to targeted therapies." Mol Endocrinol **25**(2): 199-211.

Tojkander, S., et al. (2015). "Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly." eLife **4**: e06126.

Tojkander, S., et al. (2012). "Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles." Journal of cell science **125**(Pt 8): 1855-1864.

Tompa, P., et al. (2004). "On the sequential determinants of calpain cleavage." The Journal of biological chemistry **279**(20): 20775-20785.

Tompa, P., et al. (2001). "Domain III of calpain is a Ca<sup>2+</sup>-regulated phospholipid-binding domain." Biochemical and biophysical research communications **280**(5): 1333-1339.

Toricelli, M., et al. (2013). "Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation." Mol Cancer **12**: 22.

Tran, B. and P. L. Bedard (2011). "Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets." Breast Cancer Res **13**(6): 221.

Trebak, M., et al. (2002). "Comparison of human TRPC3 channels in receptor-activated and store-operated modes. Differential sensitivity to channel blockers suggests fundamental differences in channel composition." The Journal of biological chemistry **277**(24): 21617-21623.

Trebak, M. and J. W. Putney, Jr. (2017). "ORAI Calcium Channels." Physiology **32**(4): 332-342.

Trebak, M., et al. (2003). "Signaling mechanism for receptor-activated canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channels." The Journal of biological chemistry **278**(18): 16244-16252.

Trebak, M., et al. (2003). "The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels." Cell calcium **33**(5-6): 451-461.

Tsai, F. C., et al. (2015). "Ca<sup>2+</sup> signaling in cytoskeletal reorganization, cell migration, and cancer metastasis." Biomed Res Int **2015**: 409245.

Tsai, F. C. and T. Meyer (2012). "Ca<sup>2+</sup> pulses control local cycles of lamellipodia retraction and adhesion along the front of migrating cells." Current biology : CB **22**(9): 837-842.

Tsai, F. C., et al. (2014). "A polarized Ca<sup>2+</sup>, diacylglycerol and STIM1 signalling system regulates directed cell migration." Nat Cell Biol **16**(2): 133-144.

Vachon, P. H. (2011). "Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation." J Signal Transduct **2011**: 738137.

Vale, R. D., et al. (1985). "Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility." Cell **42**(1): 39-50.

Vallénus, T. (2013). "Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells." Open Biol **3**(6): 130001.

Van Petegem, F. (2012). "Ryanodine receptors: structure and function." The Journal of biological chemistry **287**(38): 31624-31632.

Vandecaetsbeek, I., et al. (2011). "The Ca<sup>2+</sup> pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(5).

Vanden Abeele, F., et al. (2004). "Two types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells." The Journal of biological chemistry **279**(29): 30326-30337.

Vandewalle, B., et al. (1993). "Intracellular calcium and breast-cancer cell-growth and differentiation." International journal of oncology **2**(4): 613-620.

VanHouten, J., et al. (2010). "PMCA2 regulates apoptosis during mammary gland involution and predicts outcome in breast cancer." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(25): 11405-11410.

Varnai, P., et al. (2009). "STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry." Trends Pharmacol Sci **30**(3): 118-128.

Vashisht, A., et al. (2018). "Regulation of proto-oncogene Orai3 by miR18a/b and miR34a." Cell calcium **75**: 101-111.

Vautrin-Glabik, A., et al. (2018). "IP3R3 silencing induced actin cytoskeletal reorganization through ARHGAP18/RhoA/mDia1/FAK pathway in breast cancer cell lines." Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research **1865**(7): 945-958.

Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.

Vig, M., et al. (2006). "CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry." Science **312**(5777): 1220-1223.

Vincent, T. L. and R. A. Gatenby (2008). "An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis." International journal of oncology **32**(4): 729-737.

Vinogradova, O., et al. (2002). "A structural mechanism of integrin alpha(IIb)beta(3) "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face." Cell **110**(5): 587-597.

Voets, T., et al. (2001). "CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties." The Journal of biological chemistry **276**(51): 47767-47770.

Vosler, P. S., et al. (2008). "Calpain-mediated signaling mechanisms in neuronal injury and neurodegeneration." Mol Neurobiol **38**(1): 78-100.

Wang, X. D., et al. (2003). "Cyclin E in breast tumors is cleaved into its low molecular weight forms by calpain." Oncogene **22**(5): 769-774.

Wang, Y., et al. (2015). "Formin-like 2 Promotes beta1-Integrin Trafficking and Invasive Motility Downstream of PKCalpha." Dev Cell **34**(4): 475-483.

Weber, K. and M. Osborn (1982). "Cytoskeleton: definition, structure and gene regulation." Pathol Res Pract **175**(2-3): 128-145.

Wegner, A. and G. Isenberg (1983). "12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **80**(16): 4922-4925.

Wei, C., et al. (2009). "Calcium flickers steer cell migration." Nature **457**(7231): 901-905.

Wei, D., et al. (2017). "Orai1 and Orai3 Mediate Store-Operated Calcium Entry Contributing to Neuronal Excitability in Dorsal Root Ganglion Neurons." Frontiers in cellular neuroscience **11**: 400.

Wei, J. F., et al. (2008). "Formation of Kv2.1-FAK complex as a mechanism of FAK activation, cell polarization and enhanced motility." Journal of cellular physiology **217**(2): 544-557.

Weigelt, B., et al. (2010). "Histological types of breast cancer: how special are they?" Molecular oncology **4**(3): 192-208.

Wendt, A., et al. (2004). "Interaction of calpastatin with calpain: a review." Biol Chem **385**(6): 465-472.

Westhoff, M. A., et al. (2004). "SRC-mediated phosphorylation of focal adhesion kinase couples actin and adhesion dynamics to survival signaling." Molecular and cellular biology **24**(18): 8113-8133.

Wood, D. E., et al. (1998). "Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis." Oncogene **17**(9): 1069-1078.

Xiao, T., et al. (2004). "Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics." Nature **432**(7013): 59-67.

Yamaguchi, H. and J. Condeelis (2007). "Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion." Biochimica et biophysica acta **1773**(5): 642-652.

Yamaguchi, H., et al. (2005). "Cell migration in tumors." Current opinion in cell biology **17**(5): 559-564.

Yan, B., et al. (2001). "Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain." The Journal of biological chemistry **276**(30): 28164-28170.

Yanamandra, N., et al. (2011). "Tipifarnib-induced apoptosis in acute myeloid leukemia and multiple myeloma cells depends on Ca<sup>2+</sup> influx through plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels." J Pharmacol Exp Ther **337**(3): 636-643.

Yang, L., et al. (2015). "Twist promotes reprogramming of glucose metabolism in breast cancer cells through PI3K/AKT and p53 signaling pathways." Oncotarget **6**(28): 25755-25769.

Yang, P., et al. (2014). "Pyruvate kinase M2 facilitates colon cancer cell migration via the modulation of STAT3 signalling." Cell Signal **26**(9): 1853-1862.

Yang, P., et al. (2015). "Secreted pyruvate kinase M2 facilitates cell migration via PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin pathway in colon cancer cells." Biochemical and biophysical research communications **459**(2): 327-332.

Yang, S., et al. (2009). "Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis." Cancer cell **15**(2): 124-134.

Ye, Z., et al. (2021). "Arachidonic acid-regulated calcium signaling in T cells from patients with rheumatoid arthritis promotes synovial inflammation." Nature communications **12**(1): 907.

Yoast, R. E., et al. (2020). "The native ORAI channel trio underlies the diversity of Ca<sup>2+</sup> signaling events." Nature communications **11**(1): 2444.

Zaidel-Bar, R., et al. (2003). "Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells." Journal of cell science **116**(Pt 22): 4605-4613.

Zamir, E., et al. (2000). "Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts." Nat Cell Biol **2**(4): 191-196.

Zhang, P., et al. (2016). "Inhibition of SK4 Potassium Channels Suppresses Cell Proliferation, Migration and the Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple-Negative Breast Cancer Cells." PloS one **11**(4): e0154471.

Zhang, S. L., et al. (2008). "Store-dependent and -independent modes regulating Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel activity of human Orai1 and Orai3." The Journal of biological chemistry **283**(25): 17662-17671.

Zhang, S. L., et al. (2006). "Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(24): 9357-9362.

Zhang, W., et al. (2015). "Leukotriene-C4 synthase, a critical enzyme in the activation of store-independent Orai1/Orai3 channels, is required for neointimal hyperplasia." The Journal of biological chemistry **290**(8): 5015-5027.

Zhang, X., et al. (2013). "Mechanisms of STIM1 activation of store-independent leukotriene C4-regulated Ca<sup>2+</sup> channels." Molecular and cellular biology **33**(18): 3715-3723.

Zhang, X., et al. (2020). "Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels." Cell calcium **91**: 102281.

Zheng, X., et al. (2014). "Hypoxia-induced and calpain-dependent cleavage of filamin A regulates the hypoxic response." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **111**(7): 2560-2565.

Zhou, Y., et al. (2017). "The STIM-Orai coupling interface and gating of the Orai1 channel." Cell calcium **63**: 8-13.

Zhu, D., et al. (2021). "ORAI3 contributes to hypoxia-inducible factor 1/2alpha-sensitive colon cell migration." Physiol Int.

Zitt, C., et al. (2004). "Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP2." The Journal of biological chemistry **279**(13): 12427-12437.




Zuccolo, E., et al. (2018). "Stim and Orai mediate constitutive Ca(2+) entry and control endoplasmic reticulum Ca(2+) refilling in primary cultures of colorectal carcinoma cells." Oncotarget **9**(57): 31098-31119.

# ANNEXES



Review

# Ion Channels: New Actors Playing in Chemotherapeutic Resistance

Philippe Kischel <sup>1,\*†</sup>, Alban Girault <sup>1,†</sup> , Lise Rodat-Despoix <sup>1</sup>, Mohamed Chamli <sup>1</sup>,  
Silviya Radoslavova <sup>1</sup>, Hiba Abou Daya <sup>1</sup>, Thibaut Lefebvre <sup>1</sup>, Arthur Foulon <sup>1,2</sup> ,  
Pierre Rybarczyk <sup>1,3</sup>, Frédéric Hague <sup>1</sup>, Isabelle Dhennin-Duthille <sup>1</sup>, Mathieu Gautier <sup>1</sup>   
and Halima Ouadid-Ahidouch <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire (EA 4667), Université de Picardie Jules Verne, UFR des Sciences, 33 Rue St Leu, 80039 Amiens, France; alban.girault@u-picardie.fr (A.G.); lise.despoix@u-picardie.fr (L.R.-D.); mohamed.chamli@etud.u-picardie.fr (M.C.); silviya.radoslavova@u-picardie.fr (S.R.); hiba.abou.day@etud.u-picardie.fr (H.A.D.); thibaut.lefebvre@u-picardie.fr (T.L.); arthfoulon@gmail.com (A.F.); rybarczyk pierre@hotmail.com (P.R.); fh-lnc@u-picardie.fr (F.H.); isabelle.dhennin@u-picardie.fr (I.D.-D.); mathieu.gautier@u-picardie.fr (M.G.); halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr (H.O.-A.)

<sup>2</sup> Service de Gynécologie Obstétrique, CHU Amiens Picardie, 80000 Amiens, France

<sup>3</sup> Laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Amiens Picardie, 80000 Amiens, France

\* Correspondence: Philippe.Kischel@u-picardie.fr; Tel.: +33-3-2282-7643; Fax: +33-3-2282-7550

† These authors contributed equally to this work.

Received: 1 February 2019; Accepted: 12 March 2019; Published: 16 March 2019



**Abstract:** In the battle against cancer cells, therapeutic modalities are drastically limited by intrinsic or acquired drug resistance. Resistance to therapy is not only common, but expected: if systemic agents used for cancer treatment are usually active at the beginning of therapy (i.e., 90% of primary breast cancers and 50% of metastases), about 30% of patients with early-stage breast cancer will have recurrent disease. Altered expression of ion channels is now considered as one of the hallmarks of cancer, and several ion channels have been linked to cancer cell resistance. While ion channels have been associated with cell death, apoptosis and even chemoresistance since the late 80s, the molecular mechanisms linking ion channel expression and/or function with chemotherapy have mostly emerged in the last ten years. In this review, we will highlight the relationships between ion channels and resistance to chemotherapy, with a special emphasis on the underlying molecular mechanisms.

**Keywords:** ion channels; cancer; chemoresistance

## 1. Introduction

Cancers cells have the ability to develop resistance to traditional therapies. Drug resistance may be intrinsic (i.e., present before chemotherapy exposure), but tumor cells can also acquire drug resistance. Indeed, although systemic agents used for cancer treatment (cytotoxic, hormonal, and immunotherapeutic agents) are usually active at the beginning of therapy (90% of primary breast cancers and 50% of metastases for instance), about 30% of patients with early-stage breast cancer will have recurrent disease. Resistance to therapy is not only common, but expected [1]. Tumor cells from recurrent tumors exhibit increased resistance to chemotherapeutic drugs [2], and exposure to chemotherapeutic drugs can promote development of drug resistance in tumor cells, leading to subsequent failure of the chemotherapeutic treatment [3], thus drastically limiting effective therapeutic modalities. Residual tumor cells are detected post-treatment in most cancer patients, and these cells are thought to remain in a quiescent state for years before resuming growth, resulting in tumor recurrence. Deciphering molecular mechanisms of this acquired cellular resistance is therefore mandatory for

predicting tumor resistance and to allow discovery of new treatments. Several mechanisms underlying cell resistance have been identified so far. Among those, membrane transporters and ion channels have been shown to play key roles in chemosensitivity. These include [4]:

- Decreased activity of the uptake transporters, or alternatively enhanced efflux for water-soluble drugs (such as cisplatin)
- Increased drug efflux mediated by energy-dependent transporters. For hydrophobic drugs (such as vinblastine, doxorubicin, and paclitaxel), entry occurs largely by diffusion across the membrane, although this process can also be critically enhanced by transport proteins
- Indirect mechanisms by which transporters and channels affect chemosensitivity by modulating apoptosis pathways or the efficiency of drug diffusion along electrochemical gradients into cells

This review will more specifically focus on ion channels. Altered expression of ion channels is now considered as one of the hallmarks of cancer [5], and several ion channels have been linked to cancer cell resistance. While some ion channels have been associated with chemoresistance since the 80s [6], extensive description of molecular mechanisms involved in chemoresistance is more recent (early 2000s [7], with the vast majority of scientific articles being published after 2010). In this review, we will highlight the relationships between channels (calcium, potassium, magnesium and chloride channels) and resistance to chemotherapy, with special emphasis on the underlying molecular mechanisms.

## 2. Calcium Channels

### 2.1. Plasma Membrane $Ca^{2+}$ Channels

Calcium ( $Ca^{2+}$ ) is a well-known ubiquitous second messenger regulating a wide variety of physiological functions [8,9], including cell death [10]. Disruption of  $Ca^{2+}$  homeostasis was reported in many pathological conditions, including cancer [11,12]. There is a ~10,000-fold concentration gradient for  $Ca^{2+}$  across the plasma membrane, and three major classes of membrane-associated proteins directly involved in  $Ca^{2+}$  regulation: channels, pumps (ATP-ases), and exchangers. These proteins have different cellular and tissue distribution and their regulation occurs through multiple signalling pathways ([13] for review). Extracellular  $Ca^{2+}$  can enter cells by several classes of channels, including:

- Voltage-operated channels, activated by membrane depolarization
- Second messenger-operated channels, activated by small messenger molecules such as inositol phosphates, cyclic nucleotides, and lipid-derived messengers (diacyl-glycerol, arachidonic acid and its metabolites)
- Receptor-operated channels, activated by direct binding of a neurotransmitter or hormone agonist
- Store-operated channels (SOC), activated by depletion of intracellular  $Ca^{2+}$  stores [14]

SOC Entry (SOCE) is one of the main calcium entries in non-excitabile cells, and typically allows calcium influx through the plasma membrane, subsequently to endoplasmic reticulum depletion. This ubiquitous SOCE pathway is not only necessary to refill internal calcium stores, but also to activate downstream signalling cascades [15,16]. Apoptosis is also potentially triggered when a large and sustained rise in cytosolic calcium occurs through SOCE (mediated by store-operated channels SOCs [17–19]). Actors of this mechanism include depletion sensors (STIM reticular proteins, the STIM1 and STIM2 isoforms), as well as plasma membrane channels. Among these, Orai channels represent highly selective calcium channels (with 3 distinct Orai isoforms described to date, Orai1, Orai2 and Orai3), while TRP (Transient Receptor Potential) channels are non-selective calcium channels.

$Ca^{2+}$  entries can also occur without any stimulation, suggesting that some  $Ca^{2+}$  channels are constitutively active in resting conditions. Interestingly, these basal  $Ca^{2+}$  influxes are linked to malignant transformation, but the underlying molecular mechanisms are far from being understood ([20], for review).

In addition, under certain conditions,  $\text{Ca}^{2+}$  can enter cells via the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger (NCX) operating in reverse mode. Cytosolic calcium concentration can also rise following endoplasmic reticulum depletion (see Section 2.2. Intracellular Calcium Stores below).

