



HAL
open science

Mécanismes ioniques dans l'adaptation tumorale

Antoine Folcher

► **To cite this version:**

Antoine Folcher. Mécanismes ioniques dans l'adaptation tumorale. Cancer. Université de Lille, 2023. Français. NNT: 2023ULILS103 . tel-04320866

HAL Id: tel-04320866

<https://theses.hal.science/tel-04320866>

Submitted on 4 Dec 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.



UNIVERSITÉ DE LILLE
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Lille

Présentée et soutenue par :

ANTOINE FOLCHER

MECANISMES IONIQUES DANS L'ADAPTATION TUMORALE

Thèse dirigée par le Pr Natalia Prevarskaya
Soutenue le 31 mars 2023

Jury :

Pr François Foulquier, Université de Lille (Villeneuve d'Ascq, France)	Président
Pr Olivier Soriani, Université, Institut de Biologie Valrose (Nice, France)	Rapporteur
Dr Corinne Bousquet, Cancer Research Center of Toulouse (Toulouse, France)	Rapporteur
Dr Arnaud Monteil, Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier, France)	Examineur
Pr Halima Ouadid Ahidouch, Université de Picardie (Amiens, France)	Examineur
Pr Roman Skryma, Université de Lille (Villeneuve d'Ascq, France)	Examineur
Pr Natalia Prevarskaya, Université de Lille (villeneuve d'Ascq, France)	Directrice de Thèse

Thèse réalisée au sein du laboratoire de Physiologie Cellulaire INSERM U1003
UNIVERSITÉ DE LILLE, Villeneuve d'Ascq

Abstract

Cancer is the most important health care charge in the world due to the increase of the number of patients. Cancer-related deaths are due to the evolution of the disease to metastatic, chemotherapy-resistant stages. In this context, we studied two cancer models: prostate cancer and pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Amongst carcinomas diagnosed in men, prostate cancer has one of the highest mortality rates. The standard hormone-based therapy works for a limited time and most patients then die within months from metastasis, i.e., cancer spreading and formation of secondary tumors. Pancreatic cancer is estimated as the second cause of mortality in 2030 especially due to the early metastasis development and inefficient chemotherapy. Thus, at present, there is a great unmet need for novel molecular targets to control metastatic disease in both prostate cancer and PDAC. This PhD project was devoted to expanding the current knowledge on ion-dependent signaling pathways implicated in the cellular processes of metastasis development using *in vitro* and *in vivo* models respectively.

Membrane ion channels, which are pivotal regulators of cellular homeostasis, offer exciting prospects for cancer field. In particular, deregulated homeostasis of sodium (Na^+) has been associated with advanced malignant phenotype in many human carcinomas. In late stages of prostate cancer (androgen-independent stage) we identified the overexpression of NALCN (Sodium Leak Channel Non-selective) protein and its partners (UNC79, UNC80, NLF1) which form a channelosome. This channelosome, by controlling calcium oscillations activity, generates an influx of sodium necessary for invadopodia formation and MMP secretion involved in invasion and migration. Mechanistically, NALCN associates functionally with plasmalemmal and mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers, reactive oxygen species (ROS) and store-operated channels to generate intracellular Ca^{2+} oscillations. In turn, this stimulates the activity of protooncogene Src kinase (which is co-localized with NALCN), actin remodeling and secretion of proteolytic enzymes resulting in increase of invasive potential, tumor progression and metastatic lesions *in vivo* (accessed in xenograft pre-clinical models). NALCN's channelosome is also found in other cancers and in pancreatic cancer in mutated forms. The inefficiency of chemotherapy in PDAC is due to the dense fibrotic stroma around epithelial cancer cells. To define the molecular actors involved in cell-to-cell cellular communication inducing desmoplasia, we generated a new model (2D and 3D) to mimic this specific microenvironment, especially the increased stiffness of the matrix and coculture with different cancer cell types and stromal cells. By RNAseq method, we found an important gene cluster in charge of the modulation of cell motility by the increased matrix stiffness and fibrotic

microenvironment. Moreover, we demonstrated that cell migration of stellate cells (in contrast to cancer cells) is regulated by calcium signaling and, in particular, SOCE.

Overall, our data provide evidence of NALCN contribution to the increased metastatic potential of human prostate cancer cells. Therefore, NALCN could provide new highly perspective molecular target for the disease suppression, in particular at the advanced stages of the malignancy dissemination within the patient's body. This mechanism could be common with other cancers like PDAC where intercellular communication is the major factor of genetic rearrangements during the disease development. Targeting actors of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ signaling pathways like NALCN and SOCE could modulate PDAC desmoplasia and improve the efficiency of chemotherapy.

Résumé vulgarisé en français :

Des études récentes indiquent que les altérations du fonctionnement des canaux ioniques pourraient jouer un rôle important dans l'initiation et le développement des tumeurs. Ces altérations de canaux ioniques perturbent la physiologie cellulaire jusqu'à l'apparition clinique d'une pathologie appelée *canalopathie*. Les récentes avancées de la médecine ont permis de démontrer que de nombreuses pathologies, incluant des cancers, étaient en fait des *canalopathies*. La localisation tissu-spécifique de ces canaux pourrait permettre de traiter la *canalopathie* en limitant les effets sur les autres organes. C'est pourquoi l'attention des chercheurs et des cliniciens s'oriente de plus en plus vers l'étude de ciblage des canaux ioniques pour les traitements des cancers.

Ce projet de thèse consiste en l'étude du rôle du canal sodique NALCN et des canaux calciques dans le développement des métastases dans deux types de cancers redoutables : les cancers de la prostate et du pancréas.

Résumé vulgarisé en anglais:

The main source of death from cancer comes from the progression of this disease through the spread of the tumor (metastasis), and a diminished response to treatment. We focused on prostate cancer and pancreatic cancer to show that the progression of prostate cancer to advanced stages of cancer is accompanied by an increase in sodium. This sodium is responsible for activating the processes necessary for developing metastases by a specific molecule (NALCN). This NALCN protein is also found in other types of cancer and in pancreatic cancer, one of the specificities of which is its rigidity which is due to the cells which surround the cancerous cells. This is why we have set up models to study the communication between cells in order to increase the effectiveness of existing drugs. Targeting molecules like NALCN could improve current treatments.

Remerciements

Premièrement, je tenais à remercier les membres du jury, Pr Oliver Soriani et Dr Corinne Bousquet qui ont accepté de prendre le temps d'être rapporteurs de cette thèse, Pr François Foulquier, Dr Arnaud Monteil qui ont suivi mon travail depuis le début de ma thèse et avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer sur d'autres projets, Pr Halima Ouadid-Ahidouch pour notre collaboration, Pr Roman Skryma, du temps accordé pour évaluer ce travail.

Un remerciement particulier pour Natacha, qui m'a accueilli au sein du laboratoire, ce qui m'a permis d'évoluer et d'apprendre, qui a consacré du temps pour suivre ce travail et l'orienter par ses conseils, son implication pour permettre la production des articles en cours de soumissions/révisions.

J'ai eu l'occasion de rencontrer de nombreuses personnes au cours de cette thèse, certaines m'ont apporté de l'aide, d'autres pas, mais je tenais à les remercier, car toutes m'auront permis d'apprendre.

Pour mes collègues au laboratoire, je ne vais pas tous les citer, mais au moins Dima, bien que nous ayons eu des moments difficiles, pour toute l'aide fournie concernant l'article NALCN. À Artem et Katya, qui ne sont plus dans le laboratoire, mais avec qui j'ai beaucoup eu l'occasion de discuter et avec qui je continue de discuter en dehors du laboratoire. Je tiens également à remercier plus particulièrement Silviya avec qui j'ai passé de longs moments dans le laboratoire jusqu'à avoir passé des nuits ensemble. Brigitte, que l'on ne voit pas souvent, mais qui est toujours prête à rendre service avec une gentillesse sans égale. Émilie, Nathalie et Laurent avec qui nous avons passé de bons moments devant un café. Christophe et Emmanuelle qui a parfois donné lieu à de longue discussion. Sarah, Aurélien, Lina, Madeleine, Thomas et Dheeraj pour avoir partagé certaines galères et tous les autres membres du laboratoire qui se reconnaîtront pour avoir été présents pour le meilleur et parfois le pire.

Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai pu collaborer, la startup HCS pharma avec de belles rencontres notamment Nathalie, Zied, et Élodie.

Pour finir, bien évidemment mon compagnon pour son soutien, mes amis notamment Cécile, ma famille et ma belle-famille.

*“Le silence permet de rester honnête. L'honnêteté est la base de l'estime de soi.
Quand on ne peut pas dire la vérité, mieux vaut se taire.”*
Geling Yan

Introduction	10
I. Le cancer.....	11
La cancérogenèse et les caractéristiques du cancer.....	12
Évolution du cancer, reprogrammation et adaptation.....	13
Le cancer de la prostate	16
Le cancer du pancréas	20
Le développement des métastases	26
II. Le micro-environnement tumoral	31
Les cellules du micro-environnement tumoral.....	32
La matrice extracellulaire	36
La rigidité de la matrice	42
III. L'homéostasie ionique.....	47
L'homéostasie calcique.....	47
Organisation spatiotemporelle du calcium intracellulaire	53
La communication calcium - sodium	56
L'homéostasie sodique	57
IV. Le canal sodique NALCN (Sodium Leak Channel Non-selective).....	59
Famille et structure	60
Propriété physique et fonctionnelle	62
Expression de NALCN.....	65
La formation d'un « canalosome »	65
Rôle physiologique	69
Rôle pathologique	70
V. Problématique de recherche	72
Matériels et méthodes.....	74
<i>Lignées cellulaires et culture</i>	75
<i>Transfection</i>	76
<i>Prolifération cellulaire</i>	76
<i>Extraction d'ARN et retrotranscription</i>	77
<i>RT-PCR et qRT-PCR</i>	77
<i>Immunodétection</i>	78
<i>Biotinylation</i>	79
<i>Immunocytochimie</i>	79
<i>Migration et invasion en chambre de Boydens</i>	80
<i>Patch-clamp</i>	80

<i>Imagerie calcique et sodique</i>	80
<i>Préparation des matrices de différentes rigidités</i>	81
<i>RNAseq</i>	81
Résultats	83
PARTIE 1 CANCER DE LA PROSTATE	84
Le canal sodique NALCN est présent dans les cellules cancéreuses prostatiques.....	85
La régulation négative de NALCN diminue l'invasion cellulaire	86
La régulation négative de NALCN diminue l'entrée sodique intracellulaire.....	87
La régulation négative de NALCN diminue les oscillations calciques	89
NALCN est responsable de courant sodique entrant dans les cellules cancéreuses prostatiques à la suite d'une activation cellulaire par du SVF.....	91
NALCN est responsable du phénotype invasif in vitro	96
Méthodologie CRISPR-Cas9	96
Clones d'intérêt obtenu.....	97
Autres clones obtenus par commandes à la société Horizon	100
La surexpression de NALCN augmente l'agressivité des cellules cancéreuses.....	102
NALCN est responsable du phénotype invasif des cellules in Vivo.....	103
Rôle de NALCN dans le maintien des oscillations calciques	105
La translocation de NALCN à la membrane plasmique régule son activité	108
Rôle de NALCN dans l'invasion du cancer de la prostate	108
Discussion et perspective première partie	142
1. Modulation de l'activité du canal NALCN	143
2. Translocation de NALCN à la membrane plasmique	144
3. Régulation de l'expression de NALCN.....	146
4. NALCN est également associé à l'agressivité d'autres cancers	148
PARTIE 2 : CANCER DU PANCRÉAS	149
Méthodologie mise en place pour mimer la rigidité de la matrice in vitro	150
Méthodologie 3D.....	150
Méthodologie 2D.....	152
La communication intercellulaire en fonction des différentes rigidités matricielles. ...	154
RNAseq single cell en fonction des rigidités matricielles et des cocultures	154
L'expression génique des PS-1 dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures	156
L'expression génique des PANC1 dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures	161