Chemoresistance has been first associated with  $\text{Ca}^{2+}$  channel activity in the 80s. Blockade of  $\text{Ca}^{2+}$  channels was associated with the enhancement of anticancer drug cytotoxicity ([21], for review). It was notably demonstrated that combination of verapamil (a calcium channel blocker) with antineoplastic agents was able to potentiate the efficacy of chemotherapeutic agents in drug-sensitive malignancies, and was also able to confer chemosensitivity in resistant tumor cells [22]. However, there was inconclusive evidence for the role of  $\text{Ca}^{2+}$  ions and  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the modulation of chemoresistance, and furthermore, there was no evidence that  $\text{Ca}^{2+}$  channels blocking activity per se was necessary for the reversal of drug resistance [21]. Although  $\text{Ca}^{2+}$  channels blockers have been studied in combination with chemotherapeutic drugs for several decades, it is noteworthy that the mechanism of action for these  $\text{Ca}^{2+}$  blockers in inhibiting the growth of some drug-resistant tumors was entirely independent of  $\text{Ca}^{2+}$  channels modulation, and instead appeared to be related to non-specific interactions with the MultiDrug Resistance-1 (MDR1) protein ([23] for review). For instance, Kiwit et al. have shown that calcium antagonists did not influence chemoresistance in gliomas that do not express MDR1. On the other hand, addition of calcium antagonists to the adjuvant chemotherapy could overcome primary chemoresistance only in tumors expressing the multidrug-resistant phenotype [24].

Since the beginning of the 2010s, a growing number of studies have shown a clear link between  $\text{Ca}^{2+}$  channels expression (and/or function) and sensitivity to chemotherapeutic drugs. Many calcium channels are involved in chemoresistance, against a number of chemotherapeutic drugs, in a large variety of cancers. We will more specifically focus on the main calcium entry, SOCE, and its key actors, the Orai and TRP channels.

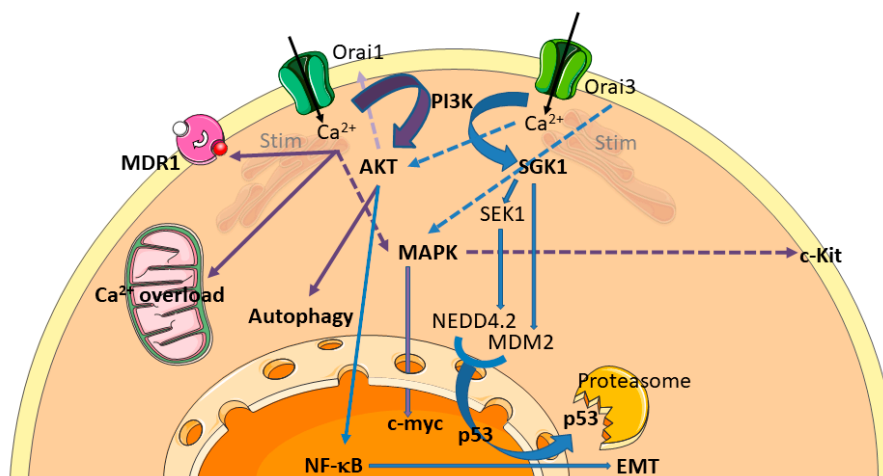
#### 2.1.1. Orai/Stim Mediated SOCE and Chemoresistance

Depending on cancer cell lines and chemotherapeutic drugs, SOCE can lead to increased or decreased resistance. First, because each cell line differentially express Orai and Stim proteins. Second because both Orai1 and Stim1 were shown to regulate the activity of a number of intracellular effectors including PKC  $\beta$ 2 [25], PKC  $\delta$  [26], extracellular signal-related kinases ERK1/2 [27], and both cytoplasmic kinase Pyk2 and calpain [28]. Third, both Orai1 and Stim1 were shown to have SOCE independent functions. For instance, the Secretory Pathway  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SPCA2 can activate Orai1 independently of ER calcium stores or Stim proteins [29]. Within such a complex regulatory network and the role of Orai1/Stim1 downstream targets in both pro-survival and pro-apoptotic processes, the resistance of each cell line is likely to depend on the activated signalling pathway [30].

#### Increased Resistance Conferred by the Overexpression of Stim and Orai Proteins

Numerous studies have now established a clear link between the Orai/Stim complex and cell resistance, although the mechanisms are not always accurately described. For instance, Stim1-mediated SOCE protects osteosarcoma cells from undergoing cisplatin-induced apoptosis. Knockdown of Stim1 effectively sensitizes cells to cisplatin via promoting Endoplasmic Reticulum (ER) stress-mediated apoptosis [31]. In pancreatic adenocarcinoma, both Stim1 and Orai1 mediate SOCE and have a pro-survival anti-apoptotic role, as Orai1 and/or Stim1 silencing by siRNA enhance 5-Fluoro-Uracile (5-FU) and gemcitabine induced apoptosis [30]. Mechanisms by which the Orai/Stim complex affects chemoresistance include MDR transporters and intracellular signalling pathways (Figure 1). The overexpression of the transporter MDR1 is one of the best known mechanisms by which breast cancers cells develop chemoresistance [32]. It has notably been shown that high salts were able to induce MDR1 mediated treatment resistance in breast cancer cells through SOCE [33]. It has also been shown that Orai1 and Stim1 expression are increased in chemoresistant ovarian carcinoma cells, associated to an increase of SOCE. During the acquisition of the chemoresistant phenotype, Orai1 expression is upregulated by the Akt signalling pathway, leading to an increase of SOCE [34].

Furthermore, Orai1 expression is also elevated in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues, and contributes to a chemoresistant phenotype. Orai1-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is able to block 5-FU-induced autophagic cell death in HepG2 cells via activation of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway [35]. In human gastrointestinal stromal tumors, Orai1 is able to mediate tumor-promoting SOCE via c-KIT and the ERK pathway [36]. Whilst far less studied than its sibling Orai1, Orai3 protein deserves special attention, because of (i) its exclusive presence in mammals [37], (ii) its receptivity to pharmacological modulation [38], and (iii) its recent emergence in the cancer field, especially in breast cancer. Many data establish now a clear link between Orai3 and chemoresistance (Figure 1). Orai3 was primarily described as involved in proliferation, cell cycle progression, and Estrogen Receptor positive (ER<sup>+</sup>) breast cancer cells survival [39]. In these cells, SOCE is dependent on Orai3 expression, whereas Estrogen Receptor negative (ER<sup>-</sup>) cells depends on Orai1 [40]. In such ER<sup>-</sup> cells, Bhattacharya et al. [41] have shown that Orai3 and Stim1 were able to mediate TGF- $\beta$  induced expression of Snai1, a transcriptional repressor protein known to mediate Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT), a cell state transition process implicated in drug resistance [32]. This process was AKT and NF- $\kappa$ B (p65)-dependent [41]. In ER<sup>+</sup> breast cancer cells, Orai3-dependent survival was found to be transduced—at least in part—via the ERK and c-myc pathway [42]. Overexpression of Orai3 protein in ER<sup>+</sup> breast cancer cells revealed consistent chemoresistance against cisplatin, 5-FU and paclitaxel treatments. The main effect of Orai3 upregulation was a SOCE-induced downregulation of the tumor suppressor protein p53, leading to reduced apoptosis [43]. The complete pathway leading to p53 downregulation was extensively deciphered: increased SOCE is able to activate PI3K, but not Akt. Instead, the Sgk1 pathway is specifically activated, leading to Mdm2 activation and p53 downregulation. Sgk1 activation is also responsible for the inactivation of the Sek-1 kinase, and therefore to an hypo-phosphorylated and thus activated Nedd4.2 ubiquitin ligase, able to decrease p53 protein expression [43]. All these results are summarized in Figure 1 and in Table S1.



**Figure 1.** Chemoresistance pathways involving Orai calcium channels. Orai calcium channels are able to modulate sensitivity to chemotherapy. Processes known to alter chemoresistance are highlighted in bold. These include calcium overload, MultiDrug Resistance (MDR), autophagy, modulation of signalling pathways (MAPK and PI3K-Akt/Sgk), transcription factors (NF- $\kappa$ B, c-myc, p53), and EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition). Processes initiated by Orai1 and Orai3 are summarized by purple and blue arrows, respectively. The dashed arrows are not different from plain arrows, except that they cross other arrows.

#### Reduced Resistance Conferred by the Overexpression of Stim and Orai Proteins

Resistance to apoptosis can also be acquired through a remodeling of the  $\text{Ca}^{2+}$  protein network that will reduce the likelihood of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  overload. In androgen-independent, apoptosis-resistant prostate cancer cells, such remodeling was shown to involve reduced SOCE via downregulation

of Orai1 or Stim1 proteins, and adaptation of the ER to the conditions of reduced  $\text{Ca}^{2+}$  storage and uptake [18,44]. In prostate cancer cells, low Orai1 expression was shown to contribute to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype, irrespective of the apoptosis-inducing stimulus [17]. Orai3 overexpression in prostate cancer cells is able to impair the Orai1-mediated SOCE and causes prostate cancer cell resistance [45].

### 2.1.2. Transient Receptor Potential (TRP) Channels

Transient Receptor Potential (TRP) channels are non-selective cation channels that can allow  $\text{Ca}^{2+}$  influx. The major groups of TRP channels include, among others, TRPM (Melastatin), TRPV (Vanilloid), and TRPC (Canonical). These channels have been associated with chemoresistance in many cancers since a decade [46,47].

TRPV—It has recently been shown that 5-FU induced breast cancer cell death was up-regulated by TRPV1 activation [48]:  $\text{Ca}^{2+}$  entry through TRPV1 is able to decrease chemoresistance. Nabissi et al. have shown that treatment with the TRPV2 agonist cannabidiol, by enhancing TRPV2 expression and activation, increased the chemosensitivity of human glioblastoma cells to the cytotoxic effects of various chemotherapeutic agents commonly used in the treatment of glioblastoma (temozolomide, carmustine and doxorubicin). Abrogation of chemoresistance was obtained by increased calcium influx through TRPV2 channel leading to a calcium-dependant cell death [49]. Moreover, cannabidiol and the proteasome inhibitor bortezomib synergise to increase cytotoxicity in multiple myeloma cell lines through TRPV2 activation [50]. Taken together, these data suggest that TRPV2 activation can potentiate the effects of cytotoxic drugs in various cancer types.

TRPM—In gastric cancer, Almasi et al. have shown that TRPM2 channel expression is negatively correlated with overall patient survival. Moreover, TRPM2 downregulation sensitized gastric cancer cells to paclitaxel and doxorubicin. Indeed, TRPM2, by activating both Akt and JNK signalling pathways, promote gastric cancer cell survival [51]. It has been shown that TRPM2 knockdown activates alternative pathway of cell death in breast cancer cells, leading to enhanced cytotoxicity after treatment with doxorubicin or *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine [52]. In a similar manner, knockdown of TRPM8 was able to enhance epirubicin-induced apoptosis in osteosarcoma cells, and this effect was mediated through impaired regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and the Akt-GSK-3 $\beta$  pathway [53].

TRPC—Downregulation of TRPC1 was shown to contribute to drug resistance in ovarian cancer, possibly by regulating autophagy [54]. Autophagy can be also mediated by TRPC5 and promotes drug resistance via CaMKK $\beta$ /AMPK $\alpha$ /mTOR pathway in breast cancer cells [55]. The TRPC5 channel has been largely associated with drug resistance in several cancers. TRPC5 can regulate  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis by forming a store-operated channel or a store independent channel. In addition, TRPC5-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is elicited by several physiological messengers, including reduced thioredoxin, protons, sphingosine-1-phosphate, lysophospholipids, NO and  $\text{Ca}^{2+}$  itself (see [56] for review). TRPC5 can confer chemoresistance to anticancer drugs in breast cancer. It has been shown that TRPC5 was essential for MDR1 induction in drug-resistant cancer cells [57], notably through activation of the transcription factor NFATc3 [58]. TRPC5 might even act as a non-invasive chemoresistance marker, since increasing circulating exosomes-carrying TRPC5 predicts chemoresistance in metastatic breast cancer patients [59]. In colorectal cancer, TRPC5 overexpression induces the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway and the up-regulation of MDR1 [60]. The same team demonstrated the essential role of glycolysis in TRPC5 induced chemoresistance in human colorectal cancer cells by maintaining  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis [61].

In HCC cells, inhibiting TRPC6 enhanced the efficacy of doxorubicin. Moreover,  $\text{Ca}^{2+}$  was found to be essential in mediating mechanisms of EMT, HIF-1 $\alpha$  signalling and DNA damage repair, conferring multidrug resistance in HCC cells. Multidrug resistance was attributed to the sustained accumulation of intracellular free  $\text{Ca}^{2+}$  induced by TRPC6 overexpression. The pathway by which TRPC6 is able to induce multidrug resistance in these cells was demonstrated to be STAT3-dependent [62]. In a

variety of other cancer cell lines (breast, prostate, bone, skin, lung), TRPC6 expression was on the contrary shown to lead to  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptotic death and activation of apoptotic genes. Using the antineoplastic drug GaQ3 (an organic derivative of gallium), Madan et al. demonstrated that these apoptotic pathways were activated by the transcriptional upregulation of TRPC6 (and hence intracellular calcium) by p53 [63].

Mechanisms concerning the involvement of TRP channel in chemoresistance are provided in Table S1.

### 2.1.3. Voltage-Gated Calcium Channels and Chemotherapy

Voltage-gated calcium channels (VGCC) are expressed throughout the body and perform several key physiological functions. In small cell lung cancer (SCLC), cells expressing the voltage-dependent calcium channel  $\alpha 2\delta 1$  subunit (isolated from SCLC cell lines or patient-derived xenograft models) exhibit cancer stem cells characteristics and chemotherapeutic resistance. Treatment with etoposide enhanced the cell populations expressing  $\alpha 2\delta 1$  in vitro and in vivo. Chemoresistance in these SCLC cell lines was shown to be mediated by the ERK pathway [64]. Moreover, the suppression of expression or activity of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel induce apoptosis and hence allow resistance of ovarian cancer cells to chemotherapeutic treatments [65]. Apoptosis was accompanied by decreased Akt phosphorylation and alterations in FOXO and FOXM1 expression. Table S1 succinctly summarizes this information.

## 2.2. Intracellular Calcium Stores

Like extracellular calcium, intracellular calcium plays a decisive role in chemoresistance processes. Several intracellular organelles are implicated in such mechanisms, notably endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria. Due to its closed proximity to the mitochondria,  $\text{Ca}^{2+}$  transport mechanisms from the ER to the mitochondria are allowed by the interaction of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), the Glucose-Regulated Protein 75 and the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) and the Mitochondrial Calcium Uniport (MCU). Since the MCU is the primary mediator of the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake, its expression and function in cancer processes have been extensively investigated over the last ten years. Overexpression of MCU has been correlated to breast cancer progression [66], but its role in chemoresistance processes remains poorly understood. The amount of  $\text{Ca}^{2+}$  transferred from the ER to mitochondria impacts the sensitivity of cells to apoptotic stimuli and their resistance to apoptosis [67]. Moreover, it has been demonstrated that cancer cells escape cell death by lowering the ER  $\text{Ca}^{2+}$ -store, due to a  $\text{Ca}^{2+}$  transfer between ER and mitochondria [68].

### 2.2.1. Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Channels Expression Is Associated to Chemoresistance

Due to the close interaction with mitochondria, and its role in the regulation of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  load,  $\text{IP}_3\text{R}$  expression and/or activation have been associated to cancer cell survival and chemoresistance [69]. In bladder cancer cells,  $\text{IP}_3\text{R}1$  expression level has been inversely correlated to cisplatin-resistance: resistant cells express reduced  $\text{IP}_3\text{R}1$  level, and  $\text{IP}_3\text{R}1$ -knockdown prevents apoptosis, leading to cisplatin resistance. On the other hand,  $\text{IP}_3\text{R}1$  overexpression in resistant cells induces apoptosis and increases sensitivity to cisplatin [70]. Conversely, high  $\text{IP}_3\text{R}$  expression levels were associated to low resistance of epithelial pulmonary lung cancer cells to cisplatin treatment [71].

As a key regulator of the ER-mitochondrial interaction, the anti-apoptotic Bcl-2 protein is the subject of utmost attention. The Bcl-2-family members, which are generally divided into three categories (anti-apoptotic proteins, pro-apoptotic executioners and pro-apoptotic BH3-only proteins), act at two different intracellular compartments: the mitochondria and the ER [72]. Mechanistically, anti-apoptotic family members prevent cell death by sequestering the BH3 domains and by preventing their interaction with pro-apoptotic Bax/Bak proteins [73,74]. Small molecules (like BH3 mimetics) can disrupt this interaction, resulting in apoptotic cell death of cancer cells. Bcl-2 expression has been correlated to tumor growth enhancement and to chemoresistance [75] by increasing the passive  $\text{Ca}^{2+}$  leak from the ER [76]. Interestingly, the anti-apoptotic protein Bcl-2 expression level seems

to be a determinant for cancer cell sensitivity to cisplatin [77]. In non-small cell lung cancer and bladder cancer, cisplatin sensitivity could be enhanced by downregulating Bcl-2 [78,79]. In addition, Bcl-2 downregulation in SK-OV-3 ovarian cancer cells increases  $\text{Ca}^{2+}$  levels in the cytosol and in the mitochondria, as well as the number of ER–mitochondrial contact points after cisplatin treatment, thereby increasing the sensitivity to the chemotherapeutic agent [80].

### 2.2.2. Chemotherapy Modulates Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Channels Activity

Numerous studies have demonstrated that intracellular channels/transporters/pumps expression is altered in cancers, leading to intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis perturbation. However, the impact of chemotherapeutic agents on the activity of these intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  channels is less described. Zhang et al. established that paclitaxel accelerates spontaneous  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations by increasing the  $\text{IP}_3\text{R}$  opening frequency in the presence of Neuronal Calcium Sensor-1, a  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein [81]. Moreover, Boutin et al. have demonstrated that PKA-induced  $\text{IP}_3\text{R1}$  over-activation triggers  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$  decrease: this mechanism allows the prostate cancer cell line LNCAP to survive androgen deprivation [82]. Recently, Kang et al. demonstrated that Trifluoperazine, a well-known antipsychotic drug with anticancer effects [83–86], inhibits glioblastoma invasion by binding to the  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein, calmodulin subtype 2 (CaM2). This binding dissociates CaM2 from  $\text{IP}_3\text{R1}$  and  $\text{IP}_3\text{R2}$  leading to massive and irreversible  $\text{Ca}^{2+}$  release from intracellular stores by  $\text{IP}_3\text{R1}$  and  $\text{IP}_3\text{R2}$  subsequent opening [87].

### 2.2.3. Signalling Pathways Involved in Chemoresistance Related to Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Channels

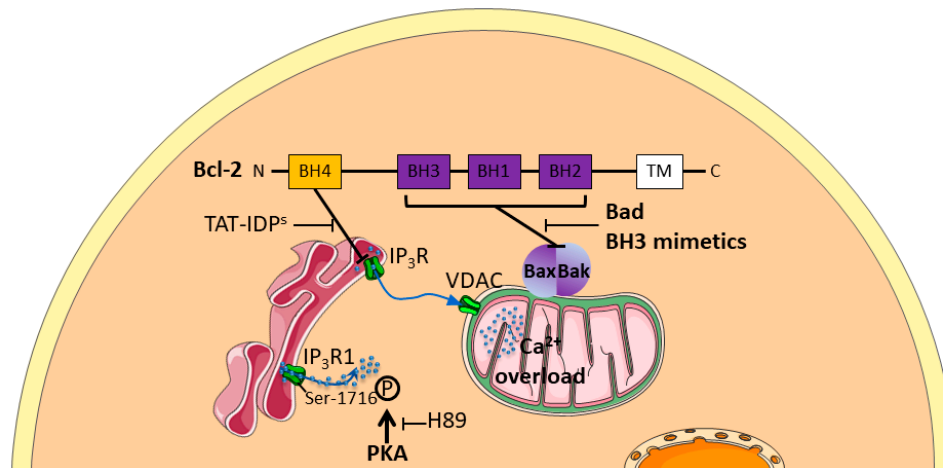
Mechanisms of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pathways involved in chemoresistance are poorly understood, but few teams have succeeded in deciphering the communication between ER and mitochondria in such processes. In ovarian cancer cells, TAT-fused inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-derived peptide (TAT-IDP<sup>S</sup>), which targets the BH4 domain of Bcl-2, enhances the cytotoxicity of cisplatin by stimulating  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from the endoplasmic reticulum (ER) into the cytosol and the mitochondria, which further increased cisplatin-induced ER stress-mediated apoptosis by enhancing calpain-1 expression and by activating the mitochondrial apoptotic pathway [88]. Conversely, Bcl-2 attenuates cisplatin-induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from the ER into the cytosol and the mitochondria, thus inhibiting cisplatin-induced ER stress-mediated apoptosis and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. In this context, decreased ER mitochondrial crosstalk is responsible for Bcl-2 attenuation of cisplatin-induced mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in SKOV3 cells [89]. All these results are summarized in Figure 2 and compiled in Table S1.

Chemoresistance mechanisms have thus been described through phosphorylations inducing overactivation of  $\text{IP}_3\text{R1}$ . Various pharmacological strategies by blocking Bcl-2 inhibition (TAT-IDPs or Bad/BH3 mimetics) or PKA inhibitors (such as H89) have already been suggested to counteract such chemoresistance processes [88,89].

### 2.2.4. Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Channels: Targets to Overcome Chemoresistance

Because of their inaccessibility to pharmacological agents, intracellular channels or receptors do not appear as priority target to overcome chemoresistance. Nevertheless, it has been shown that BH3 binding and the amount of Bim scaffolded by anti-apoptotic Bcl-2 proteins can be used as a predictive marker for the apoptotic response of cancer cells to chemotherapy [90]. It is proposed that cancer cells, in which the mitochondria contain high levels of Bcl-2 and Bim, are most sensitive to toxic stimuli, including chemotherapeutic drugs [91,92]. Hence, from these studies, it seems that the mitochondrial apoptotic priming can predict the tumor response to cytotoxic chemotherapy [91,92]. The mitochondrial priming state is thereby not the same in all malignancies [93]. For instance, cancers that are highly primed are those that respond most favorably to chemotherapy (e.g., blood cancers, including Chronic Lymphocytic Leukemia), whereas those that are unprimed respond poorly to

chemotherapy (endometrial and renal cell carcinomas, serous borderline tumors) [90]. In the latter cases, the therapeutic window for using chemotherapy is very limited [72]. The number of studies published on the role of intracellular calcium channels or receptors in tumoral progression has increased over the last ten years, and may lead to them being considered as new targets for chemotherapy.



**Figure 2.** Schematic representation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  pathways involved in chemoresistance. Anti-apoptotic Bcl-2 protein enhances chemoresistance by a dual role at both the Endoplasmic Reticulum (ER), by inhibiting  $\text{Ca}^{2+}$  depletion through Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ), and the mitochondria by inhibiting apoptotic complex Bax/Bak formation. TAT-fused inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-derived peptide (TAT-IDP<sup>S</sup>), by inhibiting BH4 domain, enhances  $\text{Ca}^{2+}$  efflux from the ER through  $\text{IP}_3\text{Rs}$  to mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC).

### 3. Potassium Channels

Among ion channels, potassium channels compose the largest family, presenting 78 sequences coding for alpha pore forming subunit [94]. Besides regulating many physiological functions (membrane potential, cell volume, excitability . . . ), their involvement in cancer progression is now clearly established (e.g., proliferation, migration or invasiveness capacities, apoptosis resistance and angiogenesis, see [95–97] for review). By using a  $\text{K}^+$  ionophore, amphotericin B, the study reported by Sharp et al., was one of the first showing the importance of  $\text{K}^+$  flux in cisplatin resistance in ovary carcinoma [98]. In the 2000s, Liang et al. showed that cisplatin induced biophysical modifications of the membrane (lipid composition, fluidity), and cisplatin-resistant epidermal carcinoma cells present hyperpolarizing membrane potential compared to the sensitive parental cells [99]. Moreover, Marklund et al. [100,101] reported that both reduction of intracellular  $\text{K}^+$  concentration or addition of  $\text{K}^+$  flux modulators (amphotericin B and bumetanide) regulated cisplatin-induced apoptosis. These early results suggested that the activity of  $\text{K}^+$  channel was associated to therapeutic resistance. Since this demonstration, numerous groups detailed more precise mechanisms involving  $\text{K}^+$  channel in chemoresistance.

#### 3.1. Correlation between the Expression Levels of $\text{K}^+$ Channels and Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs

Several studies have reported a correlation between the expression levels of  $\text{K}^+$  channels and the sensitivity to cytotoxic drugs. Both overexpression and reduction of  $\text{K}^+$  channels expression are involved in chemosensitivity. For example, using big data analysis, Liu et al. demonstrated an association between the reduction of *KCNN3* expression (a gene encoding for the SK3  $\text{K}^+$  channel) and drug resistance of ovarian cancer [102]. Similar associations were reported on the classically used cisplatin [103]. Indeed, the decreased *KCNMA1* (also referred to as BKCa—Calcium activated large conductance potassium channel—or maxi K channel) expression (involving potentially miR-31) was described to be associated to less sensitivity to this platinum-based chemotherapy in ovarian



cell lines. In the same way, an association between the reduction of hERG (Kv11.1) expression and increased resistance to vincristine, paclitaxel and hydroxy-camptothecin is reported for different cancer cells [104]. Using similar approaches, Han et al. demonstrated that the voltage activated potassium channel Kv1.5 could participate in the cellular response of gastric cancer cells to adriamycin, and that a downregulation of the channel expression could promote the multidrug phenotype of these cells [105]. Additionally, the Leanza group demonstrated, in several cancer cell lines, a similar relationship between reduced expression of Kv1.1 and Kv1.3 and decreased sensitivity to drugs, provoking mitochondrial-induced apoptotic death [106]. Another study conducted using small cell lung carcinoma cells demonstrated a relation between K<sup>+</sup> channel expression profile and drug resistance [107]. More precisely, authors demonstrated that the expression level of BKCa and Kv channels was inversely correlated to the MRP1 expression levels. They hypothesized that this observation could be a consequence of exposition to doxorubicin, which modulate the transcription factor c-jun (known to affect expression of both MRP1 and Kv channels). In this work, the relationship between K<sup>+</sup> channel repression and chemosensitivity should be an acquired mechanism of resistance.

On the contrary, there are different cases described with association between overexpression and resistance to therapy. For example, an association between an upregulation of hEag1 (Kv10.1) and TWIK-2 channels and an increase of cisplatin resistance was shown by Liang et al. [108]. However, these authors described that channels are overexpressed but they did not obtain mechanistic association between the channel function and the efficiency of cisplatin in the epidermal and liver carcinoma cells tested. Arcangeli's group showed higher levels of KCa3.1 and Kv11.1 channels in cisplatin-resistant colorectal cancer cells compared with their cisplatin-sensitive counterparts. In resistant cells, the treatment by riluzole (an activator of KCa3.1 and also an inhibitor of hERG) overcomes cisplatin resistance in both in vitro and in vivo models [109]. Pardo's group demonstrated also that, depending on the clinical status, acute myeloid leukemia cells could express hEag1 and the inhibition of this channel improves the apoptosis induction by different chemotherapeutic drugs, suggesting the involvement of this channel in basal resistance [110]. hEag1 was also involved in chemoresistance in ovarian cancer cells. By using immunohistochemistry on tissue samples from patients treated with cisplatin-based adjuvant chemotherapy, Hui et al. found that a decreased hEag1 expression was correlated with a favorable prognosis and also predicts higher sensitivity to cisplatin treatment [111]. They also found that hEag1 silencing facilitated the sensitivity of ovarian cancer cells to apoptosis induced by cisplatin through the NF- $\kappa$ B pathway. They thus proposed hEag1 as a potential indicator to predict chemosensitivity.

### 3.2. Chemotherapy Modulates K<sup>+</sup> Channel Activity

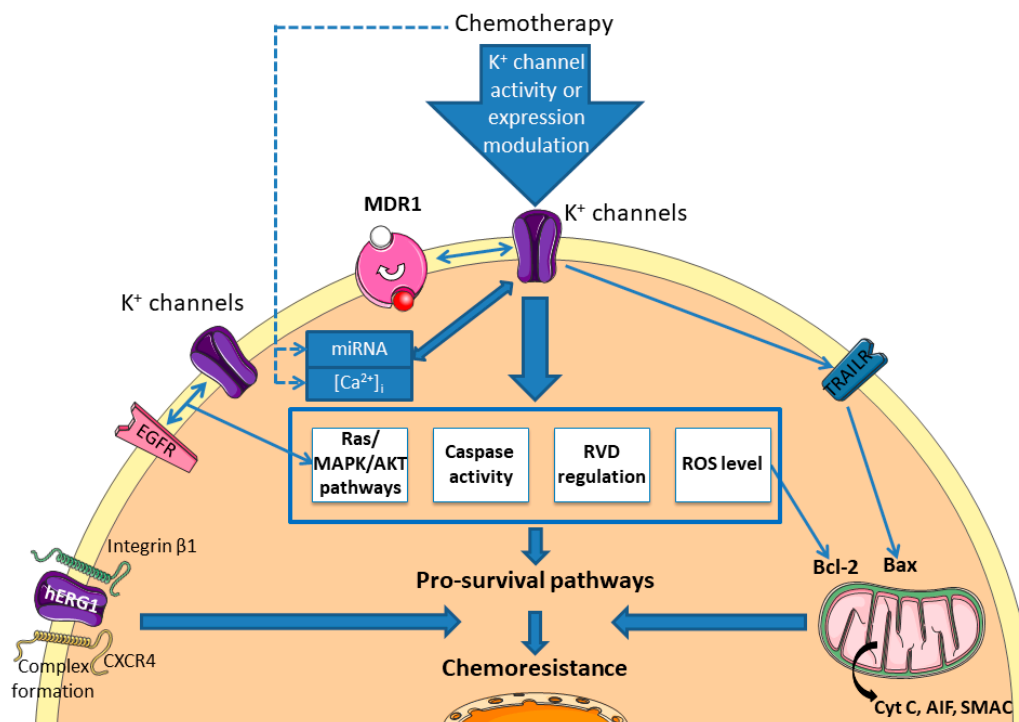
Chemotherapy can also alter the activity of K<sup>+</sup> channels without affecting their expression. Chemotherapy drugs may increase or decrease the K<sup>+</sup> channel activity depending on cancer types and drugs nature. In human lung epidermoid cancer cells, cisplatin activates the KCa3.1 channel without affecting its expression levels [112]. This activating effect of cisplatin on KCa3.1 may be due to the increase in intracellular calcium concentration by cisplatin. Results from our laboratory demonstrated similar implication of intracellular calcium concentration on chemoresistance in breast cancer ([43], section Ca<sup>2+</sup> channel). In addition, it has also been observed in human carcinoma HeLa-S3 cells, that Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> channels is necessary for cisplatin-induced activation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel inhibited by charybdotoxin (BKCa channel) [113]. Also, Jirsch et al. presented in small cell lung cancers cells an increase activity of inwardly rectifying potassium channel associated to increased resistance [114]. The reduction of the activity of KCa3.1 has been demonstrated in both glioma cells (13-06-MG) and colon cancer cells (LoVo) by an oxaliplatin treatment, but not with cisplatin. Indeed, oxaliplatin decreases the KCa3.1 channel open probability [115].

### 3.3. Signalling Pathways Involved in Chemoresistance Related to $K^+$ Channels

Some groups tried to further detail the cellular mechanisms linking  $K^+$  channels to chemotherapeutic resistance. Chemotherapeutic resistance could be assigned to numerous cellular processes [116]. Among them, links with  $K^+$  channels were reported in the modification of apoptosis regulation, feedback regulation through miRNA or even the relationship between tumour and microenvironment cells.

It is now well known that  $K^+$  channels are involved in the regulation of the apoptosis mechanism through the control of mitochondrial membrane potential, the regulation of cell volume and the availability of  $K^+$  regulating caspase activity [117]. Indeed, different studies report that  $K^+$  channels are located in the mitochondrial membrane where they are involved in mitochondrial functions. Checchetto et al. reviewed the role of the major mito $K^+$  channel types described ( $Kv1.3$ ,  $Kv1.5$ ,  $K_{ATP}$ ,  $BKCa$ ,  $KCa3.1$ ,  $TASK3$ ) and their involvement in cell death [118]. For example, the calcium-activated potassium channel  $KCa3.1$  has been linked to the melanoma cell response in the presence of vemurafenib [119]. It was previously demonstrated that this BRAF inhibitor promotes apoptosis through a ROS-dependent pathway, which is prevented by the  $\alpha$ -tocopherol. In the study by Bauer et al., it was demonstrated that the combination of TRAM-34 with vemurafenib induced an apoptotic pathway presenting general control through the anti-apoptotic and pro-apoptotic Bcl-2 family. Additionally, to the modification of MMP's functions, they showed that early events are the production of ROS, which is crucial in the apoptotic cascade of this model. TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) is a recent therapeutic opportunity to treat aggressive melanoma that presents high selectivity to cancer cells but also applicability limitations due to development of resistance. Quast et al. showed that the  $KCa3.1$  inhibition by using TRAM-34 could also overcome the resistance to TRAIL in melanoma cell lines [120]. The same authors also deciphered the apoptotic pathway, which involves activation of caspases 3, 8 and 9, modification of the mitochondrial membrane potential, a dependency to Bax, and the release of mitochondrial factors like cytochrome c, AIF and SMAC (Figure 3). It is worth noting that the cellular response involving  $K^+$  channel is very specific of the cellular type involved.  $KCa3.1$  channel can also be involved in cisplatin sensitivity. Using the epidermoid cancer cell model, Lee et al. demonstrated that the activity of  $KCa3.1$  is necessary to the cisplatin-induced death [112]. In this model, authors showed that the channel participates in the control of the Regulatory Volume Decrease (RVD) and caspase3/7 activity, two processes implicated in the apoptotic mechanism. In the same manner, it has been reported that the activity of the hERG channel is important for cisplatin-induced death of gastric cells [121]. This work demonstrated that cisplatin exposure increases the expression of hERG and that the activity of this channel is necessary in cisplatin-induced death of the different cell lines used. In addition, authors demonstrated that the activity of the channel is important to the caspase dependent apoptotic pathway through the regulation of Bax/Bcl-2 axis and active caspase 3. Their results were confirmed by using animal model where they also demonstrated the involvement of the hERG channels in the cisplatin-induced apoptosis. Using cisplatin-resistant colorectal cancer cell, Pillozzi et al. showed that the combined activation of  $KCa3.1$  and inhibition of  $Kv11.1$  by riluzole reduced the level of p-Akt and p-ERK and increased caspase-3, demonstrating a synergic effect with cisplatin to overcome the resistance to this chemotherapeutic agent [109]. In addition, they demonstrate that the modification of the channel activity allowed an increase in the incorporation of platinum salt in the cell to promote its activity.