L'expression génique des Capan-1 dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures	163
Étude de la migration/invasion des cellules en fonction des rigidités matricielle et des cocultures.	166
La rigidité module l'entrée calcique	169
Modulation du SOCE en 2D	169
Modulation du SOCE en 3D	172
Discussion et perspective deuxième partie	174
TGFb1, médiateur pour les cellules cancéreuses ?.....	176
Discussion.....	179
Références.....	183
Annexes.....	211
Contributions et publications.....	217
² Univ. Lille, INSERM, U1003, Phycell- Canaux ioniques, inflammation et cancer, F-59000 Lille, France	290



Introduction



I. Le cancer

La place du cancer dans la vie de tous les jours est de plus en plus importante, par l'incidence de cette maladie en constante augmentation. Dans les années 2000, étaient recensés environ 5,8 millions de cas (Parkin *et al*, 2005). Ce nombre a plus que doublé en 10 ans avec environ 14 millions de cas en 2012 (Ferlay *et al*, 2015), et qui n'a cessé d'augmenter inexorablement représentant actuellement 19 millions de cas annuel (Sung *et al*, 2021). Les cancers représentent une maladie majeure dans le monde, et les projections prévoient que le nombre de patients atteints de cancer continuera de croître pendant au moins la prochaine décennie (Foreman *et al*, 2018; Bray *et al*, 2012). Depuis 2010, cela représente une augmentation de 26,3% des nouveaux cas, et une augmentation de 20,9% des décès. La plus forte augmentation en pourcentage du nombre de cas et de décès s'est produite dans des pays avec un index sociodémographique faible (Kocarnik *et al*, 2022). Le cancer est devenu un problème de santé publique majeur, par son incidence toujours plus importante, et également par les dépenses publiques qui sont engagées dans la mise en place de traitement. Ce coût inclut ici les dépenses liées à la prise en charge des patients, incluant les médecins, le coût des infrastructures tel que les hôpitaux, le matériel tel que le scanner ou l'analyse de biopsie ainsi les traitements mis en place. Ce coût de fonctionnement public associé au cancer en Europe représente presque 200 milliards d'euros annuels, dont 33 milliards rien qu'en France, ce qui la positionne en deuxième position après l'Allemagne (Hofmarcher *et al*, 2020).

Ces dépenses ont probablement augmenté ces dernières années, notamment dues à l'augmentation constante de nouveaux cas. Outre les dépenses monétaires associées à cette pathologie, le patient en lui-même souffre de la maladie en elle-même, mais également d'un point de vue psychologique. La mise en place du traitement et l'entrée de ces patients dans un processus qui est loin d'être confortable dans leurs vies quotidiennes provoque dans bon nombre de cas une détresse psychologique importante (Hulbert-Williams *et al*, 2018). Ceci a un impact sur leur vie professionnelle avec le plus souvent une diminution de la productivité (Steiner *et al*, 2004), et bien évidemment, impacte également leur qualité de vie personnelle ainsi que celle de leur proche (Hulbert-Williams *et al*, 2018).

C'est pourquoi les recherches visant à améliorer les traitements ou la prise en charge des patients revêtent un intérêt tout particulier.

Le développement des cancers peut être comparé aux théories de l'évolution. En effet, Il existe des parallèles entre l'origine évolutive des espèces et de « nouveaux concepts » sur l'origine des cancers. Les cancers peuvent être considérés comme une nouvelle espèce

somatique se développant au sein de l'organisme hôte. Le premier modèle mis en avant dans le développement du cancer est un modèle dit stochastique avec la possibilité pour une cellule ayant subi une altération de donner des clones tumorigènes. Dans ce modèle, tout repose sur l'altération aléatoire des cellules suivies d'une sélection des clones par pression. À mon sens cette vision ne reflète pas l'évolution de cette maladie. En effet, désormais, nous savons que les cellules cancéreuses sont capables de répondre à certains stimuli et de s'adapter. Dans le terme adaptation, j'entends également une réorganisation de l'expression du génome permettant de survivre dans un environnement inhospitalier. Il est donc nécessaire de prendre en compte les aspects qui ne sont pas uniquement intrinsèques à la tumeur c'est-à-dire l'environnement, puisque les cellules tumorales s'adaptent et répondent à leur environnement. En tant qu'espèce à part entière, ces cellules cancéreuses cherchent à coloniser le tissu avoisinant et plus distant (métastases). Cette idéologie de développement explique aussi en partie les résistances qui apparaissent au fur et à mesure de la mise en place de traitement. Les cellules pour survivre s'adaptent et remodelent leurs génomes pour survivre dans un environnement inhospitalier. Dans cette étude nous allons nous focaliser sur deux types de cancers qui présentent tous deux des caractéristiques invasives et un développement de métastases important souvent létale pour les patients.

La cancérogenèse et les caractéristiques du cancer

La cancérogenèse représente un ensemble de processus qui permettent la transformation d'un tissu sain (physiologique) en tissu cancéreux (pathologique). Ceci se caractérise par une accumulation d'altérations génétiques qui peuvent se produire de façon naturelle (erreur lors de la réplication) ou à la suite d'un stress important (eg : radiation, exposition UV, ...). Ces modifications de l'ADN des mutations, ou encore des cassures des brins d'ADN. Physiologiquement, les dommages à l'ADN sont reconnus par les cellules qui cherchent à réparer l'ADN (Jackson & Bartek, 2009; Rass *et al*, 2012). Dans le cas où les dommages à l'ADN seraient trop importants, les cellules peuvent entamer un processus de mort cellulaire comme l'apoptose, ou encore du recyclage par autophagie (Nagelkerke *et al*, 2015; Babaei *et al*, 2021). Dans le processus de cancérogenèse, l'accumulation de ces petites erreurs induit souvent un phénotype cellulaire altéré (bénin ou précancéreux) qui sous pression environnementale évolue pour former une tumeur primaire. Cette tumeur primaire est souvent composée de cellules qui présentent un patrimoine génétique qui diffère et cela participe à la formation de l'hétérogénéité tumorale (Marusyk *et al*, 2012).

Ces cellules cancéreuses présentent alors un phénotype particulier avec des spécificités qui leur sont propres (Hanahan & Coussens, 2012; Anderson *et al*, 2019; Hanahan, 2022). L'évolution des connaissances a également fait évoluer le nombre de ces caractéristiques passant de 10 à 14 aujourd'hui (Figure 1) (Hanahan, 2022). A été ajouté plus récemment l'aspect sur la modification du phénotype cellulaire par une modulation de la plasticité phénotypique (eg: dédifférenciation, ...). D'autres aspects qui concernent les micro-environnements tumoraux ont également vu prendre place dans ces caractéristiques du cancer notamment avec l'apparition des microbiomes tumoraux et les reprogrammations épigénétiques qui ne sont pas dues à des mutations.



Figure 1 : les caractéristiques du cancer

Représentation graphique des 14 caractéristiques de l'évolution des cancers. Adapté de (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022)

Évolution du cancer, reprogrammation et adaptation

Les cellules cancéreuses ne présentent pas nécessairement toutes ces caractéristiques en même temps, mais ces caractéristiques représentent l'intégralité des cellules cancéreuses, et l'évolution du cancer. Le plus souvent, le cancer évolue à partir d'une lésion dite précancéreuse ou à la suite de pathologie chronique telle que la pancréatique chronique, qui

induit de petites lésions par un processus d'inflammation récurrent. Le développement du cancer a été mis en avant comme étant un processus gain de fonction ou perte de fonction régulatrice. En effet est très largement mis en avant l'aspect gains de propriétés telles que la prolifération, l'invasion et la migration, notamment par la perte des signaux régulateurs. Cette idée a longtemps permis d'envisager une recherche basée sur les processus qui sont à l'origine du contrôle de ces mécanismes et les découvertes réalisées au fur et à mesure des années démontrent un processus plus complexe. En effet, pour chaque processus du développement du cancer, il existe une modulation de l'expression de gènes qui peut évoluer en fonction du besoin des cellules cancéreuses. En réalité, les cellules cancéreuses remodelent les signaux cellulaires et voies de signalisation pour leurs propres développements. Il s'agit plutôt d'une reprogrammation cellulaire en réponse aux stimuli extérieurs. Cette reprogrammation permet alors l'utilisation de processus biologiques existants dans les cellules (Doello, 2018). Nous pouvons prendre l'exemple de l'utilisation de processus du développement embryonnaire afin de favoriser l'échappement au système immunitaire ou encore induire des réorganisations cellulaires importantes.

De plus, ces cellules sont souvent décrites comme sélectionnées par une pression due au système immunitaire ou encore par la mise en place de traitement. Cependant, il semblerait qu'il s'agisse plutôt d'une adaptation face à l'environnement dans lequel ces cellules se trouvent. En effet, il est peu probable que la pression de sélection médicamenteuse puisse permettre une sélection d'une sous-population cellulaire résistante au traitement préexistant dans une tumeur hétérogène. La mise en place de traitements combinés, dans ce cas, permettrait d'enrayer le phénomène de résistance, or, d'autres apparaissent au sein de cette tumeur, ce qui correspond plus à un mécanisme d'adaptation à l'environnement afin de permettre sa survie.

La plupart des tumeurs commencent par des mutations dans des oncogènes (eg. KRAS) ou des gènes suppresseurs de tumeurs (eg. P53). Ces mutations provoquent un taux de prolifération élevé de cellules avec un phénotype très similaire aux cellules normales. Néanmoins, ces cellules n'ont pas encore la capacité d'envahir les tissus avoisinants ni d'induire des métastases. C'est ensuite, dans un processus appelé progression tumorale, que les tumeurs acquièrent un potentiel invasif, néo-angiogénique et métastatique (Aizenstein, 2008). Doello émet l'hypothèse que le processus de transformation de tumeurs bénignes en tumeurs malignes est une reprogrammation cellulaire qui conduit les cellules tumorales bénignes à l'acquisition de caractéristiques trophoblastiques tout en conservant les caractéristiques de leurs tissus d'origine. Par conséquent, les cancers sont différents selon le tissu d'origine dont ils proviennent, mais partageraient leurs propriétés malignes (invasivité, potentiel

métastatique, etc.) dues à l'expression d'un phénotype trophoblastique. (Doello, 2018). Il a également été mis en évidence que les cellules cancéreuses, les cellules souches cancéreuses et les cellules souches embryonnaires partagent de nombreuses caractéristiques. Ces cellules sont compétentes à la fois pour la prolifération et la différenciation. Il est important de noter que des facteurs induisant la pluripotence telle que OCT4, SOX2 et Nanog exprimé dans les cellules souches embryonnaires sont également retrouvés exprimés dans les cellules souches cancéreuses (Visvader & Lindeman, 2008). OCT4, NANOG et SOX2 forment le réseau de régulation de base responsable de l'autorenouvellement et la différenciation des cellules souches embryonnaires, alors que l'expression aberrante d'OCT4, SOX2 et NANOG dans plusieurs types de cancers est cohérente avec l'implication dans l'oncogenèse (Guo *et al*, 2011). Ces facteurs de transcriptions qui déclenchent une reconfiguration moléculaire similaire dans les cellules souches embryonnaires et le cancer sont désormais considérés comme un lien commun entre l'embryogenèse et l'oncogenèse, et sont surexprimés dans les cancers du poumon, du sein, du côlon, de la prostate (Kar & Patra, 2018; Klimczak, 2015). Plusieurs autres études ont démontré que Oct4, Sox2 et Nanog seuls ou en différentes combinaisons avec des facteurs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et l'oncogenèse sont surexprimés dans plusieurs types de cancers (Ezeh *et al*, 2005). La croissance néoplasique du sein, de la vessie, du poumon non à petites cellules, de l'estomac, de l'œsophage ainsi que des tumeurs des cellules germinales ont été associés à la surexpression d'Oct4 (Zhang *et al*, 2010; Su *et al*, 2021; Rijlaarsdam *et al*, 2012; Huang *et al*, 2012). De plus, une expression élevée d'Oct4 dans ces cancers a été associée à un mauvais pronostic et à une survie plus courte (He *et al*, 2012; Lin *et al*, 2012). La surexpression de Nanog a également été rapportée, comme impliquée dans certaines tumeurs agressives (Zbinden *et al*, 2010; Choi *et al*, 2012; Han *et al*, 2012; Tsai *et al*, 2011). Plus récemment, une étude a montré que les marqueurs de cellules souches CD133, Nestin et OCT4 sont fortement exprimés dans les cellules du rétinoblastome qui ont la capacité d'auto-régénération et de transformation oncogénique (Tang *et al*, 2019). La réexpression de ces gènes embryonnaires en supplément des mutations spécifiques trouvées dans les cancers pourrait expliquer la pluripotence des cellules tumorales.

Les enjeux des recherches actuelles sont donc différents en fonction de l'avancement des connaissances de chaque type de cancer. Nous nous focaliserons sur deux cancers, le cancer de la prostate et le cancer du pancréas. Ces deux types de cancers sont différents dans l'état d'avancement des recherches et des traitements qui sont mis en place.

Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate représente une incidence annuelle importante puisqu'il s'agit du deuxième cancer chez l'homme après le cancer du poumon (Sung *et al*, 2021). Environ 1,4 million de nouveaux cas sont détectés chaque année avec près de 400000 décès.

La prostate est une petite glande qui fait partie de l'appareil uro-génital masculin avec une fonction génitale du fait de son rôle dans l'élaboration du liquide séminal (Figure 2 partie haute). D'un point de vue anatomique (Figure 2) cette glande est composée de quatre zones selon Mc Neal (zone centrale, zone périphérique, zone de transition, et la zone du stroma fibromusculaire antérieur). Histologiquement, elle est composée de tissu glandulaire et de tissu non glandulaire. Le tissu glandulaire est composé d'acini qui produisent les sécrétions et des canaux, alors que la partie non glandulaire est composée de muscles lisses et de stroma conjonctif.

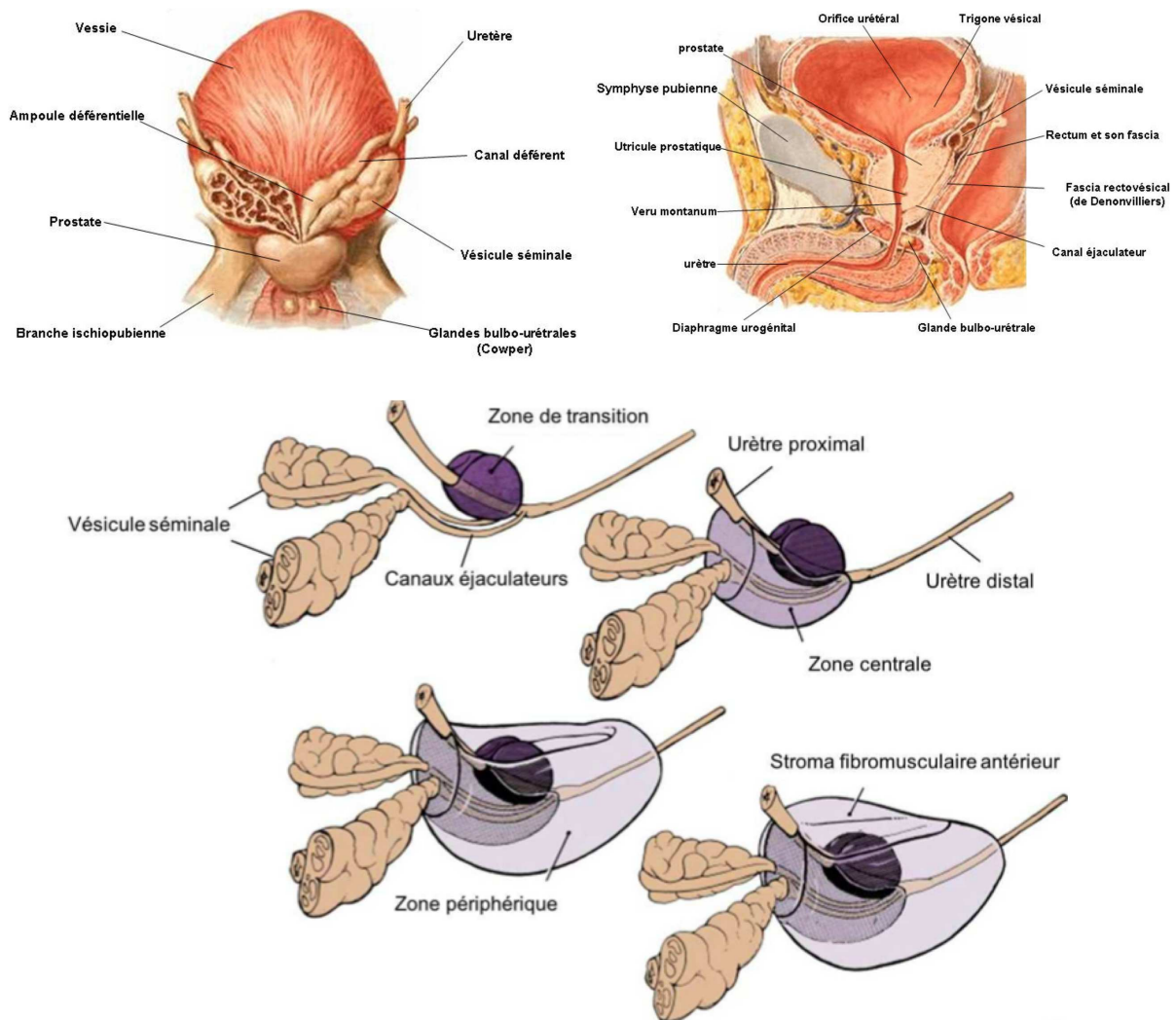


Figure 2 : Représentation anatomique de la prostate (Partie haute) vue postérieure et coupe sagittale de la prostate (selon Netter). (Partie basse) Schéma de l'anatomie par zone définie selon Mc Neal

Cette glande reste sous dépendance des androgènes qui sont nécessaires à son fonctionnement (production du liquide prostatique), à la prolifération cellulaire et à son développement (Dai *et al*, 2017). La testostérone et ses dérivés comme le DHT (dihydrotestostérone) agissent sur la prostate par la stimulation du récepteur aux androgènes qui, une fois activé, va avoir une action nucléaire et jouer un rôle de facteur de transcription dans sa voie génomique (canonique). Ce récepteur peut avoir un mode d'action sans être transloqué dans le noyau, c'est sa voie non génomique (non-canonique) en activant d'autres protéines cytosoliques. L'existence de ces deux voies, qui permettent une action plus ou moins rapide, avec une action immédiate de l'ordre de la seconde dans la voie non-canonique et plus lente par la voie canonique. Ces voies de signalisations se retrouvent altérées lors du développement d'adénocarcinome.

L'adénocarcinome de la prostate se développe à partir des cellules épithéliales qui se situent dans la zone de transition. Ce cancer a un processus de développement qui est lent, et peut mettre jusqu'à plusieurs années avant de se développer en adénocarcinome à la suite de l'apparition d'une néoplasie intraépithéliale (Figure 3) (Ayala & Ro, 2007).

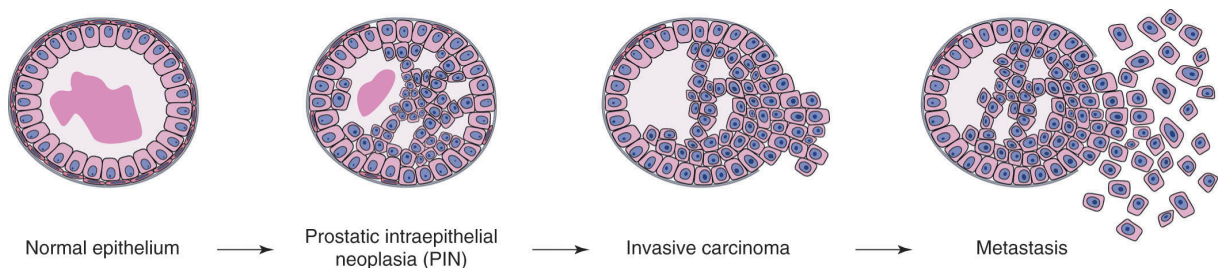


Figure 3 : Évolution et développement du cancer de la prostate. Représentation des lésions précurseurs du carcinome prostatique, et son évolution jusqu'à la dissémination de métastases (Abate-Shen & Shen, 2002)

L'adénocarcinome de la prostate se développe souvent en périphérie de la glande et est classé lors du diagnostic par le score de Gleason en fonction de son évolution (Figure 4). Cet indice de Gleason donne une projection sur l'évolution du cancer, un score élevé signifie un cancer à plus haut risque avec une agressivité plus importante. Ce score de Gleason permet de catégoriser et aider dans la prise de décision de traitement à la suite du diagnostic.

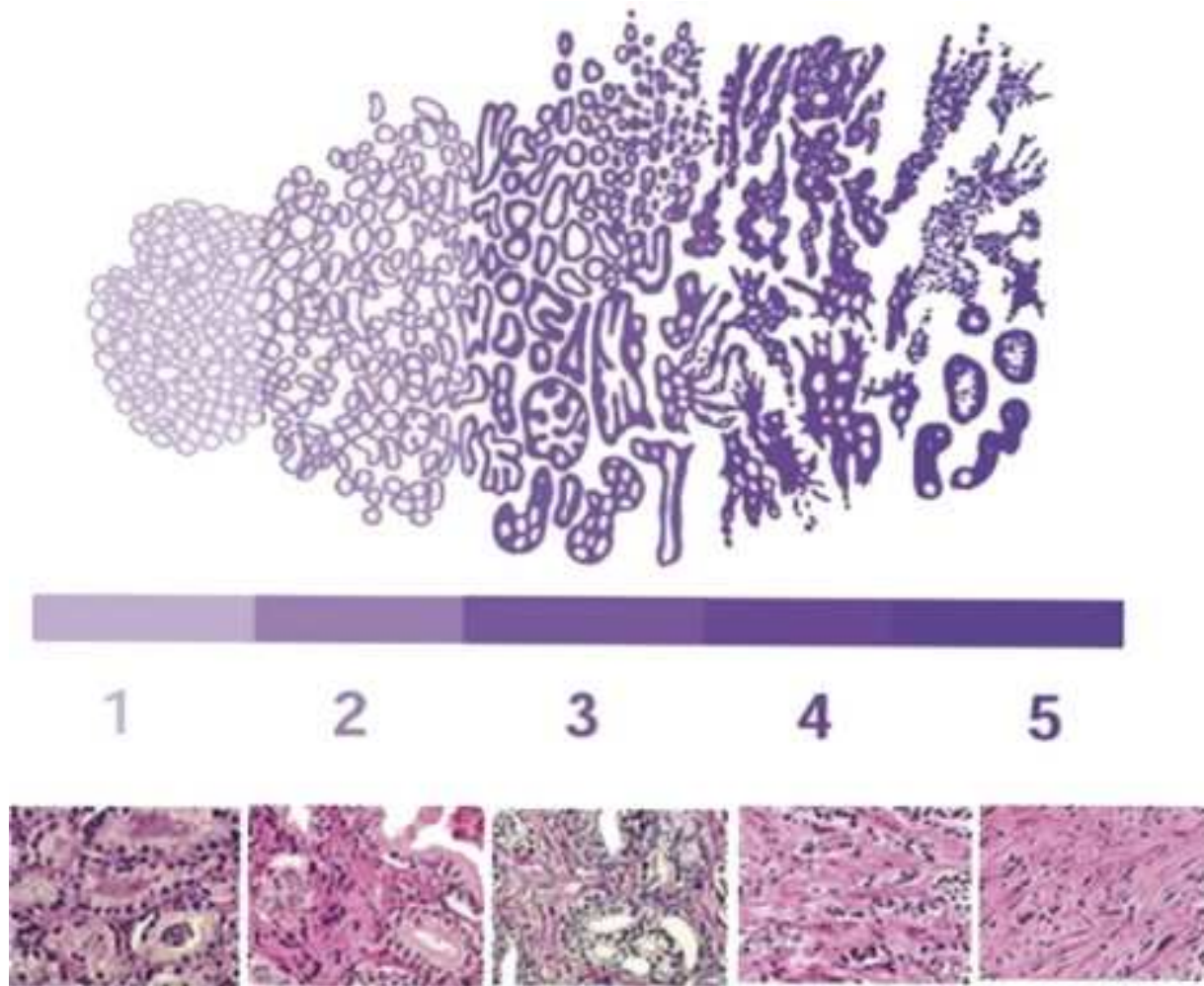


Figure 4 : représentation du score de Gleason

Représentation des structures histologiques qui permettent de définir le score de Gleason et les photos de coupe de tissus correspondant à chaque score (Harnden et al, 2007). Grade 1 : Petites glandes bien différenciées, foyer circonscrit. Grade 2 : glandes régulières en taille et en forme, foyers à bords mal définis. Grade 3 : glandes de taille et de forme variable, espacement irrégulier, foyer à bords très irréguliers. Grade 4 : Glandes fusionnées, massifs et cordons irréguliers. Grade 5 : Disparition des structures glandulaires.