To the best of our knowledge, only one report described the implication of  $K^+$  channel in the modulation of the EGFR-Ras-Raf signalling pathway and an association with chemosensitivity (Figure 3). In side population of lung cancer stem cells, Choi et al. demonstrated that the use of different  $K^+$  channel modulators affect the gefitinib efficiency to kill lung cancer cell line [122]. Indeed, application of 4-aminopyridine ( $Kv$  blocker), TetraEthylAmmonium ( $Kv$  blocker) or flupirtine ( $Kv7$  opener) in combination with gefitinib decreases drastically cell viability compared to the use of the compound alone. This effect is correlated to the reduction of p-EGFR, total Ras, p-Raf and p-ERK1/2, compared to the gefitinib condition alone.



**Figure 3.** Chemoresistance pathways involving  $K^+$  channels.  $K^+$  channels could modulate the sensitivity to different chemotherapies by regulating pro-survival pathways (intrinsic or extrinsic apoptosis pathways, volume regulation, Akt/RAS/MAPK pathways, interacting with receptors or transporters). MDR: Multidrug Resistance Protein; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor type 4; TRAILR: TRAIL Receptor; Cyt C: Cytochrome C; AIF: Apoptosis Inducing Factor; SMAC: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases; RVD: Regulatory Volume Decrease.

Among the different molecular mechanisms described in the literature, some articles reported a close link between miRNA,  $K^+$  channel, and chemoresistance (Figure 3). For instance, by using immunohistochemistry, different SCLC cell lines resistant to chemotherapeutic drugs and preclinical in vivo model, Liu et al. demonstrated the involvement of the Kir2.1 channel in drug resistance [123]. First, they described that overexpression of the channel is responsible for the increase of the MRP1/ABCC1 protein in the different cell lines tested and that the level of the channel and of the MDR are correlated with clinical parameters. Second, they evaluated different putative regulators of the channel. They have shown that (i) Kir2.1 expression is modulated by the RAS/MAPK pathway, (ii) Kir2.1 channel is directly regulated by the miR-7, already described in the chemoresistance process. They thus described that miR-7 (downregulated in SCLC) and RAS/MAPK pathway promote directly the expression of Kir2.1, which that is a crucial actor in the resistance to cisplatin, adriamycin and etoposide in the different models used in this study. Similarly, it was described in glioblastoma cell line that reduced expression of miR-296-3p is concurrent to the increase expression of hEag1 and these two modifications are associated to an increased resistance to temozolomide, etoposide, and imatinib [124]. The authors demonstrated here that overexpression of the miRNA drastically decreases the level of hEag1 and restores sensitivity to the drugs. On the contrary, the use of antago-miR to mimic the cancerous conditions promotes resistance in association with an increase of the hEag1 transcription.

A study conducted by Pillozzi et al. reported an interesting relationship between cancer cells and the microenvironment, more precisely acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells and bone marrow mesenchymal cells (MSC), involving hERG1 channel and resistance to chemotherapeutic drugs [125]. They demonstrated that the complex involving  $\beta 1$ -integrin subunit, CXCR4 and hERG1 channel is important for interactions between MSC and ALL cells, and regulates protection against drugs of

ALL cells by MSC. They probed deeper into the mechanism by using different hERG1 inhibitors and demonstrated that this channel is crucial for the protection of ALL by microenvironment cells. These results are summarized in Figure 3 and in Table S1.

#### 3.4. $K^+$ Channels: Targets to Overcome Chemoresistance

Evidence reported previously suggest that  $K^+$  channels could be interesting adjuvant targets to fight against the resistance of cancer cells. For instance, astemizole, an inhibitor of Kv10.1, has been evaluated in combination with gefitinib on lung cancer cells [126]. In their models, the authors demonstrated that this association enhances the mortality of cancer cells compared to the application of separate molecules. To pursue these demonstrations, different research teams evaluate this type of combination on preclinical models based on in vivo analyses. For example, the concomitant activation of KCa3.1 and inhibition of hERG1 allow to overcome cisplatin resistance in colorectal cells [109].

Interestingly, some inhibitors of  $K^+$  channels can induce cell death, bypassing the classical mechanisms of chemotherapies. Indeed, Leanza et al. demonstrated that the use of mitoKv1.3 permeant inhibitors could affect this channel at the mitochondrial level, provoking the release of cytochrome C and eliciting the death of cancer cells [127]. This approach could be very interesting to bypass the barrier of the deregulation of the Bax/Bcl-2 pathway.

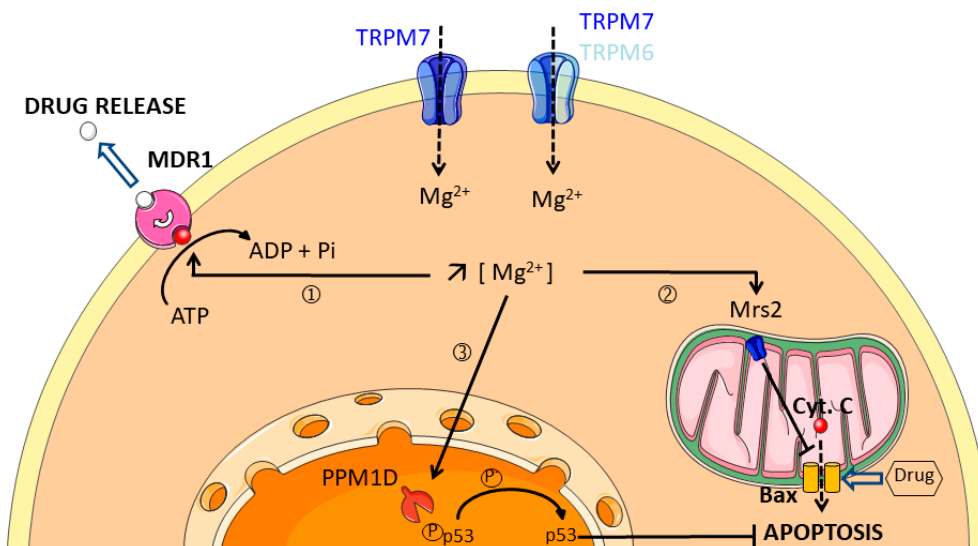
All elements presented through this state of research about  $K^+$  channel implicated in chemoresistance suggest that it should be interesting to clinically evaluate specific modulators of this class of ion transporters.

## 4. Magnesium Channels

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) is the second most abundant cation in the cell. The main role of  $Mg^{2+}$  is to act as a coenzyme in virtually all the biochemical catalytic reactions [128]. Although  $Mg^{2+}$  status is not systematically assessed in clinical examination, recent epidemiological data suggest that  $Mg^{2+}$  deficiency can be linked to an increase in cancer risk. For example, 100 mg daily decrease of  $Mg^{2+}$  intake is associated with a 24% increase in the incidence of pancreatic cancer [129]. Moreover, increase of  $Mg^{2+}$  intake is also associated with a reduction of colorectal adenoma risk [130].  $Mg^{2+}$  homeostasis of the cell is mainly regulated by the expression of  $Mg^{2+}$  transporters at the plasma membrane. A growing number of studies show that  $Mg^{2+}$  transporters could be involved in cancer progression. Importantly,  $Mg^{2+}$  cytosolic concentration is increased in doxorubicin-resistant colon cancer cells while the  $Mg^{2+}$  influx is reduced when compared to sensitive cancer cells [131]. This lower  $Mg^{2+}$  influx is due to the downregulation of TRPM6 and TRPM7  $Mg^{2+}$  channel expression. Interestingly, TRPM7 silencing in drug sensitive cells shifts their phenotype toward a more resistant one. These data suggest that drug resistance is associated with alteration of  $Mg^{2+}$  homeostasis through TRPM7 regulation in colon cancer cells (Figure 4). However, the role of TRPM7 in cancer cell resistance has never been studied, even if its expression is clearly linked to cancer progression and reduced survival in breast and pancreatic cancer patients [132,133]. It has also been shown that human mitochondrial Mrs2 protein expression is upregulated in a multidrug-resistant gastric cancer cell line compared to its non-resistant counterpart [134]. Mrs2 is located in the mitochondria inner membrane and is responsible for  $Mg^{2+}$  transport in the mitochondria of mammals. Interestingly, Mrs2 expression seems positively correlated with the multidrug resistance of gastric cancer cells in vitro and in vivo. In gastric cancer cells, Mrs2 overexpression inhibits adriamycin-induced apoptosis, probably by suppressing Bax-induced cytochrome-C release by mitochondria. Moreover, p27 is downregulated while cyclin D1 is upregulated following Mrs2 overexpression, leading to gastric cancer cell proliferation enhancement. Although these data suggest that Mrs2 may be a promising target against multidrug resistant gastric cancer, the role of mitochondrial  $Mg^{2+}$  has not been yet elucidated (Figure 4).

The only described mechanism by which magnesium is able to confer resistance was published some 30 years ago:  $Mg^{2+}$  was reported as essential for vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant human myelogenous leukemia K562 cells [135]. The binding was observed at

100  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ , and reached a maximum effect in the 5–10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  range. The candidate for drug efflux from K62 cells is the ATPase MDR1. The ATPase activity of MDR1 is indeed dependent on  $\text{Mg}^{2+}$ , but can also be modulated by other divalent cations, including manganese ( $\text{Mn}^{2+}$ ) and cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ). On the other hand, calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), nickel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ) and copper ( $\text{Cu}^{2+}$ ) inhibit the  $\text{Mg}^{2+}$ -catalyzed ATP hydrolysis [136].



**Figure 4.** Multidrug resistance is associated with an increase of intracellular free  $\text{Mg}^{2+}$ . Intracellular free  $\text{Mg}^{2+}$  could promote multidrug resistance through three main potential mechanisms: ①  $\text{Mg}^{2+}$  binds to MDR1 leading to drug extrusion; ②  $\text{Mg}^{2+}$  enters into the mitochondria through Mrs2 channel leading to Bax inhibition and resistance to apoptosis, ③  $\text{Mg}^{2+}$  activates the nuclear PPM1D phosphatase which alters p53 stabilization and protects cancer cells against apoptosis. Chemoresistant cancer cells have a lower  $\text{Mg}^{2+}$  influx and lower amounts of TRPM6 and TRPM7 channels at the plasma membrane.

Calcium blockers verapamil and nifedipine are able to inhibit both vincristine binding to the plasma membrane of K52 cells and drug efflux in a competitive manner, independently of the surrounding calcium concentration [136,137]. Taken together, these findings confirm that unlike  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  is essential for active transport of drug outside the cell [137].  $\text{Mg}^{2+}$  is also required for the catalytic activity of the Protein Phosphatase Magnesium-dependent 1D (PPM1D) that confers cisplatin resistance in ovarian and cervical cancer cell cells by deactivating p53 [138]. PPM1D promotes drug resistance in gynecological malignancies by acting as a downstream target of Akt. Moreover, recent studies show that mutations of PPM1D in hematopoietic stem cells confer a selective advantage to resist apoptosis-induced by cytotoxic treatments in a context of clonal hematopoiesis prior to malignancy development [139,140]. On the other hand, clinical data demonstrate that patients treated with cetuximab and panitumumab, monoclonal antibodies targeting the epithelial growth factor receptor (EGFR), develop hypomagnesemia [141–145]. All these results are summarized in Figure 4 and in Table S1. These data suggest that hypomagnesemia is a side-effect of chemotherapy that is associated with better clinical benefits. However, total serum  $\text{Mg}^{2+}$  level is measured for hypomagnesemia assessment in clinical studies and does not necessarily represents the bioactive fraction of  $\text{Mg}^{2+}$  into cells and tissues.

It is tempting to speculate that any modification of the  $\text{Mg}^{2+}$  transporter expression could disturb cytosolic  $\text{Mg}^{2+}$  homeostasis leading to enhanced drug resistance in cancer cells. However, future investigations are needed to better understand how  $\text{Mg}^{2+}$  transporters are expressed and could eventually coordinate during cancer progression from primary tumor to metastatic and multidrug resistant cancer.

## 5. Chloride Channels

The role of selective anion channels, more specifically chloride channels, has been well-described in physiological contexts and their implications in the excitability (neurons, skeletal, cardiac and smooth muscle), the regulation of cell volume, trans-epithelial transport, internal and external acidification, cell cycle progression and apoptosis are the subject of numerous studies ([146] for review). However, anion transporters were initially less studied in the cancer context until the discovery of some structural similarities with the MDR drug transporters involved in chemoresistance. For a decade, the number of reports has grown exponentially and different groups presented reviews about specific class of chloride channels (e.g., CLIC1 [147]; TMEM16A [148]). Although there is no official classification, the chloride channels are subdivided into five classes: CIC family (with 9 members), CFTR, Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channels, Maxi-chloride channels and Volume Regulated Chloride (VRAC) channels [149]. Like other ion channels, chloride channels and subsequent signalling pathways are involved in tumor progression and aggressiveness through the regulation of cell motility, cell cycle progression or apoptosis resistance. Additionally, some groups revealed the implication of chloride channels in tumor resistance to chemotherapy. Two major trends have recently emerged: on one hand, expression or activity reductions of VRAC induce resistance to the pro-apoptotic molecules by regulating the apoptotic volume decrease (AVD), and on the other hand, different chloride channels are upregulated and trigger pro-survival pathway or promote different mechanisms to reduce drugs activity.

### 5.1. Volume Regulated Chloride Channel Reduction and Promotion of Chemoresistance

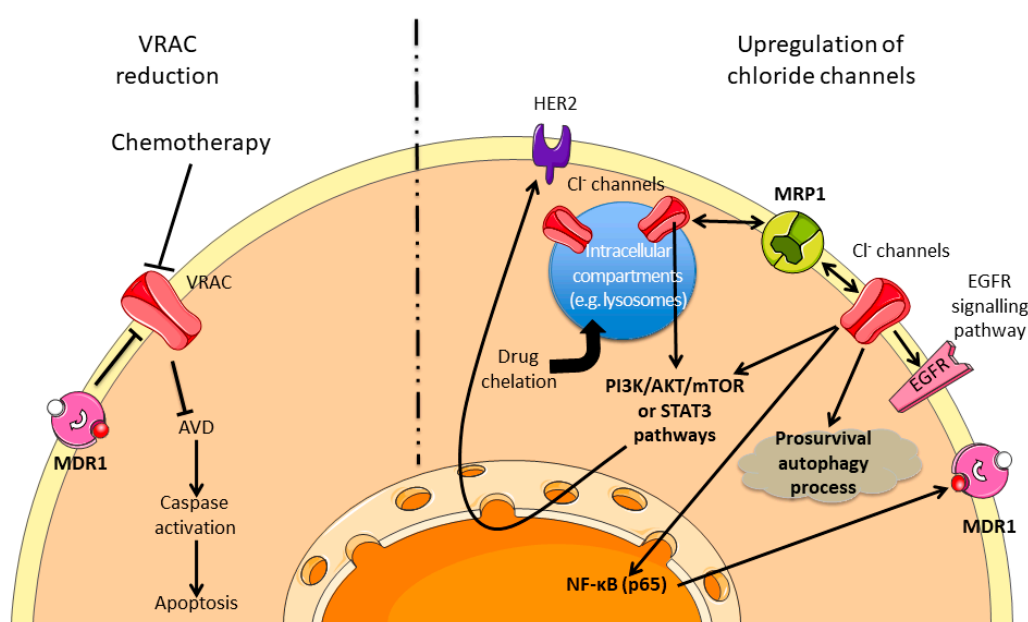
One of the first events at the onset of the apoptosis is a variation of the cell volume due to a modification of the ions (classically K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>), solutes and water transports, which precedes caspases activation. Among the different transporters involved in this mechanism, the implication of VRAC has been well established. In addition, it is strictly demonstrated that different chemotherapeutic drugs induce cancer cell apoptosis. The reports of activity or expression reduction of the VRAC molecular support in relation with chemotherapy sensitivity are obvious (Figure 5, left part). For instance, it has been described that doxorubicin could affect VRAC current in MCF-7 cells and the cell response is based on the relationship between MDR1 expression and I<sub>(Cl-swell)</sub> activity [150]. In addition, by using epidermoid cancer cell lines sensitive or resistant to cisplatin, Okada's group demonstrates the involvement of VRAC in the response to this drug [151–153]. The association of this type of current to drug resistance has also been reported in lung, nasopharyngeal carcinoma or anthracyclin MDR cell line [154–156] and was the object of specific reviews to this subject [157,158]. Interestingly, the molecular identification of the VRAC channel, the LRCC8 family [159], occurred recently and new understanding appeared with this highlight. Indeed, it has been shown that the specific subunit composition of the VRAC current affects differentially the sensitivity to chemotherapeutic compounds [160].