À la suite de ce diagnostic, différents traitements peuvent être mis en place, et l'aide au choix du traitement, en supplément du score de Gleason, passe par la classification TNM (Figure 5). Le but de cette classification est de donner un ordre d'idée sur le volume tumoral total. La tumeur primaire est notée par le T (Tumor extend), l'invasion ganglionnaire par N (lymph node invasion) et la présence éventuelle de métastases par le M noté de façon binaire M0 (absence) et M1 (présence). La dernière mise à jour de cette classification (la version 9) a été publiée en 2021 pour une application le 1 janvier 2023 (Olawaiye et al, 2021).

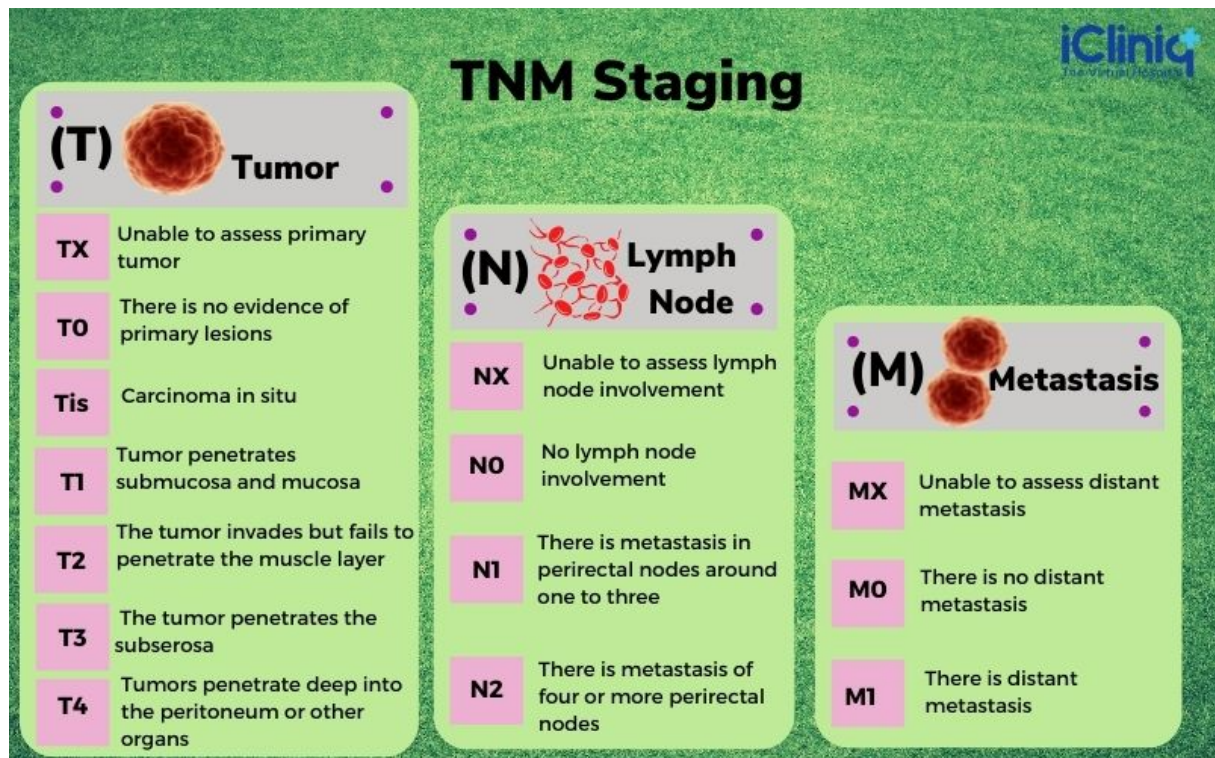


Figure 5 : tableau de critère de classification TNM

Classification TNM pour la prise en compte de la Tumeur (T), classifié de Tx à T4 en fonction de la lésion et des propriétés invasives. Les ganglions sont notés, comme impliqués ou non par la lettre N (noté de Nx à N2) et enfin la partie métastases notée par la lettre M notée de Mx jusque M1 <https://www.icliniq.com/articles/cancer/cancer-staging> par Dr. Gayathri-Praveen

Le traitement principal du cancer de la prostate reste actuellement la chirurgie avec une prostatectomie totale qui peut être combinée avec une radiothérapie. Dans le cas de l'évolution du cancer vers un stade androgéno-indépendant (qui apparaît plus tardivement après l'apparition du cancer), le traitement hormono-thérapeutique peut être un recours avec la mise en place ou non d'une chimiothérapie, s'il existe une présence ou un risque de métastases. Par ailleurs, l'incidence du cancer de la prostate androgéno-indépendant semble être en augmentation. Une étude réalisée sur des résultats d'autopsies montre que 13,3 % des patients présentaient des lésions métastatiques avec une perte du récepteur aux androgènes (RA) avec des caractéristiques neuroendocrines (NE) et 23,3 % supplémentaires présentaient des lésions avec une perte du RA sans caractéristiques NE. Cette fréquence est plus élevée que celle observée dans les autopsies réalisées avant l'approbation d'inhibiteurs de la signalisation RA (tels que l'enzalutamide et l'acétate d'abiratérone) (Bluemn *et al*, 2017). La West Coast Dream Team, évalue les biopsies métastatiques d'une cohorte de 202 patients à la suite d'une progression du cancer de la prostate des patients sous inhibiteurs de la signalisation RA. Les résultats de l'étude, montrent que 17 % des patients présentaient des signes histologiques de cancer de la prostate NE à petites cellules, qui a été corrélé avec un

risque accru de décès par le développement de métastases (Aggarwal *et al*, 2018). Des altérations telles que la perte de TP53 et de RB1, sont souvent acquises au cours de la résistance au traitement. De multiples études précliniques montrent que le déficit combiné en TP53 et RB1 facilite le phénotype NE (Ku *et al*, 2017; Zhou *et al*, 2007, 2006; Kaur *et al*, 2020). SOX2 peut également être impliqué dans le retour des cellules à un état pluripotent pour permettre la différenciation vers le phénotype NE (Ku *et al*, 2017; Metz *et al*, 2020). Des recherches récentes ont révélé qu'une expression élevée de SOX2 peut également activer SPINK1, qui joue un rôle dans le maintien de ce phénotype NE (Tiwari *et al*, 2020).

Les métastases qui sont issues des adénocarcinomes de la prostate sont la cause principale de décès chez les patients et ont des organes d'implantations préférentiels. En effet, on retrouve de nombreuses métastases prostatiques touchant les os principalement puis le foie et le poumon (Djamgoz *et al*, 2014). La recherche réalisée sur ce cancer consiste dans l'amélioration de la prise en charge des patients, pour les patients qui sont en récurrences, et qui peuvent présenter des résistances aux traitements ou un développement de métastases.

Le cancer du pancréas

Le cancer du pancréas quant à lui représente beaucoup moins de patients par un taux d'incidence beaucoup plus faible avec environ 495 000 cas par an, mais constitue une part importante des décès par cancer avec 466 000 décès par an (Sung *et al*, 2021). Actuellement en 7^e position des décès par cancer, on estime qu'il sera sur le podium en 2^e position d'ici 2030.

Le Pancréas est une glande qui fait partie de l'appareil digestif qui est notamment connu pour la régulation du glucose par la sécrétion d'hormones (insuline et glucagon) dans la circulation sanguine. Cette sécrétion d'hormones régulant le glucose sanguin est la partie endocrine de la glande qui représente une petite portion du pancréas (environ 10%), la majeure partie étant exocrine (environ 90%) qui participe dans la sécrétion d'enzymes digestives (Figure 6). Histologiquement, cette partie exocrine est composée d'acini qui forment de petits lobes permettant la sécrétion d'enzymes digestives vers le lumen de ces lobes où l'on retrouve un réseau de canaux. Les différents petits lobes d'acini sont reliés entre eux par de petits canaux qui s'anastomosent en canal intermédiaire qui se jette sur le canal principal du pancréas.

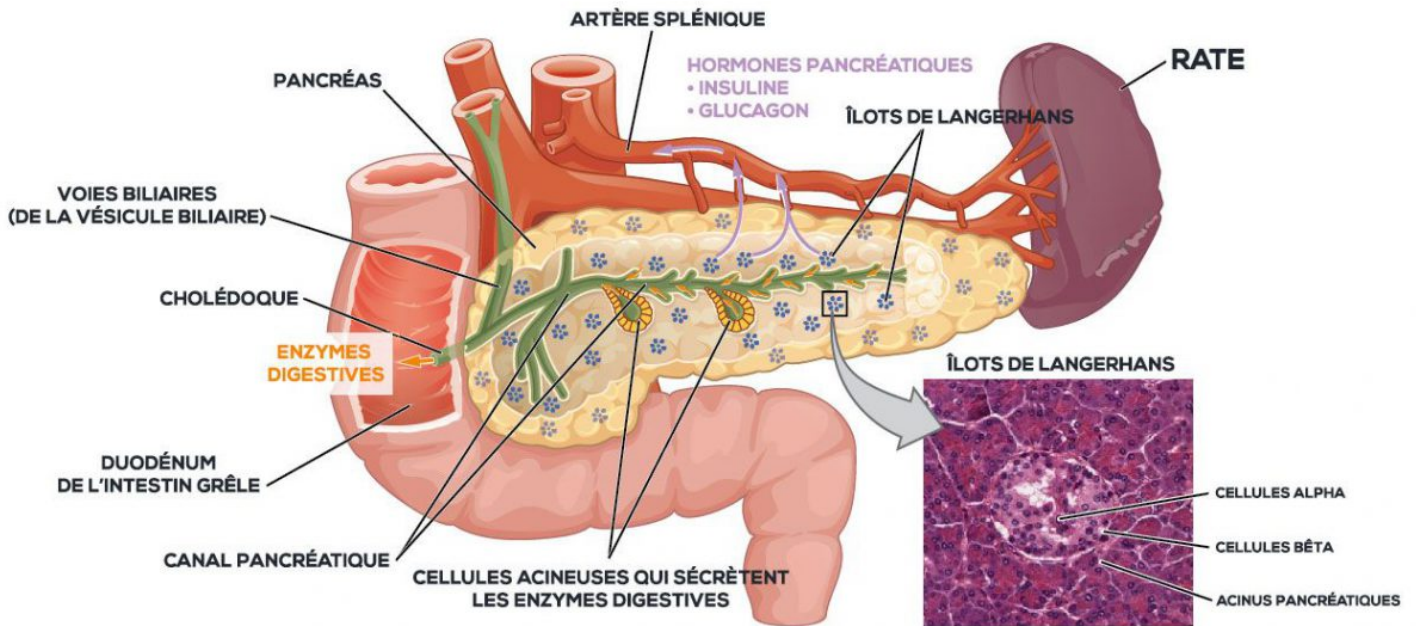


Figure 6 : représentation schématique du pancréas

La partie exocrine du pancréas qui permet la libération d'enzyme digestive sécrétée par les acini et relarguée dans le canal pancréatique. La partie endocrine sécrète les hormones pancréatiques insuline et glucagon nécessaire à la régulation du taux de sucre dans le sang, sécrété par les îlots de Langerhans <https://foie-pancreas-strasbourg.eu/pathologies/pancreas/>

Lors de développement de cancer de cette glande, parmi tous les types de cancer du pancréas, l'adénocarcinome canalaire pancréatique (ACCP) est le plus fréquent, représentant 90% des tumeurs malignes du pancréas (Hidalgo, 2010; Kleeff *et al*, 2016).

De multiples facteurs de risque ont été mis en évidence, notamment le tabagisme, l'abus d'alcool, le diabète, l'âge et la pancréatite chronique. Les patients atteints de pancréatite chronique présentent un risque 14 fois plus élevé de développer un ACCP. Cette pathologie est considérée comme un facteur de risques important dans le développement de lésion précancéreuse favorisant le développement d'ACCP (Pandol *et al*, 2012). Outre les facteurs environnementaux, les prédispositions génétiques (Gentiluomo *et al*, 2022) liées à des mutations génétiques peuvent également conduire au développement de l'ACCP. Son mauvais pronostic est principalement dû à la progression asymptomatique de cette pathologie, associée à une propagation métastatique à un stade précoce et à une forte chimiorésistance (Hidalgo, 2010; Oettle, 2014).

L'ACCP infiltre rapidement les tissus environnants, notamment les tissus lymphatiques, la rate, et la cavité péritonéale. Cette infiltration s'accompagne de métastases précoces dans des organes préférentiels tels que les poumons et le foie. L'ACCP est issu de trois types de lésions

précurseurs non invasives, suivies d'altérations génétiques, aboutissant au développement d'une tumeur totalement invasive (Figure 7). Ces lésions comprennent les néoplasmes intraépithéliaux du pancréas (PanIN), les néoplasmes kystiques mucineux (MCN) et les néoplasmes mucineux papillaires intracanaux (IPMN). Parmi ces lésions, les PanINs sont les lésions les plus fréquentes représentant environ 90% des cas. Comme pour le cancer de la prostate, il existe une classification en fonction de la prolifération cellulaire, la désorganisation architecturale et les atypies nucléaires induites par ces lésions. Cela permet de classer les PanIN en trois grades (de I à III), le grade I étant le moins grave et le grade III se transformant finalement en ACCP invasif.

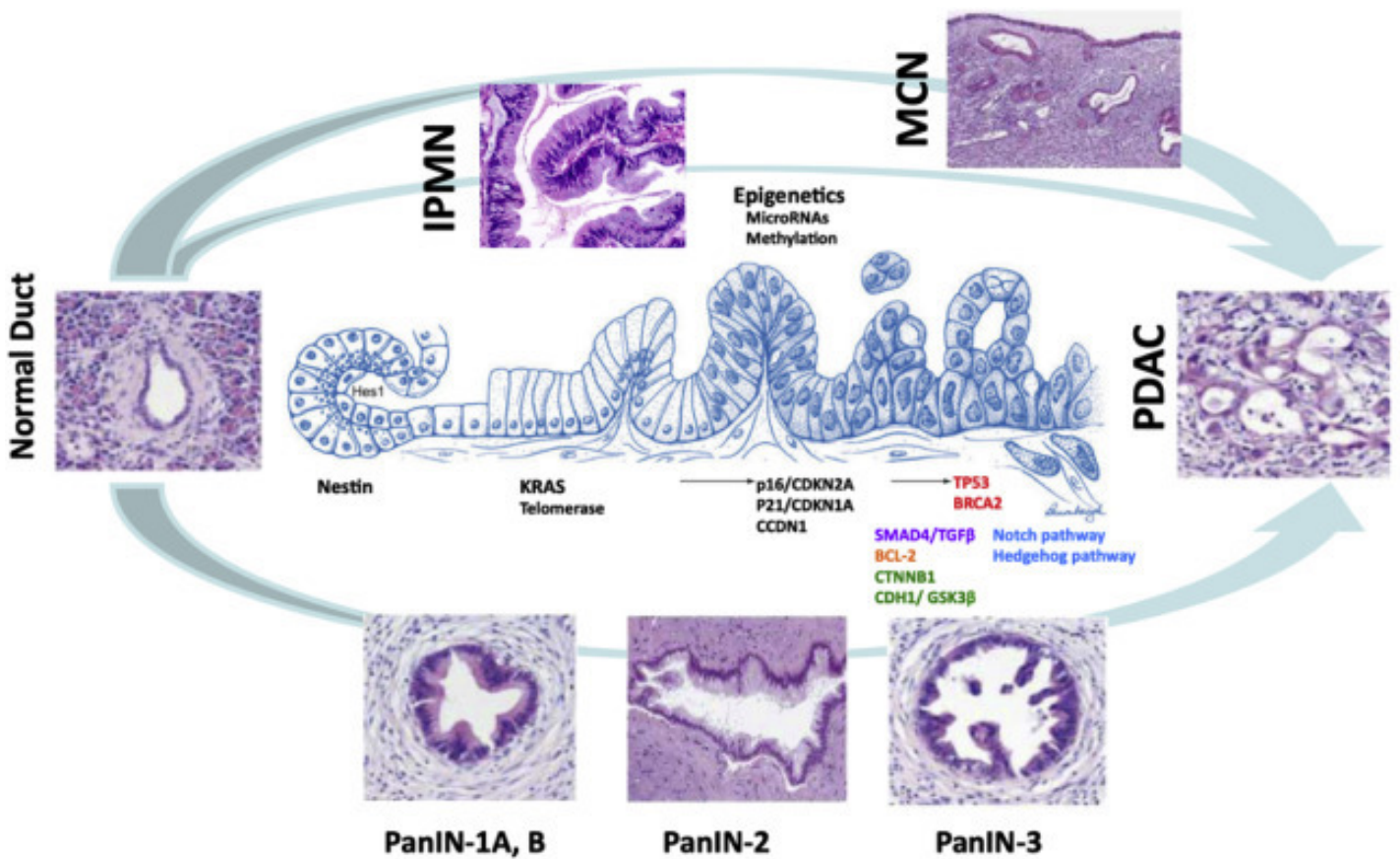


Figure 7 : Représentation des lésions précancéreuses pancréatiques jusqu'au développement de l'ACCP. La majorité des lésions à l'origine de l'ACCP sont des lésions de type PanIN, l'évolution s'accompagne souvent de mutations génétiques de type KRAS, p16, p21, TP53, BRCA2. Les lésions de type MCN (néoplasme kystique mucineux) et IPMN (néoplasme mucineux papillaires intracanaux) peuvent être à l'origine d'un développement de l'ACCP, mais restent des lésions minoritaires comparativement aux PanIN (Rajkomar & Jamieson, 2022)

La mutation KRAS, nécessaire à la carcinogenèse et à la progression du cancer, est retrouvée dans environ 90 % des adénocarcinomes canaux pancréatiques (Hingorani *et al*, 2005). Mais, la mutation KRAS seule n'est pas suffisante pour la transformation en tumeur maligne (Feldmann *et al*, 2007). Les données des analyses de séquençage du génome entier ont démontré que des co-mutations sont couramment détectées dans le cancer du pancréas : SMAD4, KRAS, TP53 et CDKN2A (Waddell *et al*, 2015). Des mutations dans les suppresseurs de tumeurs, tels que SMAD4 et CDKN2A, sont nécessaires pour la carcinogenèse en plus de la mutation KRAS (Bardeesy *et al*, 2006). Ainsi, la perte de la signalisation normale de Smad4 peut favoriser la transformation maligne des cellules du canal pancréatique induite par KRAS (Leung *et al*, 2013).

L'oncogène le plus connu impliqué dans l'ACCP est RAS (Figure 8) qui joue un rôle important dans les voies de signalisation régulant la croissance, la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. Les mutations de KRAS sont les mutations les plus fréquemment retrouvées dans les tumeurs solides humaines et environ 90 % des patients atteints d'adénocarcinome canalaire pancréatique portent la mutation KRAS de type G12D, G12V et dans de plus rare cas G12C (Knudsen *et al*, 2016; Kanda *et al*, 2012; Qian *et al*, 2018). Ces mutations KRAS induisent une activation constitutive par la liaison permanente au GTP qui régule positivement l'expression protéique du récepteur EGFR et induit une suractivité de celui-ci (Sidaway, 2017; Ardito *et al*, 2012). L'activité constitutive de KRAS a pour conséquence une augmentation robuste de l'activité MEK / ERK, conduisant à une néoplasie intraépithéliale (Navas *et al*, 2012). L'activation de RAS induit deux voies de signalisation, la voie RAF/MEK/ERK, et la voie PI3K/AKT/mTOR, qui vont alors favoriser la survie cellulaire, la prolifération et la tumorigenèse (Li *et al*, 2018; Qian *et al*, 2020).

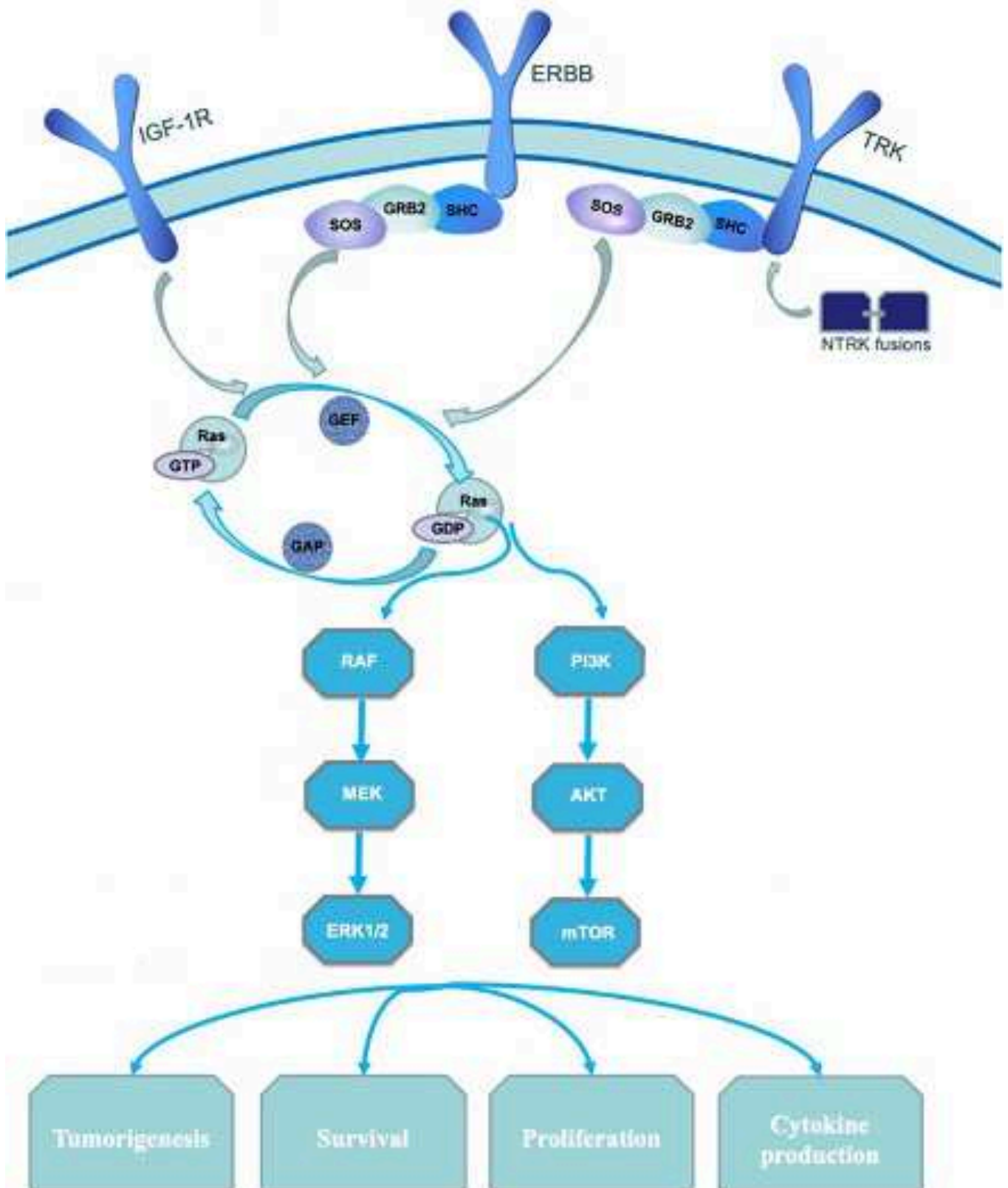


Figure 8 : Voie de signalisation dépendante de RAS :
Activation de l'oncogène Ras à l'origine de signalisation intracellulaire responsable de la prolifération cellulaire et la survie, la tumorigenèse et la production de cytokines (adapté de (Qian et al, 2020))

Le gène TP53 est situé sur le locus chromosomique 17p13.1, codant pour une protéine appelée tumor protein p53 (ou p53), qui entre dans le groupe des gènes suppresseur de tumeur. La protéine p53 est un facteur de transcription qui régule l'expression de plusieurs gènes (Verseman *et al*, 2022; Lacroix *et al*, 2013). Parmi ses fonctions biologiques, nous retrouvons l'inhibition de la prolifération cellulaire par l'induction de l'expression de p21, et l'induction de l'apoptose des cellules tumorales (Vogelstein *et al*, 2000; Blandino & Di Agostino, 2018). Le gène TP53 est le suppresseur de tumeur le plus couramment inactivé dans l'ACCP avec environ 70 % des patients qui portent des altérations de ce gène (Knudsen *et al*, 2016; Qian *et al*, 2018). Dans les modèles animaux ou les lignées cellulaires, TP53 joue un rôle clé dans la réponse aux agents génotoxiques, en particulier les anti-cancéreux. L'inactivation de TP53 pourrait accroître ainsi une sensibilité à certains agents et une résistance à d'autres. Un autre gène est mis en avant dans le développement de l'ACCP, il s'agit du gène CDKN2A (Hu *et al*, 2018). C'est un gène qui permet la production des protéines p16 et p19 qui ont pour fonction d'arrêter le cycle cellulaire au point de contrôle G1/S via un mécanisme régulé par les CDK4/6 (Bertoli *et al*, 2013). Environ 60 % des patients atteints d'un ACCP portent des mutations CDKN2A (Knudsen *et al*, 2016; Qian *et al*, 2018), et les mutations germinales de CDKN2A sont associées à un risque élevé de développer un ACCP (Hu *et al*, 2018).