### 5.2. Upregulation of Chloride Channels and Chemoresistance

As previously described, chemotherapy resistance is based on the modification of different cellular processes (e.g., apoptosis resistance, autophagy regulation, and MDR modulation). By affecting these processes, chloride channels have also been demonstrated to be major regulators of drug resistance (Figure 5, right part). It has been thus demonstrated that the overexpression of CLIC1 or ANO1 are correlated to the resistance of glioblastoma cancer stem cells, ovarian or breast cancer [161–164]. In another way, Bill et al. demonstrated that ANO1 channel could be functionally linked to the EGFR pathway and its expression level could be used as predictive biomarker to anti-EGFR therapy in head and neck squamous cancer [165].

Chloride channel can be located at the plasma or intracellular membrane level. Weylandt et al. demonstrated that CIC-3 could participate in the acidification of intracellular compartment in order to promote the chelation of the etoposide in neuroendocrine tumor cells and consequently reduce the activity of this compound [166]. Similarly, it was shown that CIC-3 could participate

in cisplatin resistance in erythroleukemia or glioma models by modulating the pH of intracellular compartments, such as lysosome [167,168]. In addition, Fujito et al. demonstrated that CIC-3 and ANO1, by regulating intracellular chloride level, could control the transcription of HER2 in breast cancer cells through the PI3K/Akt/mTOR or STAT3 pathways, depending on the cell/channel type promoting the resistance to anti-HER2 therapies [169]. CIC-3 has also been demonstrated to participate in cisplatin resistance by regulating the Akt pathway and the autophagy process of glioma cells [170] or to promote the decreased answer to different compounds by regulating the overexpression of MDR1 by NF- $\kappa$ B and p65 signalling [171]. CLC-5 has been demonstrated to promote bortezomib resistance in multiple myeloma cell lines by increasing the pro-survival autophagy and inhibiting the Akt-mTOR pathway [172]. In choriocarcinoma models, sensitive or not to methotrexate and floxuridine, CLIC1 channel has been shown to be overexpressed in resistant cells and linked with the upregulation of MRP1 in order to promote drug resistance [173]. All these results are summarized in Figure 5 and Table S1.



**Figure 5.** Chemoresistance pathways involving  $\text{Cl}^-$  channels.  $\text{Cl}^-$  channels can modulate the sensitivity to different chemotherapies by inhibiting the AVD or by modulating the prosurvival pathways and the drugs availabilities. The dashed line separates two virtual cells presenting either reduction activity of  $\text{Cl}^-$  channels (left part) or an upregulation of  $\text{Cl}^-$  channels (right part). MDR1: Multidrug Resistance 1; VRAC: Volume Regulated Chloride Channel; AVD: Apoptosis Volume Decrease; HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2; MRP1: Multidrug associated Resistance Protein 1; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

## 6. Other Ion Channels

As previously described, the associations between  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  or  $\text{Cl}^-$  channels with chemoresistance present an increasing number of iterations in the bibliography. However, little information is available regarding the involvement of other channels, water, and solute transporters in the literature. It is however worth mentioning that voltage-gated sodium channels and ASIC channels have been associated with chemoresistance.

### 6.1. Voltage-Gated Sodium Channel in the Chemoresistance Process

This class of ion channel is known to participate in tumor progression by improving cell invasiveness capacity in different tumor types (e.g., breast, colorectal, prostate cancer [174–176]). However, Gerard et al. described that the NG108-15 cells (“neuroblastoma x glioma” hybrid cells),

that are resistant to doxorubicin, show a 1.66-fold increase in Na<sup>+</sup> conductance when compared to the parental cells [177]. These results are in good agreement with those obtained by Yamashita et al., who showed that leukemia cells expressing a MDR phenotype present a bigger voltage-gated Na<sup>+</sup> current compared to the sensitive ones [178]. In this study, they confirmed the association between voltage-gated Na<sup>+</sup> current and MDR phenotype by using revertant cell lines (cell lines that lost the acquired resistance to drug) that did not maintain the Na<sup>+</sup> conductance.

### 6.2. ASIC Channels in the Chemoresistance Process

It has recently been demonstrated by Zhang et al. that the ASIC1a channel participates in chemotherapy resistance of HCC [179]. ASIC1a is shown to be more expressed in HCC tissues, and the authors have deciphered a pathway involving the channel in the chemoresistance. They notably show that ASIC1a is expressed at the plasma membrane level, where it allows a Ca<sup>2+</sup> influx, which regulates the PI<sub>3</sub>K/Akt pathway, protecting the cells against apoptosis in an extracellular acidic environment.

## 7. Conclusions

Chemoresistance is a major hurdle in cancer treatment leading to recurrence of cancer. Resistance is a complex phenomenon involving multiple mechanisms, including activation of signalling pathways, apoptosis resistance improvement, and increasing extrusion of therapeutic compounds, among others mechanisms. Although many drugs/therapies are now available in oncology, resistance to treatments impedes complete therapeutic successes and is responsible for mid- and long-term recurrence of the disease. Ion fluxes have been reported to modulate the response of cancer cells to several chemotherapeutic drugs [7]. Additionally, apoptosis regulation by ion channels is also well described ([180,181] for review) and consequently, it is interesting to understand their implication in the resistance to therapeutic compounds.

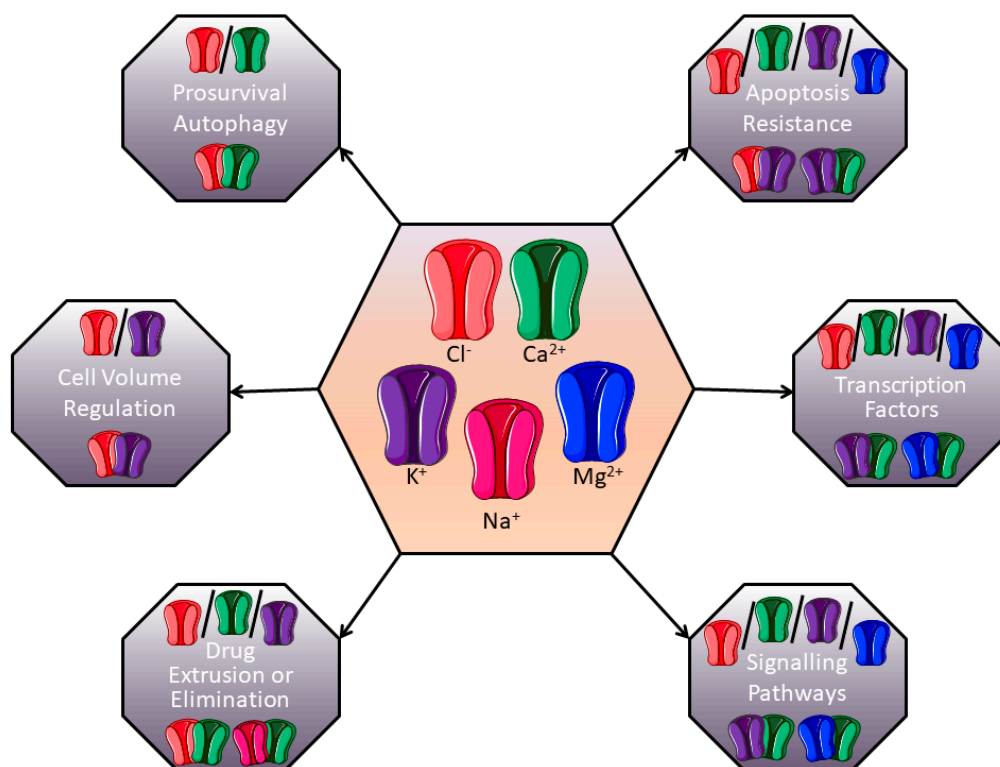
Although many papers report an association between chemoresistance and ion channel expression and/or activity, relatively few studies provide the complete mechanism of resistance. It appears thus necessary to improve knowledge about the different mechanisms involving ion channels, to enable potential new therapeutic associations (including ion channel modulators) to ideally overcome resistance to chemotherapeutic compounds.

Studies reported herein usually describe the implication of one channel in the regulation of chemoresistance processes. However, studies about complexes of ion channels are emerging to explain their involvement in the control of tumour progression. For example, our group demonstrated that the Kv10.1 potassium channel and the Orai1 calcium channel are associated to promote survival of breast cancer cells [182]. It was also demonstrated that the SK3 potassium channel, in association with TRPC1 and Orai1 calcium channels, regulated colon cancer cell migration [183]. Based on data from the literature, and since global ion channel expression is rather dynamically and interdependently regulated, we propose that ion channels-dependant chemoresistance processes are likely to depend on more complex mechanisms than only one channel and only one downstream signalling process (Figure 6). For example, K<sup>+</sup> channels can be associated with Cl<sup>-</sup> channels to regulate cell volume and modulate apoptosis resistance. In the same manner, the association of K<sup>+</sup> channels with Ca<sup>+</sup> ones could be very important in controlling intracellular signalling pathways or expression/repression of transcription factors. Future research in this field should thus take relationships between ion channels into account, and provide better description of the downstream molecular mechanisms involved in chemoresistance.

To conclude, this emerging field can highlight new targets or new evidence for overriding chemoresistance, but intensive work is still necessary to complete the list of actors involved, the interdependency between some of these actors, and their exact roles in chemoresistance processes by deciphering downstream signalling mechanisms more accurately. Ion channel blockers have been successfully developed over decades by pharmaceutical industries to treat cardiac or psychiatric disorders. Yet, their therapeutic potency has not been extensively investigated in clinical cancer therapy.



Such ion channel blockers could, however, be very useful: for instance, verapamil, a  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker significantly increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma when given in association with chemotherapy [184]. Moreover, mibefradil dihydrochloride, a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, acts as a radiosensitizer by potentiating the effect of hypofractionated radiation on patients with recurrent glioblastoma [185]. Others  $\text{Na}^+$  channel blockers, such as riluzole, have also been described in cancer therapy for patients with brain metastases originating from melanoma [186,187]. Hopefully, accumulating data on chemoresistance conferred by ion channels (most of which are summarized in the present review) will help repurpose ion channels modulators in clinical trials to improve cancer treatment.



**Figure 6.** Putative channel associations involved in chemoresistance. Different ion channels could form complexes and modulate chemoresistance. In each grey box, the current description of channel associated-chemoresistance is presented in the light part, and examples of putative ion channels associations are suggested in the dark part.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/3/376/s1>, Table S1. Ion channels and associated mechanisms/signalling pathways involved in chemoresistance.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** This work was supported by the UPJV (“Université de Picardie Jules Verne”), the “Ligue Contre le Cancer”, the “Région Hauts-de-France” and the CNO (“Cancéropôle Nord-Ouest”).

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

## Abbreviations

AIF	Apoptosis-Inducing Factor
ALL	Acute Lymphoblastic Leukemia
ANO1	ANOctamin 1
ASIC	Acid-Sensing Ion Channel
AVD	Apoptosis Volume Decrease
Bax	Bcl-2-Associated X protein

Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BKCa	Large conductance, Ca <sup>2+</sup> -activated K <sup>+</sup> channels
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
ClC	Chloride Channel
CLIC1	Chloride Intracellular Channel 1
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor 4
ER	Endoplasmic Reticulum
EMT	Epithelial to Mesenchymal Transition
HCC	HepatoCellular Carcinoma
hEag1	human Ether-à-Go-Go
hERG	human Ether-à-Go-Go-Related Gene
IP <sub>3</sub> R	Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptor
MCU	Mitochondrial Calcium Uniport
MDR	MultiDrug Resistance
miRNA	micro-RNA
MMP	Matrix MetalloProteinase
MRP1	Multidrug Resistance-associated Protein 1
MSC	Bone Marrow Mesenchymal Cells
RVD	Regulatory Volume Decrease
SMAC	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
SK3	Small conductance, Ca <sup>2+</sup> activated K <sup>+</sup> channel 3
SOC channels	Store-Operated Calcium channels
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
TAT-IDP <sup>s</sup>	TAT-fused inositol 1,4,5-trisphosphate receptor derived peptide
TRAIL	Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
VRAC	Volume-Regulated Anion Channel