Environ 40 % des patients atteints d'ACCP portent des mutations SMAD4 (Knudsen *et al*, 2016; Qian *et al*, 2018; Makohon-Moore & Iacobuzio-Donahue, 2016). SMAD4 contrôle la signalisation en aval de la voie du facteur de croissance TGF- β et exerce des effets multiples sur la tumorigenèse. Dans les cellules non-cancéreuses ou précancéreuses SMAD4 induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, en revanche, dans l'ACCP, les mutations de SMAD4 empêchent la transduction normale des signaux TGF- β (Shi *et al*, 1997). Ceci a pour conséquence de basculer son rôle de suppresseur de tumeur vers promoteur tumoral, le TGF- β diminuant l'activité des cellules immunitaires, aide les cellules cancéreuses à s'échapper du système immunitaire (Batlle & Massagué, 2019; Sanjabi *et al*, 2017). L'ACCP avec une voie de signalisation TGF- β /SMAD4 altérée peut moduler la réponse fibrotique et la sensibilité aux stimuli mécaniques (Laklai *et al*, 2016). Ceci met en évidence que les altérations moléculaires dans les tumeurs contrôlent non seulement la progression de l'ACCP, mais reprogramment également les phénotypes des cellules du micro-environnement tumoral. Les mutations SMAD4 ont également été corrélées à la fibrose, et des études cliniques les associent à un mauvais pronostic (Oshima *et al*, 2013; Blackford *et al*, 2009).

Cependant, malgré les caractéristiques très invasives et précoces de l'ACCP, l'inefficacité du traitement thérapeutique provient essentiellement du stroma dense et fibreux (desmoplasie).

Cette desmoplasie peut représenter jusqu'à 80% du volume tumoral total, entourant les cellules cancéreuses pancréatiques, diminuant la perfusion et ainsi l'accès des traitements à la tumeur (Norton *et al*, 2020; Vennin *et al*, 2018). La composante cellulaire du stroma fibreux pancréatique est essentiellement constituée de fibroblastes associés au cancer (CAFs) ayant comme sources majoritaires les cellules stellaires pancréatiques (CSP), qui sont en dialogue permanent avec les cellules cancéreuses pancréatiques.

Le développement des métastases

Le développement des métastases est la source principale de décès pour le cancer de la prostate et également un problème majeur dans le cas du cancer du pancréas du fait de leur apparition précoce.

Les cellules cancéreuses existent dans différents états phénotypiques qui facilitent la transition entre la lésion primaire et la colonisation éventuelle de sites secondaires (Aceto *et al*, 2014; Lambert *et al*, 2017), ce qui représente différentes étapes de développement des métastases (Figure 9). Ces étapes sont représentées par le phénomène d'invasion, avant l'intravasation qui permet aux cellules de rejoindre la circulation systémique suivie d'une extravasation afin de pouvoir coloniser un nouveau milieu et produire une tumeur secondaire ou métastase.

L'étape initiatrice de ce processus reste l'invasion et la migration cellulaire, puisque sans mouvement cellulaire et sans sécrétion de MMP il n'y a pas de dissémination possible. On observe alors une modification du phénotype des cellules d'un phénotype épithélial vers un phénotype mésenchymateux par la transition épithélio-mésenchymateuses (TEM) (Figure 10). Cette TEM est un processus normal qui est retrouvé dans l'embryogenèse et dans le cas pathologique comme le cancer est notamment caractérisé par une sécrétion par les cellules de MMP permettant la dégradation de la membrane basale (Thiery, 2002). La mise en place de cette TEM est fortement liée au micro-environnement tumoral notamment par la présence dans le milieu de facteurs tel que le PDGF ou encore le TGF β . La stimulation des cellules cancéreuses par ces facteurs induit les voies de signalisation MAPK, ERK, PI3K qui vont favoriser la production de facteurs de transcription tels que Snail, Slug, Twist (Kalluri & Weinberg, 2009). Ceci va alors favoriser l'expression de N-cadhérine en remplacement de la E-cadhérine et un remodelage cellulaire complet y compris dans la modulation de la sécrétion.

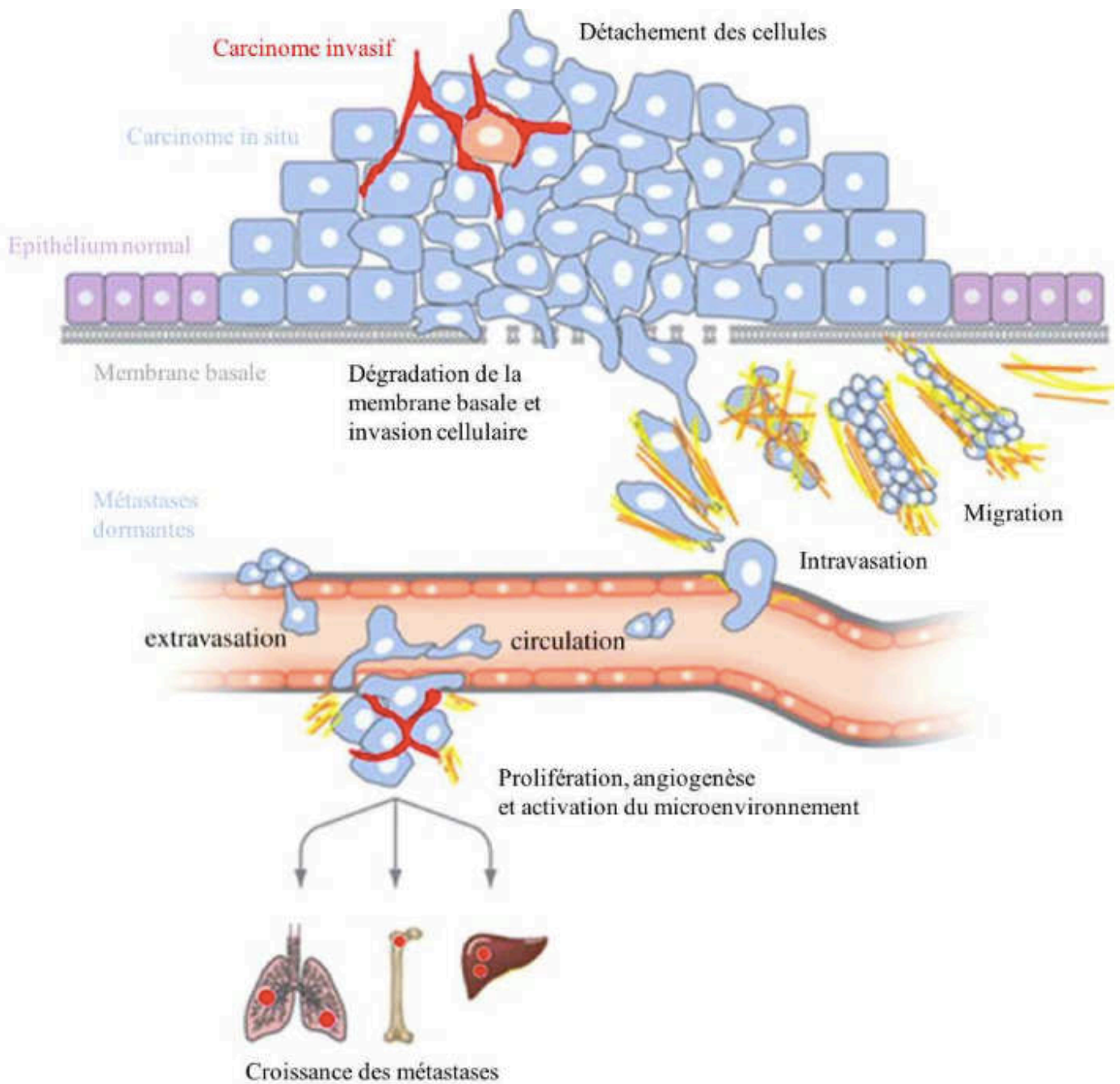


Figure 9 : processus de développement des métastases

Le carcinome devient invasif lorsqu'il dégrade la membrane basale et que les cellules migrent dans le tissu. Ce qui est suivi de l'intravasation, qui est l'étape d'entrée dans les vaisseaux sanguins où les cellules deviennent alors circulantes avant l'étape d'extravasation qui permet aux cellules de sortir des vaisseaux sanguins pour coloniser d'autres tissus et donner des métastases. (Adapté de (Djamgoz et al, 2014))

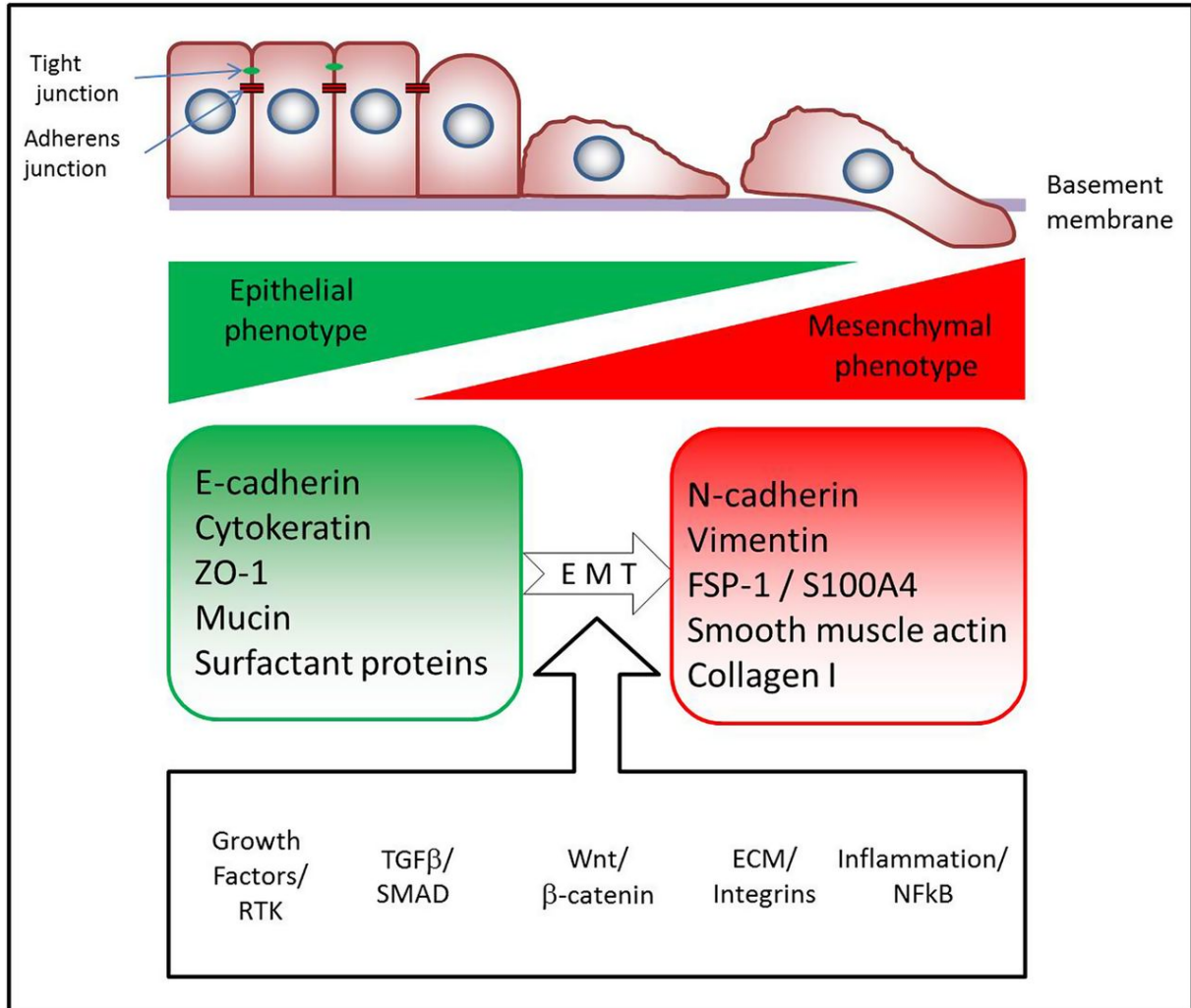


Figure 10 : Processus de TEM

La transition épithélio-mésenchymateuse confère des propriétés mésenchymales à des cellules épithéliales. Il existe des marqueurs spécifiques des cellules épithéliales tels que la E-Cadherine, et des marqueurs spécifiques de propriétés mésenchymateuses comme la N-Cadhérine. Cette TEM peut être induite par l'activation de différentes voies de signalisations (Bartis *et al*, 2014)

La perte ou la diminution de la présence de la E-cadhérine au profit de la N-cadhérine conduit à une diminution des jonctions adhérentes cellule-cellule augmentant ainsi la possibilité de migration cellulaire. Il est important de noter que ce processus de TEM est réversible, l'opposé de la TEM étant la TME (transition mésenchymato-épithéliale) (Pei *et al*, 2019).

À la suite de cette TEM, la migration et invasion cellulaire peut alors débuter. C'est un processus qui est complexe pour la cellule et très énergivore puisque cela nécessite de nombreux remodelages du cytosquelette afin de permettre le mouvement. Cependant, cela reste nécessaire à la condition même du développement métastatique afin de rejoindre la circulation sanguine et permettre la colonisation d'autres milieux plus distants. Les cellules vont alors former des protrusions membranaires (lamellipode, filipodes ou invadopodes)

(Figure 11A). Ces protrusions sont issues du remaniement du cytosquelette et notamment des filaments d'actine sur « l'avant » de la cellule. Ce sont en revanche les invadopodes (Figure 11B et C) qui sont responsables du phénomène d'invasion cellulaire puisque c'est eux qui vont être responsables de la sécrétion des MMPs nécessaires à la dégradation de la lame basale et ainsi permettre un mouvement cellulaire plus distant (Beaty & Condeelis, 2014).

La migration cellulaire est une répétition d'une succession d'étapes débutant par partant à la formation de protrusions à l'avant de la cellule, qui grâce à l'action des complexes ARP1/2 (Actin Related Protein) et WASP (Wiscott Aldrich Syndrome Protein) va permettre la polymérisation de l'actine et l'ancrage de l'actine sur la membrane plasmique (Friedl & Wolf, 2003). Ces protrusions vont alors s'ancrer sur la matrice extracellulaire en formant les points d'adhésion focaux par l'implication des intégrines. Ces intégrines vont alors se regrouper sur ces points d'adhésions focaux et favoriser également le recrutement d'autres protéines intracellulaires afin de permettre une interaction avec l'actine notamment par la vinculine, alpha-actinine ou encore la paxilline (Geiger & Zamir, 2001). Enfin, la cellule va avoir un mouvement, qui va être induit par la contraction du cytosquelette par l'interaction de l'actine et la myosine, et le désassemblage par des protéines (comme la calpaïne) des points d'adhésions focaux se trouvant sur l'arrière de la cellule. La cellule va alors produire cette contraction en ayant comme ancrage les points d'adhésions focaux néoformés à l'avant de la cellule. La migration cellulaire permettant l'invasion est donc une succession de répétition de toutes ces étapes d'assemblage et désassemblage de protéines. Il est important de noter que ces étapes de contraction sont sous le contrôle de l'homéostasie calcique. En effet, les protéines de myosines qui permettent la contraction sont activées par la phosphorylation des chaînes légère de la myosine par la protéine kinase MLKC (Myosin Light Chain Kinase) sous la dépendance du calcium et de la calmoduline (Goeckeler *et al*, 2000).

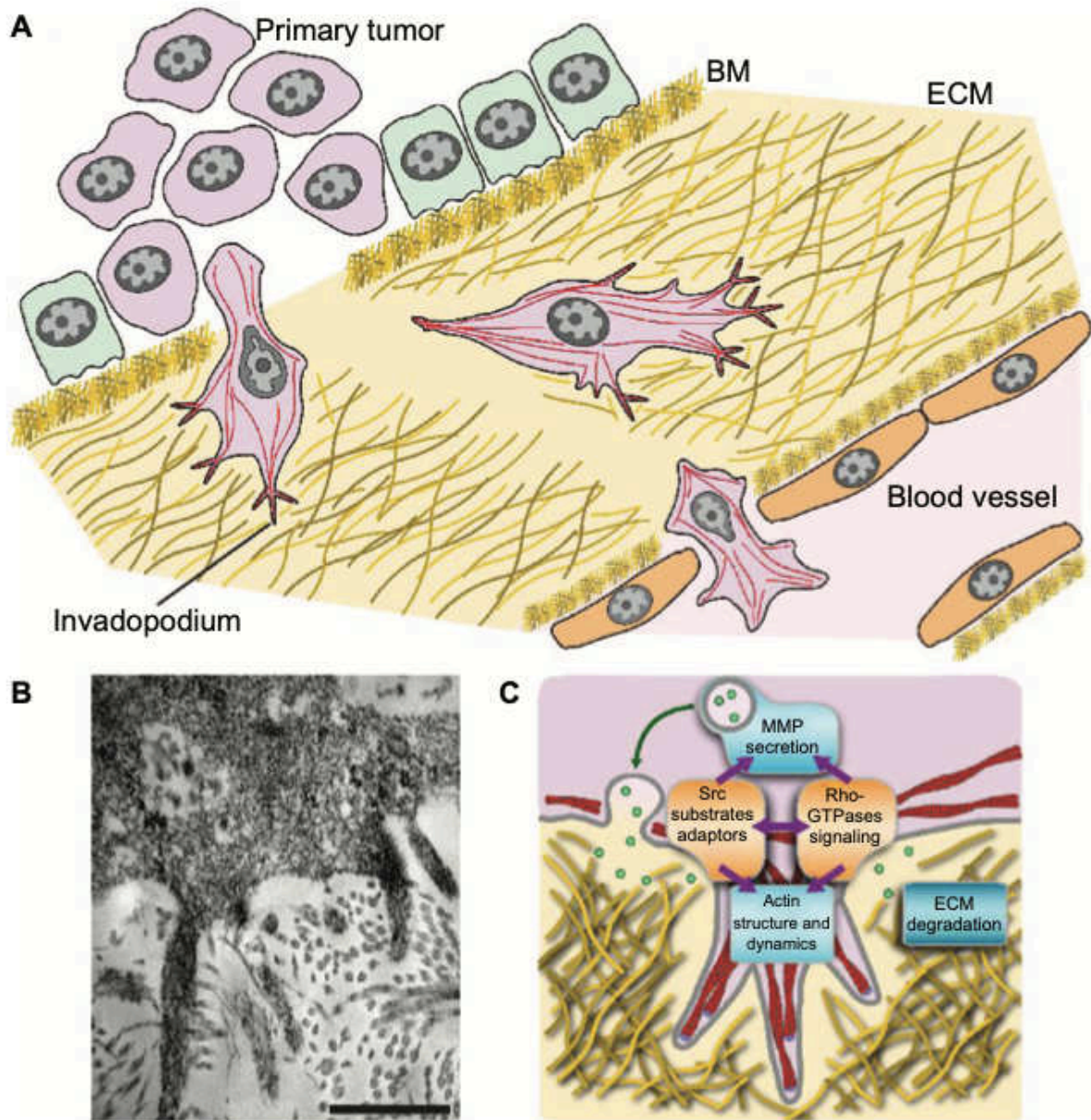


Figure 11 : Les invadopodes structures spécifiques de l'invasion

(A) Les invadopodes sont les structures cellulaires spécifiques qui permettent l'invasion de par leurs propriétés sécrétrices de MMPs qui sont nécessaires à la dégradation de la membrane basale et permet ainsi aux cellules de migrer dans la matrice extracellulaire. (B) Vue d'invadopodes en microscopie électronique. (C) représentation schématique d'une structure invadopodiale sécrétant des MMPs (Rösel et al, 2013).

L'intravasation est le processus qui permet aux cellules cancéreuses qui ont migré d'entrer dans la circulation systémique en traversant la paroi des vaisseaux. Le processus est le même que pour l'invasion, la cellule va pénétrer le vaisseau par une contraction du cytosquelette à la suite d'une perturbation des jonctions cellule-cellule qui compose ce vaisseau par la sécrétion de MMPs. On retrouve notamment certaines MMPs qui sont spécifiquement impliquées dans le processus d'intravasation cellulaire comme la MMP9 ou la MMP1. Cette intravasation est le plus souvent associée à une angiogenèse importante dans le cas du cancer,

avec une co-sécrétion de VEGF favorisant l'angiogenèse et de MMP pour l'intravasation. La production et la sécrétion de ces MMPs par les cellules cancéreuses est également associée à la signalisation calcique via l'activation de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) qui va induire une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et permettre la sécrétion de ces MMPs (Deryugina & Quigley, 2017). À la suite de l'entrée dans la circulation sanguine de ces cellules, on parle de cellule tumorale circulante (CTC). Ces cellules circulantes présentent alors des caractéristiques qui leur permettent de survivre dans un milieu en suspension. En effet théoriquement les cellules qui se retrouvent en suspension dans un milieu subissent ce que l'on appelle l'anoïkis (forme particulière d'apoptose) due à la perte d'interactions avec la matrice extracellulaire. Outre la résistance à la mort cellulaire, les CTC doivent également se protéger du système immunitaire notamment des Natural Killer présents. Il a été montré que ces CTC sont souvent présents en petit groupe (clusters) ce qui leur confère une plus grande résistance dans cet environnement (Lambert *et al*, 2017). Afin de pouvoir générer une tumeur secondaire dans un autre tissu, il est nécessaire au CTC de s'extraire de la circulation afin de coloniser un nouvel environnement. Ce processus d'extravasation, suit exactement le même processus que l'intravasation. En effet, la sécrétion de MMPs permet la désorganisation des jonctions cellule-cellule. Par l'initiation d'un mouvement de contraction cellulaire à la suite de l'ancrage de la cellule sur la matrice extracellulaire, la cellule peut s'extraire du vaisseau sanguin. La colonisation du nouvel environnement peut alors débuter, notamment par l'induction de la transition mésenchymato-épithéliale permettant la réexpression de protéines comme E-cadhérine impliquée dans les jonctions adhérentes cellule-cellule.