## References

- Gonzalez-Angulo, A.M.; Morales-Vasquez, F.; Hortobagyi, G.N. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2007**, *608*, 1–22.
- Li, S.; Kennedy, M.; Payne, S.; Kennedy, K.; Seewaldt, V.L.; Pizzo, S.V.; Bachelder, R.E. Model of Tumor Dormancy/Recurrence after Short-Term Chemotherapy. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98021. [[CrossRef](#)]
- Ghandadi, M.; Behravan, J.; Abnous, K.; Mosaffa, F. Reactive Oxygen Species Mediate TNF- $\alpha$  Cytotoxic Effects in the Multidrug-Resistant Breast Cancer Cell Line MCF-7/MX. *Oncol. Res. Treat.* **2016**, *39*, 54–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huang, Y.; Sadée, W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and -sensitivity of tumor cells. *Cancer Lett.* **2006**, *239*, 168–182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol. Med.* **2010**, *16*, 107–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Siesjö, B.K. Historical Overview: Calcium, Ischemia, and Death of Brain Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1988**, *522*, 638–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huang, Y.; Anderle, P.; Bussey, K.J.; Barbacioru, C.; Shankavaram, U.; Dai, Z.; Reinhold, W.C.; Papp, A.; Weinstein, J.N.; Sadée, W. Membrane Transporters and Channels: Role of the Transportome in Cancer Chemosensitivity and Chemoresistance. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4294–4301. [[CrossRef](#)]
- Berridge, M.J.; Lipp, P.; Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 11–21. [[CrossRef](#)]
- Monteith, G.R.; McAndrew, D.; Faddy, H.M.; Roberts-Thomson, S.J. Calcium and cancer: Targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 519–530. [[CrossRef](#)]
- Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Lipp, P. Calcium—A life and death signal. *Nature* **1998**, *395*, 645–648. [[CrossRef](#)]
- Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Calcium in tumour metastasis: New roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 609–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Roderick, H.L.; Cook, S.J. Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 361–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Büsselberg, D.; Florea, A.-M. Targeting Intracellular Calcium Signaling ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) to Overcome Acquired Multidrug Resistance of Cancer Cells: A Mini-Overview. *Cancers* **2017**, *9*, 48. [[CrossRef](#)]
14. Parekh, A.B.; Putney, J.W. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* **2005**, *85*, 757–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Putney, J.W. Capacitative calcium entry: From concept to molecules. *Immunol. Rev.* **2009**, *231*, 10–22. [[CrossRef](#)]
16. Hogan, P.G.; Rao, A. Store-operated calcium entry: Mechanisms and modulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *460*, 40–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Flourakis, M.; Lehen'kyi, V.; Beck, B.; Raphael, M.; Vandenberghe, M.; Abeele, F.V.; Roudbaraki, M.; Lepage, G.; Mauroy, B.; Romanin, C.; et al. Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Abeele, F.V.; Skryma, R.; Shuba, Y.; Van Coppenolle, F.; Slomianny, C.; Roudbaraki, M.; Mauroy, B.; Wuytack, F.; Prevarskaya, N. Bcl-2-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 169–179. [[CrossRef](#)]
19. Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 552–565. [[CrossRef](#)]
20. Mignen, O.; Constantin, B.; Potier-Cartereau, M.; Penna, A.; Gautier, M.; Gueguinou, M.; Renaudineau, Y.; Shoji, K.F.; Felix, R.; Bayet, E.; et al. Constitutive calcium entry and cancer: Updated views and insights. *Eur. Biophys. J.* **2017**, *46*, 395–413. [[CrossRef](#)]
21. Helson, L. Calcium Channel Blocker Enhancement of Anticancer Drug Cytotoxicity—A Review. *Cancer Drug Deliv.* **1984**, *1*, 353–361. [[CrossRef](#)]
22. Simpson, W.G. The calcium channel blocker verapamil and cancer chemotherapy. *Cell Calcium* **1985**, *6*, 449–467. [[CrossRef](#)]
23. Mason, R.P. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis. *Cancer* **1999**, *85*, 2093–2102. [[CrossRef](#)]
24. Kiwit, J.C.; Hertel, A.; Matuschek, A.E. Reversal of chemoresistance in malignant gliomas by calcium antagonists: Correlation with the expression of multidrug-resistant p-glycoprotein. *J. Neurosurg.* **1994**, *81*, 587–594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Khadra, N.; Bresson-Bepoldin, L.; Penna, A.; Chaigne-Delalande, B.; Ségui, B.; Levade, T.; Vacher, A.-M.; Reiffers, J.; Ducret, T.; Moreau, J.-F.; et al. CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca<sup>2+</sup> entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC) β<sub>2</sub>, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 19072–19077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Limnander, A.; Depeille, P.; Freedman, T.S.; Liou, J.; Leitges, M.; Kurosaki, T.; Roose, J.P.; Weiss, A. STIM1, PKC-δ and RasGRP set a threshold for proapoptotic Erk signaling during B cell development. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Soltoff, S.P.; Lannon, W.A. Activation of ERK1/2 by Store-Operated Calcium Entry in Rat Parotid Acinar Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72881. [[CrossRef](#)]
28. Chen, Y.-F.; Chiu, W.-T.; Chen, Y.-T.; Lin, P.-Y.; Huang, H.-J.; Chou, C.-Y.; Chang, H.-C.; Tang, M.-J.; Shen, M.-R. Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 15225–15230. [[CrossRef](#)]
29. Feng, M.; Grice, D.M.; Faddy, H.M.; Nguyen, N.; Leitch, S.; Wang, Y.; Muend, S.; Kenny, P.A.; Sukumar, S.; Roberts-Thomson, S.J.; et al. Store-Independent Activation of Orai1 by SPCA2 in Mammary Tumors. *Cell* **2010**, *143*, 84–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kondratska, K.; Kondratskyi, A.; Yassine, M.; Lemonnier, L.; Lepage, G.; Morabito, A.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Orai1 and STIM1 mediate SOCE and contribute to apoptotic resistance of pancreatic adenocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 2263–2269. [[CrossRef](#)]
31. Sun, X.; Wei, Q.; Cheng, J.; Bian, Y.; Tian, C.; Hu, Y.; Li, H. Enhanced Stim1 expression is associated with acquired chemo-resistance of cisplatin in osteosarcoma cells. *Hum. Cell* **2017**, *30*, 216–225. [[CrossRef](#)]
32. Zheng, H.C. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 59950–59964. [[CrossRef](#)]
33. Babaer, D.; Amara, S.; Ivy, M.; Zhao, Y.; Lammers, P.E.; Titze, J.M.; Tiriveedhi, V. High salt induces P-glycoprotein mediated treatment resistance in breast cancer cells through store operated calcium influx. *Oncotarget* **2018**, *9*, 25193–25205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Schmidt, S.; Liu, G.; Yang, W.; Honisch, S.; Pantelakos, S.; Stourmaras, C.; Honig, A.; Lang, F. Enhanced Orai1 and STIM1 expression as well as store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in therapy resistant ovary carcinoma cells. *Oncotarget* **2014**, *5*, 4799–4810. [[CrossRef](#)]
35. Tang, B.D.; Xia, X.; Lv, X.F.; Yu, B.X.; Yuan, J.N.; Mai, X.Y.; Shang, J.Y.; Zhou, J.G.; Liang, S.J.; Pang, R.P. Inhibition of Orai1-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry enhances chemosensitivity of HepG2 hepatocarcinoma cells to 5-fluorouracil. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 904–915. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wang, L.; Hao, J.; Zhang, Y.; Yang, Z.; Cao, Y.; Lu, W.; Shu, Y.; Jiang, L.; Hu, Y.; Lv, W.; et al. Orai1 mediates tumor-promoting store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human gastrointestinal stromal tumors via c-KIT and the extracellular signal—Regulated kinase pathway. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317691426. [[CrossRef](#)]
37. Shuttleworth, T.J. Orai3—The ‘exceptional’ Orai? *J. Physiol.* **2012**, *590*, 241–257. [[CrossRef](#)]
38. Schindl, R.; Bergsmann, J.; Frischauf, I.; Derler, I.; Fahrner, M.; Muik, M.; Fritsch, R.; Groschner, K.; Romanin, C. 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Alters Selectivity of Orai3 Channels by Increasing Their Pore Size. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20261–20267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Faouzi, M.; Hague, F.; Potier, M.; Ahidouch, A.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Down-regulation of Orai3 arrests cell-cycle progression and induces apoptosis in breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* **2011**, *226*, 542–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Motiani, R.K.; Abdullaev, I.F.; Trebak, M. A novel native store-operated calcium channel encoded by Orai3: Selective requirement of Orai3 versus Orai1 in estrogen receptor-positive versus estrogen receptor-negative breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 19173–19183. [[CrossRef](#)]
41. Bhattacharya, A.; Kumar, J.; Hermanson, K.; Sun, Y.; Qureshi, H.; Perley, D.; Scheidegger, A.; Singh, B.B.; Dhasarathy, A. The calcium channel proteins ORAI3 and STIM1 mediate TGF-beta induced Snai1 expression. *Oncotarget* **2018**, *9*, 29468–29483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Faouzi, M.; Kischel, P.; Hague, F.; Ahidouch, A.; Benzerdjeb, N.; Sevestre, H.; Penner, R.; Ouadid-Ahidouch, H. ORAI3 silencing alters cell proliferation and cell cycle progression via c-myc pathway in breast cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 752–760. [[CrossRef](#)]
43. Hasna, J.; Hague, F.; Rodat-Despoix, L.; Geerts, D.; Leroy, C.; Tulasne, D.; Ouadid-Ahidouch, H.; Kischel, P. Orai3 calcium channel and resistance to chemotherapy in breast cancer cells: The p53 connection. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 691–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vanoverbergh, K.; Vanden Abeele, F.; Mariot, P.; Lepage, G.; Roudbaraki, M.; Bonnal, J.L.; Mauroy, B.; Shuba, Y.; Skryma, R.; Prevarskaya, N.  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Dubois, C.; Vanden Abeele, F.; Lehen'kyi, V.; Gkika, D.; Guarmit, B.; Lepage, G.; Slomianny, C.; Borowiec, A.S.; Bidaux, G.; Benahmed, M.; et al. Remodeling of Channel-Forming ORAI Proteins Determines an Oncogenic Switch in Prostate Cancer. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 19–32. [[CrossRef](#)]
46. Nilius, B.; Owsianik, G.; Voets, T.; Peters, J.A. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev.* **2007**, *87*, 165–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lehen'kyi, V.; Prevarskaya, N. Oncogenic TRP channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2011**, *704*, 929–945. [[PubMed](#)]
48. Deveci, H.A.; Nazıroğlu, M.; Nur, G. 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.* **2018**, *439*, 189–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Nabissi, M.; Morelli, M.B.; Santoni, M.; Santoni, G. Triggering of the TRPV2 channel by cannabidiol sensitizes glioblastoma cells to cytotoxic chemotherapeutic agents. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 48–57. [[CrossRef](#)]
50. Morelli, M.B.; Offidani, M.; Alesiani, F.; Discepoli, G.; Liberati, S.; Olivieri, A.; Santoni, M.; Santoni, G.; Leoni, P.; Nabissi, M. The effects of cannabidiol and its synergism with bortezomib in multiple myeloma cell lines. A role for transient receptor potential vanilloid type-2. *Int. J. Cancer* **2014**, *134*, 2534–2546. [[CrossRef](#)]
51. Almasi, S.; Kennedy, B.E.; El-Aghil, M.; Sterea, A.M.; Gujar, S.; Partida-Sanchez, S.; El Hiani, Y. TRPM2 channel-mediated regulation of autophagy maintains mitochondrial function and promotes gastric cancer cell survival via the JNK-signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 3637–3650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Koh, D.W.; Powell, D.P.; Blake, S.D.; Hoffman, J.L.; Hopkins, M.M.; Feng, X. Enhanced cytotoxicity in triple-negative and estrogen receptorpositive breast adenocarcinoma cells due to inhibition of the transient receptor potential melastatin-2 channel. *Oncol. Rep.* **2015**, *34*, 1589–1598. [[CrossRef](#)]

53. Wang, Y.; Yang, Z.; Meng, Z.; Cao, H.; Zhu, G.; Liu, T.; Wang, X. Knockdown of TRPM8 suppresses cancer malignancy and enhances epirubicin-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *Int. J. Biol. Sci.* **2013**, *10*, 90–102. [[CrossRef](#)]
54. Liu, X.; Zou, J.; Su, J.; Lu, Y.; Zhang, J.; Li, L.; Yin, F. 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.* **2016**, *48*, 243–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zhang, P.; Liu, X.; Li, H.; Chen, Z.; Yao, X.; Jin, J.; Ma, X. TRPC5-induced autophagy promotes drug resistance in breast carcinoma via CaMKK $\beta$ /AMPK $\alpha$ /mTOR pathway. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Moccia, F. Endothelial Ca<sup>2+</sup> Signaling and the Resistance to Anticancer Treatments: Partners in Crime. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 217. [[CrossRef](#)]
57. Ma, X.; Cai, Y.; He, D.; Zou, C.; Zhang, P.; Lo, C.Y.; Xu, Z.; Chan, F.L.; Yu, S.; Chen, Y.; et al. Transient receptor potential channel TRPC5 is essential for P-glycoprotein induction in drug-resistant cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16282–16287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Dong, Y.; Pan, Q.; Jiang, L.; Chen, Z.; Zhang, F.; Liu, Y.; Xing, H.; Shi, M.; Li, J.; Li, X.; et al. Tumor endothelial expression of P-glycoprotein upon microvesicular transfer of TrpC5 derived from adriamycin-resistant breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *446*, 85–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Wang, T.; Ning, K.; Lu, T.X.; Sun, X.; Jin, L.; Qi, X.; Jin, J.; Hua, D. Increasing circulating exosomes-carrying TRPC5 predicts chemoresistance in metastatic breast cancer patients. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 448–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Wang, T.; Chen, Z.; Zhu, Y.; Pan, Q.; Liu, Y.; Qi, X.; Jin, L.; Jin, J.; Ma, X.; Hua, D. Inhibition of transient receptor potential channel 5 reverses 5-Fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 448–456. [[CrossRef](#)]
61. Wang, T.; Ning, K.; Sun, X.; Zhang, C.; Jin, L.F.; Hua, D. Glycolysis is essential for chemoresistance induced by transient receptor potential channel C5 in colorectal cancer. *BMC Cancer* **2018**, *18*, 207. [[CrossRef](#)]
62. Wen, L.; Liang, C.; Chen, E.; Chen, W.; Liang, F.; Zhi, X.; Wei, T.; Xue, F.; Li, G.; Yang, Q.; et al. Regulation of Multi-drug Resistance in hepatocellular carcinoma cells is TRPC6/Calcium Dependent. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Madan, E.; Gogna, R.; Keppler, B.; Pati, U. p53 Increases Intra-Cellular Calcium Release by Transcriptional Regulation of Calcium Channel TRPC6 in GaQ3-Treated Cancer Cells. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Yu, J.; Wang, S.; Zhao, W.; Duan, J.; Wang, Z.; Chen, H.; Tian, Y.; Wang, D.; Zhao, J.; An, T.; et al. Mechanistic Exploration of Cancer Stem Cell Marker Voltage-Dependent Calcium Channel  $\alpha$ 2delta1 Subunit-mediated Chemotherapy Resistance in Small-Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2148–2158. [[CrossRef](#)]
65. Dziegielewska, B.; Casarez, E.V.; Yang, W.Z.; Gray, L.S.; Dziegielewski, J.; Slack-Davis, J.K. T-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Inhibition Sensitizes Ovarian Cancer to Carboplatin. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 460–470. [[CrossRef](#)]
66. Tosatto, A.; Sommaggio, R.; Kummerow, C.; Bentham, R.B.; Blacker, T.S.; Berecz, T.; Duchon, M.R.; Rosato, A.; Bogeski, I.; Szabadkai, G.; et al. The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1 $\alpha$ . *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 569–585. [[CrossRef](#)]
67. Akl, H.; Bultynck, G. Altered Ca<sup>2+</sup> signaling in cancer cells: Proto-oncogenes and tumor suppressors targeting IP3 receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1835*, 180–193. [[CrossRef](#)]
68. Giorgi, C.; De Stefani, D.; Bononi, A.; Rizzuto, R.; Pinton, P. Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1817–1827. [[CrossRef](#)]
69. Prevarskaya, N.; Skryma, R.; Shuba, Y. Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* **2018**, *98*, 559–621. [[CrossRef](#)]
70. Tsunoda, T.; Koga, H.; Yokomizo, A.; Tatsugami, K.; Eto, M.; Inokuchi, J.; Hirata, A.; Masuda, K.; Okumura, K.; Naito, S. Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines. *Oncogene* **2005**, *24*, 1396–1402. [[CrossRef](#)]
71. SchrodL, K.; Oelmez, H.; Edelmann, M.; Huber, R.M.; Bergner, A. Altered Ca<sup>2+</sup>-homeostasis of cisplatin-treated and low level resistant non-small-cell and small-cell lung cancer cells. *Cell Oncol.* **2009**, *31*, 301–315. [[PubMed](#)]

72. Akl, H.; Vervloessem, T.; Kiviluoto, S.; Bittremieux, M.; Parys, J.B.; De Smedt, H.; Bultynck, G. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1843*, 2240–2252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cheng, E.H.; Levine, B.; Boise, L.H.; Thompson, C.B.; Hardwick, J.M. Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* **1996**, *379*, 554–556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Letai, A.; Bassik, M.C.; Walensky, L.D.; Sorcinelli, M.D.; Weiler, S.; Korsmeyer, S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2002**, *2*, 183–192. [[CrossRef](#)]
75. Maji, S.; Panda, S.; Samal, S.K.; Shriwas, O.; Rath, R.; Pellecchia, M.; Emdad, L.; Das, S.K.; Fisher, P.B.; Dash, R. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Adv. Cancer Res.* **2018**, *137*, 37–75. [[PubMed](#)]
76. Padar, S.; van Breemen, C.; Thomas, D.W.; Uchizono, J.A.; Livesey, J.C.; Rahimian, R. Differential regulation of calcium homeostasis in adenocarcinoma cell line A549 and its Taxol-resistant subclone. *Br. J. Pharm.* **2004**, *142*, 305–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kerkhofs, M.; Bittremieux, M.; Morciano, G.; Giorgi, C.; Pinton, P.; Parys, J.B.; Bultynck, G. Emerging molecular mechanisms in chemotherapy: Ca<sup>2+</sup> signaling at the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 334. [[CrossRef](#)]
78. Huang, Z.; Lei, X.; Zhong, M.; Zhu, B.; Tang, S.; Liao, D. Bcl-2 small interfering RNA sensitizes cisplatin-resistant human lung adenocarcinoma A549/DDP cell to cisplatin and diallyl disulfide. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 835–843. [[CrossRef](#)]
79. Schaaf, A.; Sagi, S.; Langbein, S.; Trojan, L.; Alken, P.; Michel, M.S. Cytotoxicity of cisplatin in bladder cancer is significantly enhanced by application of bcl-2 antisense oligonucleotides. *Urol. Oncol.* **2004**, *22*, 188–192. [[CrossRef](#)]
80. Xie, Q.; Su, J.; Jiao, B.; Shen, L.; Ma, L.; Qu, X.; Yu, C.; Jiang, X.; Xu, Y.; Sun, L. ABT737 reverses cisplatin resistance by regulating ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> signal transduction in human ovarian cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2016**, *49*, 2507–2519. [[CrossRef](#)]
81. Zhang, K.; Heidrich, F.M.; DeGray, B.; Boehmerle, W.; Ehrlich, B.E. Paclitaxel accelerates spontaneous calcium oscillations in cardiomyocytes by interacting with NCS-1 and the InsP3R. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2010**, *49*, 829–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Boutin, B.; Tajeddine, N.; Monaco, G.; Molgo, J.; Vertommen, D.; Rider, M.; Parys, J.B.; Bultynck, G.; Gailly, P. Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content decrease by PKA-dependent hyperphosphorylation of type 1 IP3 receptor contributes to prostate cancer cell resistance to androgen deprivation. *Cell Calcium* **2015**, *57*, 312–320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Chen, M.H.; Lin, K.J.; Yang, W.L.; Kao, Y.W.; Chen, T.W.; Chao, S.C.; Chang, P.M.; Liu, C.Y.; Tzeng, C.H.; Chao, Y.; et al. Gene expression-based chemical genomics identifies heat-shock protein 90 inhibitors as potential therapeutic drugs in cholangiocarcinoma. *Cancer* **2013**, *119*, 293–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Murren, J.R.; Durivage, H.J.; Buzaid, A.C.; Reiss, M.; Flynn, S.D.; Carter, D.; Hait, W.N. Trifluoperazine as a modulator of multidrug resistance in refractory breast cancer. *Cancer Chemother. Pharm.* **1996**, *38*, 65–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Schleuning, M.; Brumme, V.; Wilmanns, W. Growth inhibition of human leukemic cell lines by the phenothiazine derivative fluphenazine. *Anticancer Res.* **1993**, *13*, 599–602.
86. Yeh, C.T.; Wu, A.T.; Chang, P.M.; Chen, K.Y.; Yang, C.N.; Yang, S.C.; Ho, C.C.; Chen, C.C.; Kuo, Y.L.; Lee, P.Y.; et al. Trifluoperazine, an antipsychotic agent, inhibits cancer stem cell growth and overcomes drug resistance of lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2012**, *186*, 1180–1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Kang, S.; Hong, J.; Lee, J.M.; Moon, H.E.; Jeon, B.; Choi, J.; Yoon, N.A.; Paek, S.H.; Roh, E.J.; Lee, C.J.; et al. Trifluoperazine, a Well-Known Antipsychotic, Inhibits Glioblastoma Invasion by Binding to Calmodulin and Disinhibiting Calcium Release Channel IP3R. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 217–227. [[CrossRef](#)]
88. Xie, Q.; Xu, Y.; Gao, W.; Zhang, Y.; Su, J.; Liu, Y.; Guo, Y.; Dou, M.; Hu, K.; Sun, L. TAT-fused IP3R-derived peptide enhances cisplatin sensitivity of ovarian cancer cells by increasing ER Ca<sup>2+</sup> release. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *41*, 809–817. [[CrossRef](#)]
89. Xu, L.; Xie, Q.; Qi, L.; Wang, C.; Xu, N.; Liu, W.; Yu, Y.; Li, S.; Xu, Y. Bcl-2 overexpression reduces cisplatin cytotoxicity by decreasing ER-mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signaling in SKOV3 cells. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 985–992. [[CrossRef](#)]

90. Sarosiek, K.A.; Ni Chonghaile, T.; Letai, A. Mitochondria: Gatekeepers of response to chemotherapy. *Trends Cell Biol.* **2013**, *23*, 612–619. [CrossRef]
91. Vo, T.T.; Ryan, J.; Carrasco, R.; Neuberg, D.; Rossi, D.J.; Stone, R.M.; Deangelo, D.J.; Frattini, M.G.; Letai, A. Relative mitochondrial priming of myeloblasts and normal HSCs determines chemotherapeutic success in AML. *Cell* **2012**, *151*, 344–355. [CrossRef]
92. Ni Chonghaile, T.; Sarosiek, K.A.; Vo, T.T.; Ryan, J.A.; Tammareddi, A.; Moore Vdel, G.; Deng, J.; Anderson, K.C.; Richardson, P.; Tai, Y.T.; et al. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science* **2011**, *334*, 1129–1133. [CrossRef]
93. Davids, M.S.; Letai, A. Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J. Clin. Oncol.* **2012**, *30*, 3127–3135. [CrossRef]
94. Attali, B.; Chandy, K.G.; Giese, M.H.; Grissmer, S.; Gutman, G.A.; Jan, L.Y.; Lazdunski, M.; Mckinnon, D.; Nerbonne, J.; Pardo, L.A.; et al. Voltage-Gated Potassium Channels. Available online: <http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=81> (accessed on 1 February 2019).
95. Ouadid-Ahidouch, H.; Ahidouch, A.; Pardo, L.A. Kv10.1 K<sup>+</sup> channel: From physiology to cancer. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2016**, *468*, 751–762. [CrossRef]
96. Comes, N.; Serrano-Albarrás, A.; Capera, J.; Serrano-Novillo, C.; Condom, E.; Ramón y Cajal, S.; Ferreres, J.C.; Felipe, A. Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2015**, *1848*, 2477–2492. [CrossRef] [PubMed]
97. D’Amico, M.; Gasparoli, L.; Arcangeli, A. Potassium channels: Novel emerging biomarkers and targets for therapy in cancer. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **2013**, *8*, 53–65. [CrossRef]
98. Sharp, S.Y.; Mistry, P.; Valenti, M.R.; Bryant, A.P.; Kelland, L.R. Selective potentiation of platinum drug cytotoxicity in cisplatin-sensitive and -resistant human ovarian carcinoma cell lines by amphotericin B. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1994**, *35*, 137–143. [CrossRef]
99. Liang, X.-J.; Yin, J.-J.; Zhou, J.-W.; Wang, P.C.; Taylor, B.; Cardarelli, C.; Kozar, M.; Forte, R.; Aszalos, A.; Gottesman, M.M. Changes in biophysical parameters of plasma membranes influence cisplatin resistance of sensitive and resistant epidermal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* **2004**, *293*, 283–291. [CrossRef]
100. Marklund, L.; Andersson, B.; Behnam-Motlagh, P.; Sandstrom, P.E.; Henriksson, R.; Grankvist, K. Cellular potassium ion deprivation enhances apoptosis induced by cisplatin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2004**, *94*, 245–251. [CrossRef]
101. Marklund, L.; Henriksson, R.; Grankvist, K. Cisplatin-induced apoptosis of mesothelioma cells is affected by potassium ion flux modulator amphotericin B and bumetanide. *Int. J. Cancer* **2001**, *93*, 577–583. [CrossRef]
102. Liu, X.; Wei, L.; Zhao, B.; Cai, X.; Dong, C.; Yin, F. Low expression of KCNN3 may affect drug resistance in ovarian cancer. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *18*, 1377–1386. [CrossRef] [PubMed]
103. Samuel, P.; Pink, R.C.; Caley, D.P.; Currie, J.M.; Brooks, S.A.; Carter, D.R. Over-expression of miR-31 or loss of KCNMA1 leads to increased cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2016**, *37*, 2565–2573. [CrossRef]
104. Chen, S.Z.; Jiang, M.; Zhen, Y.S. HERG K<sup>+</sup> channel expression-related chemosensitivity in cancer cells and its modulation by erythromycin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2005**, *56*, 212–220. [CrossRef]
105. Han, Y.; Shi, Y.; Han, Z.; Sun, L.; Fan, D. Detection of potassium currents and regulation of multidrug resistance by potassium channels in human gastric cancer cells. *Cell Biol. Int.* **2007**, *31*, 741–747. [CrossRef]
106. Leanza, L.; O’Reilly, P.; Doyle, A.; Venturini, E.; Zoratti, M.; Szegezdi, E.; Szabo, I. Correlation between potassium channel expression and sensitivity to drug-induced cell death in tumor cell lines. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 189–200. [CrossRef]
107. Lam, H.D.; Lemay, A.M.; Kelly, J.; Hill, C.E. Loss of Kv and MaxiK currents associated with increased MRP1 expression in small cell lung carcinoma. *J. Cell. Physiol.* **2006**, *209*, 535–541. [CrossRef] [PubMed]
108. Liang, X.J.; Taylor, B.; Cardarelli, C.; Yin, J.J.; Annereau, J.P.; Garfield, S.; Wincovitch, S.; Szakacs, G.; Gottesman, M.M.; Aszalos, A. Different roles for K<sup>+</sup> channels in cisplatin-resistant cell lines argue against a critical role for these channels in cisplatin resistance. *Anticancer Res.* **2005**, *25*, 4113–4122. [PubMed]
109. Pillozzi, S.; D’Amico, M.; Bartoli, G.; Gasparoli, L.; Petroni, G.; Crociani, O.; Marzo, T.; Guerriero, A.; Messori, L.; Severi, M.; et al. 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* **2018**, *118*, 200–212. [CrossRef]

110. Agarwal, J.R.; Griesinger, F.; Stuhmer, W.; Pardo, L.A. The potassium channel Ether a go-go is a novel prognostic factor with functional relevance in acute myeloid leukemia. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Hui, C.; Lan, Z.; Yue-li, L.; Li-lin, H. Knockdown of Eag1 Expression by RNA Interference Increases Chemosensitivity to Cisplatin in Ovarian Cancer Cells. *Reprod. Sci.* **2015**, *22*, 1618–1626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Lee, E.L.; Hasegawa, Y.; Shimizu, T.; Okada, Y. IK1 channel activity contributes to cisplatin sensitivity of human epidermoid cancer cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2008**, *294*, C1398–C1406. [[CrossRef](#)]
113. Spletstoeser, F.; Florea, A.M.; Busseberg, D. IP(3) receptor antagonist, 2-APB, attenuates cisplatin induced Ca<sup>2+</sup>-influx in HeLa-S3 cells and prevents activation of calpain and induction of apoptosis. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *151*, 1176–1186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Jirsch, J.; Deeley, R.G.; Cole, S.P.; Stewart, A.J.; Fedida, D. Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels and volume-regulated anion channels in multidrug-resistant small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4156–4160.
115. Huang, M.H.; Huang, Y.M.; Wu, S.N. The Inhibition by Oxaliplatin, a Platinum-Based Anti-Neoplastic Agent, of the Activity of Intermediate-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in Human Glioma Cells. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2015**, *37*, 1390–1406. [[CrossRef](#)]
116. Pan, S.T.; Li, Z.L.; He, Z.X.; Qiu, J.X.; Zhou, S.F. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2016**, *43*, 723–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Burg, E.D.; Remillard, C.V.; Yuan, J.X. K<sup>+</sup> channels in apoptosis. *J. Membr. Biol.* **2006**, *209*, 3–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Checchetto, V.; Azzolini, M.; Peruzzo, R.; Capitanio, P.; Leanza, L. Mitochondrial potassium channels in cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *500*, 51–58. [[CrossRef](#)]
119. Bauer, D.; Werth, F.; Nguyen, H.A.; Kiecker, F.; Eberle, J. Critical role of reactive oxygen species (ROS) for synergistic enhancement of apoptosis by vemurafenib and the potassium channel inhibitor TRAM-34 in melanoma cells. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Quast, S.A.; Berger, A.; Buttstadt, N.; Friebel, K.; Schonherr, R.; Eberle, J. General Sensitization of melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis by the potassium channel inhibitor TRAM-34 depends on release of SMAC. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39290. [[CrossRef](#)]
121. Zhang, R.; Tian, P.; Chi, Q.; Wang, J.; Wang, Y.; Sun, L.; Liu, Y.; Tian, S.; Zhang, Q. Human ether-a-go-go-related gene expression is essential for cisplatin to induce apoptosis in human gastric cancer. *Oncol. Rep.* **2012**, *27*, 433–440.
122. Choi, S.Y.; Kim, H.R.; Ryu, P.D.; Lee, S.Y. Regulation of voltage-gated potassium channels attenuates resistance of side-population cells to gefitinib in the human lung cancer cell line NCI-H460. *BMC Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *18*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Liu, H.; Huang, J.; Peng, J.; Wu, X.; Zhang, Y.; Zhu, W.; Guo, L. Upregulation of the inwardly rectifying potassium channel Kir2.1 (KCNJ2) modulates multidrug resistance of small-cell lung cancer under the regulation of miR-7 and the Ras/MAPK pathway. *Mol. Cancer* **2015**, *14*, 59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Bai, Y.; Liao, H.; Liu, T.; Zeng, X.; Xiao, F.; Luo, L.; Guo, H.; Guo, L. MiR-296-3p regulates cell growth and multi-drug resistance of human glioblastoma by targeting ether-a-go-go (EAG1). *Eur. J. Cancer* **2013**, *49*, 710–724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Pillozzi, S.; Masselli, M.; De Lorenzo, E.; Accordi, B.; Cilia, E.; Crociani, O.; Amedei, A.; Veltroni, M.; D'Amico, M.; Basso, G.; et al. Chemotherapy resistance in acute lymphoblastic leukemia requires hERG1 channels and is overcome by hERG1 blockers. *Blood* **2011**, *117*, 902–914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Chavez-Lopez, M.G.; Zuniga-Garcia, V.; Hernandez-Gallegos, E.; Vera, E.; Chasiquiza-Anchatuna, C.A.; Viteri-Yanez, M.; Sanchez-Ramos, J.; Garrido, E.; Camacho, J. The combination astemizole-gefitinib as a potential therapy for human lung cancer. *Oncotargets Ther.* **2017**, *10*, 5795–5803. [[CrossRef](#)]
127. Leanza, L.; Henry, B.; Sassi, N.; Zoratti, M.; Chandy, K.G.; Gulbins, E.; Szabo, I. Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 577–593. [[CrossRef](#)]
128. de Baaij, J.H.; Hoenderop, J.G.; Bindels, R.J. Magnesium in man: Implications for health and disease. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1–46. [[CrossRef](#)]



129. Dibaba, D.; Xun, P.; Yokota, K.; White, E.; He, K. Magnesium intake and incidence of pancreatic cancer: The VITamins and Lifestyle study. *Br. J. Cancer* **2015**, *113*, 1615–1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Zhu, X.; Shrubsole, M.J.; Ness, R.M.; Hibler, E.A.; Cai, Q.; Long, J.; Chen, Z.; Li, G.; Jiang, M.; Hou, L.; et al. Calcium/magnesium intake ratio, but not magnesium intake, interacts with genetic polymorphism in relation to colorectal neoplasia in a two-phase study. *Mol. Carcinog.* **2016**, *55*, 1449–1457. [[CrossRef](#)]
131. Castiglioni, S.; Cazzaniga, A.; Trapani, V.; Cappadone, C.; Farruggia, G.; Merolle, L.; Wolf, F.I.; Iotti, S.; Maier, J.A. Magnesium homeostasis in colon carcinoma LoVo cells sensitive or resistant to doxorubicin. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 16538. [[CrossRef](#)]
132. Middelbeek, J.; Kuipers, A.J.; Henneman, L.; Visser, D.; Eidhof, I.; van Horsen, R.; Wieringa, B.; Canisius, S.V.; Zwart, W.; Wessels, L.F.; et al. TRPM7 is required for breast tumor cell metastasis. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 4250–4261. [[CrossRef](#)]
133. Rybarczyk, P.; Gautier, M.; Hague, F.; Dhennin-Duthille, I.; Chatelain, D.; Kerr-Conte, J.; Pattou, F.; Regimbeau, J.M.; Sevestre, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Transient receptor potential melastatin-related 7 channel is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinomas and regulates human pancreatic cancer cell migration. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, E851–E861. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Chen, Y.; Wei, X.; Yan, P.; Han, Y.; Sun, S.; Wu, K.; Fan, D. Human mitochondrial Mrs2 protein promotes multidrug resistance in gastric cancer cells by regulating p27, cyclin D1 expression and cytochrome C release. *Cancer Biol. Ther.* **2009**, *8*, 607–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Naito, M.; Hamada, H.; Tsuruo, T. ATP/Mg<sup>2+</sup>-dependent binding of vincristine to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11887–11891. [[PubMed](#)]
136. Hamada, H.; Tsuruo, T. Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4926–4932. [[PubMed](#)]
137. Naito, M.; Tsuruo, T. Competitive inhibition by verapamil of ATP-dependent high affinity vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells without calcium ion involvement. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1452–1455.
138. Ali, A.Y.; Kim, J.Y.; Pelletier, J.F.; Vanderhyden, B.C.; Bachvarov, D.R.; Tsang, B.K. Akt confers cisplatin chemoresistance in human gynecological carcinoma cells by modulating PPM1D stability. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54*, 1301–1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Kahn, J.D.; Miller, P.G.; Silver, A.J.; Sellar, R.S.; Bhatt, S.; Gibson, C.; McConkey, M.; Adams, D.; Mar, B.; Mertins, P.; et al. PPM1D-truncating mutations confer resistance to chemotherapy and sensitivity to PPM1D inhibition in hematopoietic cells. *Blood* **2018**, *132*, 1095–1105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Hsu, J.I.; Dayaram, T.; Tovy, A.; De Braekeleer, E.; Jeong, M.; Wang, F.; Zhang, J.; Heffernan, T.P.; Gera, S.; Kovacs, J.J.; et al. PPM1D Mutations Drive Clonal Hematopoiesis in Response to Cytotoxic Chemotherapy. *Cell Stem Cell* **2018**, *23*, 700–713 e706. [[CrossRef](#)]
141. Cao, Y.; Liao, C.; Tan, A.; Liu, L.; Gao, F. Meta-analysis of incidence and risk of hypomagnesemia with cetuximab for advanced cancer. *Chemotherapy* **2010**, *56*, 459–465. [[CrossRef](#)]
142. Petrelli, F.; Borgonovo, K.; Cabiddu, M.; Ghilardi, M.; Barni, S. Risk of anti-EGFR monoclonal antibody-related hypomagnesemia: Systematic review and pooled analysis of randomized studies. *Expert Opin. Drug Saf.* **2012**, *11* (Suppl. 1), S9–S19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Chen, P.; Wang, L.; Li, H.; Liu, B.; Zou, Z. Incidence and risk of hypomagnesemia in advanced cancer patients treated with cetuximab: A meta-analysis. *Oncol. Lett.* **2013**, *5*, 1915–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Wang, Q.; Qi, Y.; Zhang, D.; Gong, C.; Yao, A.; Xiao, Y.; Yang, J.; Zhou, F.; Zhou, Y. Electrolyte disorders assessment in solid tumor patients treated with anti-EGFR monoclonal antibodies: A pooled analysis of 25 randomized clinical trials. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodev. Biol. Med.* **2015**, *36*, 3471–3482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Hsieh, M.C.; Wu, C.F.; Chen, C.W.; Shi, C.S.; Huang, W.S.; Kuan, F.C. Hypomagnesemia and clinical benefits of anti-EGFR monoclonal antibodies in wild-type KRAS metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2047. [[CrossRef](#)]
146. Duran, C.; Thompson, C.H.; Xiao, Q.; Hartzell, H.C. Chloride channels: Often enigmatic, rarely predictable. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 95–121. [[CrossRef](#)]

147. Peretti, M.; Angelini, M.; Savalli, N.; Florio, T.; Yuspa, S.H.; Mazzanti, M. Chloride channels in cancer: Focus on chloride intracellular channel 1 and 4 (CLIC1 AND CLIC4) proteins in tumor development and as novel therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2015**, *1848*, 2523–2531. [[CrossRef](#)]
148. Wang, H.; Zou, L.; Ma, K.; Yu, J.; Wu, H.; Wei, M.; Xiao, Q. Cell-specific mechanisms of TMEM16A Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel in cancer. *Mol. Cancer* **2017**, *16*, 152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Alexander, S.P.; Kelly, E.; Marrion, N.V.; Peters, J.A.; Faccenda, E.; Harding, S.D.; Pawson, A.J.; Sharman, J.L.; Southan, C.; Davies, J.A.; et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Other ion channels. *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174* (Suppl. 1), S195–S207. [[CrossRef](#)]
150. Marin, M.; Poret, A.; Maillet, G.; Le Boulenger, F.; Le Foll, F. Regulation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels in multi-drug resistant MCF7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 1266–1278. [[CrossRef](#)]
151. Ise, T.; Shimizu, T.; Lee, E.L.; Inoue, H.; Kohno, K.; Okada, Y. Roles of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel in cisplatin-induced apoptosis in human epidermoid cancer cells. *J. Membr. Biol.* **2005**, *205*, 139–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Lee, E.L.; Shimizu, T.; Ise, T.; Numata, T.; Kohno, K.; Okada, Y. Impaired activity of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel is involved in cisplatin resistance of cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **2007**, *211*, 513–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Okada, Y.; Sato, K.; Numata, T. Pathophysiology and puzzles of the volume-sensitive outwardly rectifying anion channel. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 2141–2149.
154. Min, X.J.; Li, H.; Hou, S.C.; He, W.; Liu, J.; Hu, B.; Wang, J. Dysfunction of volume-sensitive chloride channels contributes to cisplatin resistance in human lung adenocarcinoma cells. *Exp. Biol. Med.* **2011**, *236*, 483–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Poulsen, K.A.; Andersen, E.C.; Hansen, C.F.; Klausen, T.K.; Hougaard, C.; Lambert, I.H.; Hoffmann, E.K. Deregulation of apoptotic volume decrease and ionic movements in multidrug-resistant tumor cells: Role of chloride channels. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *298*, C14–C25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Yang, X.; Zhu, L.; Lin, J.; Liu, S.; Luo, H.; Mao, J.; Nie, S.; Chen, L.; Wang, L. Cisplatin activates volume-sensitive like chloride channels via purinergic receptor pathways in nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Membr. Biol.* **2015**, *248*, 19–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Hoffmann, E.K.; Sorensen, B.H.; Sauter, D.P.; Lambert, I.H. Role of volume-regulated and calcium-activated anion channels in cell volume homeostasis, cancer and drug resistance. *Channels* **2015**, *9*, 380–396. [[CrossRef](#)]
158. Shimizu, T.; Lee, E.L.; Ise, T.; Okada, Y. Volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel as a regulator of acquired cisplatin resistance. *Anticancer Res.* **2008**, *28*, 75–83.
159. Voss, F.K.; Ullrich, F.; Munch, J.; Lazarow, K.; Lutter, D.; Mah, N.; Andrade-Navarro, M.A.; von Kries, J.P.; Stauber, T.; Jentsch, T.J. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC. *Science* **2014**, *344*, 634–638. [[CrossRef](#)]
160. Planells-Cases, R.; Lutter, D.; Guyader, C.; Gerhards, N.M.; Ullrich, F.; Elger, D.A.; Kucukosmanoglu, A.; Xu, G.; Voss, F.K.; Reincke, S.M.; et al. Subunit composition of VRAC channels determines substrate specificity and cellular resistance to Pt-based anti-cancer drugs. *EMBO J.* **2015**, *34*, 2993–3008. [[CrossRef](#)]
161. Fujimoto, M.; Inoue, T.; Kito, H.; Niwa, S.; Suzuki, T.; Muraki, K.; Ohya, S. Transcriptional repression of HER2 by ANO1 Cl<sup>-</sup> channel inhibition in human breast cancer cells with resistance to trastuzumab. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *482*, 188–194. [[CrossRef](#)]
162. Kang, M.K.; Kang, S.K. Pharmacologic blockade of chloride channel synergistically enhances apoptosis of chemotherapeutic drug-resistant cancer stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *373*, 539–544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Qu, H.; Chen, Y.; Cao, G.; Liu, C.; Xu, J.; Deng, H.; Zhang, Z. Identification and validation of differentially expressed proteins in epithelial ovarian cancers using quantitative proteomics. *Oncotarget* **2016**, *7*, 83187–83199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Yu, W.; Cui, R.; Qu, H.; Liu, C.; Deng, H.; Zhang, Z. Expression and prognostic value of CLIC1 in epithelial ovarian cancer. *Exp. Ther. Med.* **2018**, *15*, 4943–4949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Bill, A.; Gutierrez, A.; Kulkarni, S.; Kemp, C.; Bonenfant, D.; Voshol, H.; Duvvuri, U.; Gaither, L.A. ANO1/TMEM16A interacts with EGFR and correlates with sensitivity to EGFR-targeting therapy in head and neck cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 9173–9188. [[CrossRef](#)]

166. Weylandt, K.H.; Nebrig, M.; Jansen-Rosseck, N.; Amey, J.S.; Carmena, D.; Wiedenmann, B.; Higgins, C.F.; Sardini, A. CIC-3 expression enhances etoposide resistance by increasing acidification of the late endocytic compartment. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 979–986. [[CrossRef](#)]
167. Xu, Y.; Zheng, H.; Kang, J.S.; Zhang, L.; Su, J.; Li, H.Y.; Sun, L.K. 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid induced drug resistance to cisplatin in human erythroleukemia cell lines. *Anat. Rec.* **2011**, *294*, 945–952. [[CrossRef](#)]
168. Zhang, Y.; Zhou, L.; Zhang, J.; Zhang, L.; Yan, X.; Su, J. Suppression of chloride voltage-gated channel 3 expression increases sensitivity of human glioma U251 cells to cisplatin through lysosomal dysfunction. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 835–842. [[CrossRef](#)]
169. Fujimoto, M.; Kito, H.; Kajikuri, J.; Ohya, S. Transcriptional repression of human epidermal growth factor receptor 2 by CIC-3 Cl<sup>-</sup> /H<sup>+</sup> transporter inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Sci.* **2018**, *109*, 2781–2791. [[CrossRef](#)]
170. Su, J.; Xu, Y.; Zhou, L.; Yu, H.M.; Kang, J.S.; Liu, N.; Quan, C.S.; Sun, L.K. Suppression of chloride channel 3 expression facilitates sensitivity of human glioma U251 cells to cisplatin through concomitant inhibition of Akt and autophagy. *Anat. Rec.* **2013**, *296*, 595–603. [[CrossRef](#)]
171. Chen, Q.; Liu, X.; Luo, Z.; Wang, S.; Lin, J.; Xie, Z.; Li, M.; Li, C.; Cao, H.; Huang, Q.; et al. Chloride channel-3 mediates multidrug resistance of cancer by upregulating P-glycoprotein expression. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *234*, 6611–6623. [[CrossRef](#)]
172. Zhang, H.; Pang, Y.; Ma, C.; Li, J.; Wang, H.; Shao, Z. CIC5 Decreases the Sensitivity of Multiple Myeloma Cells to Bortezomib via Promoting Prosurvival Autophagy. *Oncol. Res.* **2018**, *26*, 421–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Wu, J.; Wang, D. CLIC1 Induces Drug Resistance in Human Choriocarcinoma Through Positive Regulation of MRP1. *Oncol. Res.* **2017**, *25*, 863–871. [[CrossRef](#)]
174. House, C.D.; Wang, B.D.; Ceniccola, K.; Williams, R.; Simaan, M.; Olender, J.; Patel, V.; Baptista-Hon, D.T.; Annunziata, C.M.; Gutkind, J.S.; et al. Voltage-gated Na<sup>+</sup> Channel Activity Increases Colon Cancer Transcriptional Activity and Invasion Via Persistent MAPK Signaling. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Nelson, M.; Yang, M.; Millican-Slater, R.; Brackenbury, W.J. Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget* **2015**, *6*, 32914–32929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Yildirim, S.; Altun, S.; Gumushan, H.; Patel, A.; Djamgoz, M.B. Voltage-gated sodium channel activity promotes prostate cancer metastasis in vivo. *Cancer Lett.* **2012**, *323*, 58–61. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Gerard, V.; Rouzaire-Dubois, B.; Dilda, P.; Dubois, J.M. Alterations of ionic membrane permeabilities in multidrug-resistant neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Exp. Biol.* **1998**, *201*, 21–31.
178. Yamashita, N.; Hamada, H.; Tsuruo, T.; Ogata, E. Enhancement of voltage-gated Na<sup>+</sup> channel current associated with multidrug resistance in human leukemia cells. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3736–3741.
179. Zhang, Y.; Zhang, T.; Wu, C.; Xia, Q.; Xu, D. ASIC1a mediates the drug resistance of human hepatocellular carcinoma via the Ca<sup>2+</sup> /PI3-kinase /AKT signaling pathway. *Lab. Investig. A J. Tech. Methods Pathol.* **2017**, *97*, 53–69. [[CrossRef](#)]
180. Kondratskyi, A.; Kondratska, K.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2015**, *1848*, 2532–2546. [[CrossRef](#)]
181. Kunzelmann, K. Ion channels in regulated cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 2387–2403. [[CrossRef](#)]
182. Badaoui, M.; Mimsy-Julienne, C.; Saby, C.; Van Gulick, L.; Peretti, M.; Jeannesson, P.; Morjani, H.; Ouadid-Ahidouch, H. Collagen type 1 promotes survival of human breast cancer cells by overexpressing Kv10.1 potassium and Orai1 calcium channels through DDR1-dependent pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 24653–24671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Gueguinou, M.; Harnois, T.; Crottes, D.; Uguen, A.; Deliot, N.; Gambade, A.; Chantome, A.; Haelters, J.P.; Jaffres, P.A.; Jourdan, M.L.; et al. SK3/TRPC1/Orai1 complex regulates SOCE-dependent colon cancer cell migration: A novel opportunity to modulate anti-EGFR mAb action by the alkyl-lipid Ohmlin. *Oncotarget* **2016**, *7*, 36168–36184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Belpomme, D.; Gauthier, S.; Pujade-Lauraine, E.; Facchini, T.; Goudier, M.J.; Krakowski, I.; Netter-Pinon, G.; Frenay, M.; Gousset, C.; Marie, F.N.; et al. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann. Oncol.* **2000**, *11*, 1471–1476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

185. Lester-Coll, N.H.; Supko, J.G.; Kluytenaar, J.; Pavlik, K.F.; Yu, J.B.; Moliterno, J.; Piepmeier, J.; Becker, K.; Baehring, J.M.; Huttner, A.; et al. Mibefradil dihydrochloride with hypofractionated radiation for recurrent glioblastoma: A phase I dose expansion trial. *J. Clin. Oncol.* **2018**, *36*, e14046. [[CrossRef](#)]
186. Yu, L.J.; Wall, B.A.; Chen, S. The current management of brain metastasis in melanoma: A focus on riluzole. *Expert Rev. Neurother.* **2015**, *15*, 779–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Mehnert, J.M.; Silk, A.W.; Lee, J.H.; Dudek, L.; Jeong, B.S.; Li, J.; Schenkel, J.M.; Sadimin, E.; Kane, M.; Lin, H.; et al. A phase II trial of riluzole, an antagonist of metabotropic glutamate receptor 1 (GRM1) signaling, in patients with advanced melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2018**, *31*, 534–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



## Résumé

Durant les processus métastatiques mammaires, les cellules acquièrent des capacités migratoires, notamment par un remaniement du cytosquelette, mais également un remodelage des capacités adhésives hautement dépendantes de la concentration calcique intracellulaire. Depuis deux décennies, plusieurs travaux ont montré l'implication des canaux calciques dans la modulation des capacités métastatiques mammaires. Récemment, plusieurs études ont permis d'établir un rôle du canal calcique Orai3 dans plusieurs processus tumoraux tels que la résistance à la chimiothérapie et la prolifération ainsi que l'apoptose des cellules cancéreuses exprimant les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, le rôle du canal Orai3 dans l'agressivité tumorale mammaire tel que le processus migratoire demeure méconnu.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'entrée de calcium, par le canal Orai3, dans les lignées cancéreuses de type basal (MDA-MB-231 et MDA-MB-231 BrM2). En effet, nous avons montré, pour la première fois, que le canal Orai3 est activé au niveau basal, indépendamment des stocks calciques réticulaires, et régule la concentration calcique intracellulaire. D'autre part, nous avons démontré que cette signature calcique régule la migration des cellules cancéreuses mammaires. De plus, nous avons établi que cette modulation des capacités migratoires dépend des facultés adhésives cellulaires. Durant ce processus, la calpaïne (protéase hautement dépendante du calcium) voit son activité modifiée selon l'expression d'Orai3. Lorsque le canal Orai3 est moléculairement invalidé, l'activité de la calpaïne chute entraînant ainsi une adhésivité des cellules importante corrélée à une migration cellulaire réduite.

D'autre part, nous avons mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression d'Orai3 et la morphologie cellulaire des lignées cancéreuses utilisées. En effet, la diminution d'expression d'Orai3 est associée à une morphologie cellulaire arrondie. De façon intéressante, nous avons découvert que cette régulation de la morphologie cellulaire dépendante d'Orai3 passe par un remaniement du cytosquelette d'actine de façon indépendante du calcium suggérant un effet impliquant Orai3 en tant que protéine (et non pas son activité canalaire). Ce résultat suggère l'interaction d'Orai3 avec des protéines de signalisation impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine. En effet, l'inhibition moléculaire d'Orai3 est associée à une diminution de l'expression de *Focal Adhesion Kinase* (FAK) sans pour autant moduler son activité.

En conclusion, nos résultats révèlent le rôle pivot d'Orai3 dans les processus migratoires des cellules cancéreuses mammaires basales, *via* une modulation de l'adhésion cellulaire dépendante du calcium et du remodelage du cytosquelette d'actine indépendamment du calcium.

Mots-clés : Cancer du sein, Orai3, Calcium, Migration cellulaire, calpaïne, cytosquelette

## Abstract

During breast cancer metastatic processes, cancer cells acquire migratory capacities through a reshaping of the cytoskeleton, but also a remodelling of the adhesive capacities highly dependent on the intracellular calcium concentration. For two decades, several studies have shown the involvement of calcium channels in the modulations of breast metastatic capacities. Recently, studies have demonstrated a role of Orai3 in several tumour processes such as resistance to chemotherapy and proliferation and apoptosis of breast cancer cells expressing oestrogen receptors. However, the role of the Orai3 calcium channel in breast tumour aggressiveness such as the migratory process remains poorly understood.

First, we characterized the entry of calcium, through the Orai3 channel, in basal-like cancer cell lines (MDA-MB-231 and MDA-MB-231 BrM2). Indeed, we have shown for the first time that the Orai3 channel is activated at the basal level, independently of the endoplasmic reticulum calcium stores, and regulates the intracellular calcium concentration. We have shown that this calcium signature regulates the cell migration of breast cancer cells. Indeed, cell migration is dependent on the entry of calcium by Orai3. Besides, we have established that this modulation of migratory capacities depends on cellular adhesive faculties. During this process, calpain (a highly calcium-dependent protease) presents a modified activity according to the expression of Orai3. During the silencing of Orai3, the activity of calpain drops, resulting in significant cell adhesiveness correlated with reduced cell migration.

On the other hand, we have demonstrated an inverse correlation between the expression of Orai3 and the cell morphology of the cancer lines used. Indeed, the decrease in Orai3 expression is associated with a rounded cell morphology. Interestingly, we have discovered that this regulation of cell morphology involves a remodelling of the actin cytoskeleton in a calcium-independent manner suggesting an effect involving Orai3 as a protein (and not as a calcium channel). This result suggests the involvement of signalling proteins involved in the remodelling of the actin cytoskeleton. Indeed, the molecular inhibition of Orai3 is associated with a decrease in the expression of Focal Adhesion Kinase (FAK) without modulating its activity.

In conclusion, our results reveal the pivotal role of Orai3 in the migratory processes of basal mammary cancer cells, via both calcium-dependent modulation of cell adhesion and calcium-independent actin cytoskeleton remodelling.

Mots-clés : Breast cancer, Orai3, Calcium, Cell migration, calpain, cytoskeleton