Nous retrouvons ici une régulation de certains processus essentiels au développement des métastases sous le contrôle de la signalisation calcique intracellulaire, et l'homéostasie ionique en général est montrée comme initiateur du développement des métastases (Djamgoz *et al*, 2014)

II. Le micro-environnement tumoral

Lors du développement de cancer, la masse tumorale en formation induit des modifications de l'environnement, façonnant ainsi son micro-environnement tumoral. Il est présent dans chaque type de cancer et participe à son développement grâce à une forte interaction avec les cellules tumorales et une communication importante entre les cellules stromale et cancéreuses (Truffi *et al*, 2020; Hinshaw & Shevde, 2019). Ce micro-environnement tumoral

est composé de deux parties, une partie cellulaire et une partie acellulaire que forme la matrice extracellulaire. Ce micro-environnement tumoral est souvent assez rigide, et dans les cas des tumeurs solides, présentent une rigidité plus importante que les tissus sains. Cette rigidité est souvent associée à un mauvais pronostic chez les patients (Lu *et al*, 2012; Schwartz, 2010) et associée aux caractéristiques du cancer. En effet, une augmentation de la rigidité autour de la tumeur favorise la prolifération des cellules cancéreuses en augmentant la phosphorylation de kinases telles que ERK, PI3K et Fak, conduisant par exemple à l'accélération du cycle cellulaire via la cycline D1 (Bae *et al*, 2014; Levental *et al*, 2009; Conklin *et al*, 2011; Paszek *et al*, 2005). La perte de sensibilité aux signaux inhibant la croissance cellulaire est également une conséquence de l'augmentation de la rigidité de la matrice (Collins *et al*, 1997). Par exemple, une augmentation du dépôt de fibronectine aura pour conséquence une prolifération accrue des cellules tumorales des sites métastatiques en inhibant les suppresseurs de tumeurs (Schrader *et al*, 2011; Erler *et al*, 2009). De plus, une augmentation de la rigidité induit également l'activation de signaux intracellulaires par la stimulation de protéines mécanosensibles à la surface cellulaire ; en conséquence, des voies de signalisation spécifiques sont activées comme celle de YAP (Yes associated protein). L'activation de cette protéine permet une insensibilité aux signaux suppresseur de croissance présent lors de l'inhibition de contact (Zhao *et al*, 2007; Dupont *et al*, 2011). De plus, cette rigidité est également montrée comme acteur dans l'invasion cellulaire, notamment par son rôle sur l'activité invadopodiale (Parekh *et al*, 2011; Menon & Beningo, 2011). Ce micro-environnement tumoral joue un rôle essentiel dans le développement tumoral et se trouve être en constante évolution et modification du fait de la communication entre les différentes composantes du micro-environnement. Ce micro-environnement hétérogène favorise le développement et la progression de la tumeur (Tang *et al*, 2013; Thomas & Radhakrishnan, 2020).

Les cellules du micro-environnement tumoral

La composition du micro-environnement tumoral varie d'un type tumoral à l'autre puisque les cellules qui représentent ce micro-environnement tumoral sont en partie des cellules endogènes aux tissus concernés par le développement de la tumeur. De plus ce micro-environnement est façonné par les cellules cancéreuses elle-même par les signaux envoyés notamment les sécrétions permettant la communication avec les autres types cellulaires.

Il existe tout de même des similitudes micro-environnemental dans les différents type de cancer, notamment par la présence de types cellulaires communs ce que l'on appelle les CAFs (cancer associated fibroblast). Ces CAFs sont souvent un des composants majeurs du micro-

environnement tumoral et joue un rôle important dans la communication avec les cellules cancéreuses. Communément, ces CAFs sont dérivés de fibroblaste, mais peuvent avoir des origines variables telles que, les cellules stellaires, les cellules endothéliales, les péricytes (Figure 12). Lors d'une blessure, les fibroblastes résidant normalement dans les tissus peuvent se différencier en des myofibroblastes afin de favoriser la cicatrisation en ayant des propriétés de contraction, de prolifération et de sécrétion de matrice extracellulaire. Ce processus de différenciation en myofibroblastes est réversible et se trouve être entre autres contrôlé par la signalisation du TGF β , qui est également sécrété en abondance dans le micro-environnement tumoral. Une accumulation de fibroblastes associés au cancer dans le micro-environnement tumoral conduit à une desmoplasie (l'environnement tissulaire devient plus dense et fibreux) qui est souvent associée à un mauvais pronostic dans de nombreux types de cancers (Bussard *et al*, 2016).

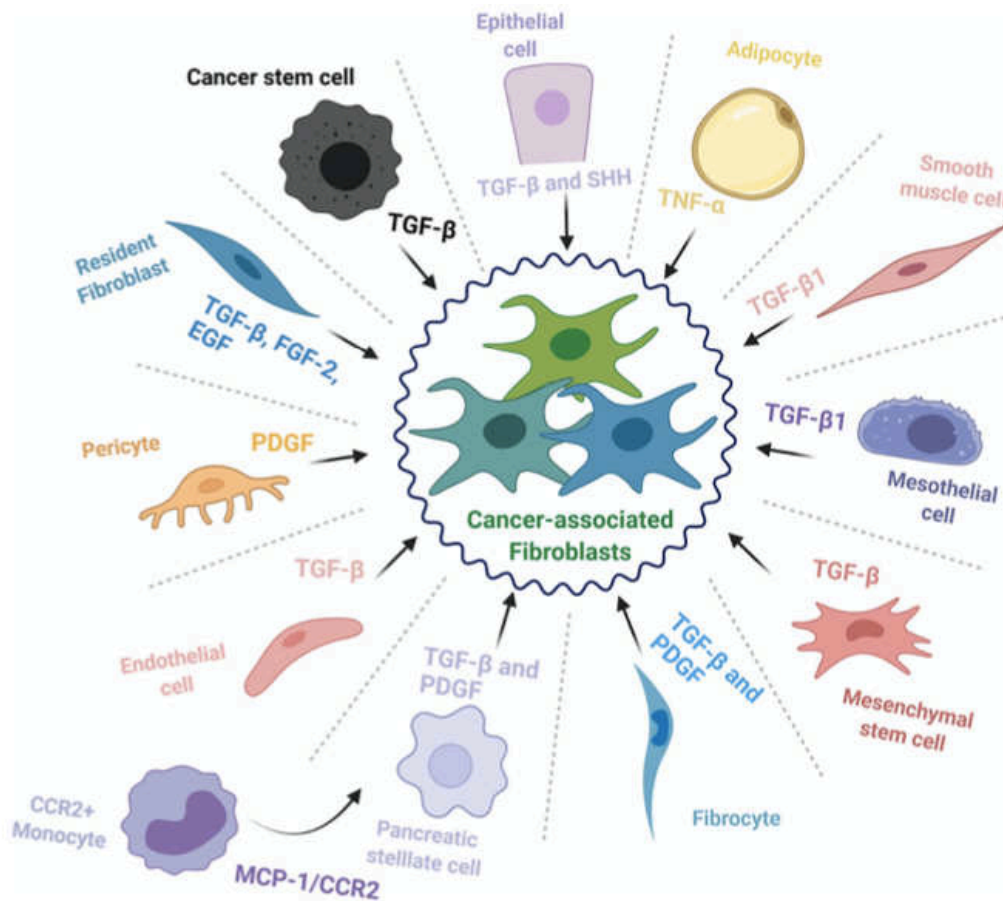


Figure 12 : les différentes origines de CAFs
Représentations des différentes sources de CAFs et les principaux facteurs de croissance et voie de signalisation responsable de l'évolution vers un phénotype de CAF (Manoukian *et al*, 2021)

Les cellules endothéliales qui participent à la formation des vaisseaux sanguins sont également communément retrouvées dans le micro-environnement tumoral. L'endothélium vasculaire est composé d'une fine monocouche de cellules endothéliales, qui sépare le sang circulant des tissus, ce qui permet de fournir les nutriments, et d'évacuer les déchets métaboliques cellulaires via la circulation systémique. Lors du développement de la masse tumorale, très rapidement apparaît un manque d'apport en nutriment et oxygène ainsi qu'un manque d'évacuation des déchets métaboliques. Cette situation induit une fonction de sécrétion par les cellules endothéliales de facteurs proangiogéniques tel que le VEGF, ayant pour but d'initier la néoangiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et favoriser la vascularisation tumorale. Cette sécrétion, de manière autocrine et paracrine, va alors stimuler la migration des cellules endothéliales afin de former des nouveaux vaisseaux sanguins. Au cours de la progression tumorale, les cellules endothéliales subissent ce qu'on appelle la « transition endothéliale-mésenchymateuse » pour devenir des CAF. Cette transition est organisée par le TGF β et la protéine morphogénétique osseuse (BMP), qui entraînent une perte des propriétés endothéliales, des jonctions cellule-cellule, et permet ainsi le détachement cellulaire (Sobierajska *et al*, 2020).

D'autres cellules sont communes aux différents micro-environnements tumoraux comme toutes les cellules immunitaires, que l'on retrouve infiltrées de façon plus ou moins importante. Il existe cependant des cellules qui sont spécifiques de certains organes comme les cellules stellaires que l'on ne retrouve que dans les tissus hépatiques et pancréatiques. Ce sont des cellules stromales quiescentes qui peuvent s'activer lors d'une lésion tissulaire ou d'une inflammation, et participent au développement du cancer. L'activation des CSP se caractérise notamment par une modification de l' α SMA avec l'apparition de fibres de stress, une augmentation de la prolifération et l'induction d'une forte sécrétion de matrice extracellulaire dans l'ACCP, ce qui est la principale cause de la desmoplasie observée. Au cours de l'ACCP, les CSPs activés constituent la principale source des CAFs qui participent à la formation du stroma desmoplasique. Plusieurs études font référence aux CSP activées en tant que CAFs dans la cancérogenèse pancréatique, en mettant en évidence plusieurs sous-types de CSP activées. La découverte de différentes sous-populations de CSP activées (myCAF, iCAF, apCAF, mesCAF) souligne leur hétérogénéité (Norton *et al*, 2020; Pereira *et al*, 2019; Vaish *et al*, 2021). Ces différentes sous-populations présentent des caractéristiques phénotypiques et génotypiques (Bhattacharjee *et al*, 2021; Affo *et al*, 2021; Hu *et al*, 2022). Öhlund *et al*. ont révélé dans des tissus cancéreux pancréatiques, l'existence de deux sous-populations différentes de CSP activées également associées à leur localisation dans la tumeur. Le sous-type, appelé myCAF, est en contact avec les cellules cancéreuses pancréatiques, et il est

caractérisé par une expression élevée d' α SMA avec une présence de fibres de stress et une surexpression de gènes tels que le collagène de type I, le CTGF et le TGF- β 1. Plus récemment, la protéine kinase N2 (PKN2), qui joue un rôle prépondérant lors de l'expansion du mésoderme embryonnaire, a été montrée associée à l'expansion des CAFs (Quétier *et al*, 2016). Ils montrent que PKN2 régule à la fois l'activation des CSP de souris et des fibroblastes embryonnaires de souris en myofibroblastes. PKN2 est également mis en avant en tant que régulateur du mécanocapteur YAP, qui est au cœur de la fonction des myofibroblastes. Curieusement, la perte de PKN2 dans les CSP entraîne un changement du mécanisme invasif cellulaire dans les cultures de sphéroïdes, supprimant l'invasion des CSPs tout en favorisant la croissance épithéliale polarisée. En outre, la suppression de PKN2 *in vivo* entraîne des tumeurs plus localement invasives, accompagnées de modifications pro-invasives. La suppression de PKN2 entraîne également une perte des caractéristiques des myofibroblastes, induisant un basculement vers un phénotype iCAF sécrétoire et entraînant des altérations protumorigènes importantes et une signature inflammatoire. *In vivo*, la suppression de PKN2 induit une formation de tumeur pancréatique plus invasive (Rhim *et al*, 2014; Özdemir *et al*, 2014). Cela concorde avec d'autres études qui proposent que les populations myCAF puissent freiner la croissance des tumeurs pancréatiques tandis que les iCAF provoquent des tumeurs inflammatoires agressives (Biffi *et al*, 2019). Les iCAF ont un phénotype inflammatoire défini par une expression accrue de cytokines et de chimiokines (telles que IL-6 et IL-11), mais également par une expression faible d' α SMA (Öhlund *et al*, 2017). Ce sous-type est situé plus à distance des cellules cancéreuses pancréatiques. Les iCAFs sont activés par la présence des cellules cancéreuses et la modification de l'environnement. Bernard *et al*. ont établi que les iCAF sont impliquées dans le développement et la progression de l'ACCP par la promotion d'un micro-environnement immunosuppresseur (Bernard *et al*, 2019). D'autres sous-types ont pu être identifiés, nommés sous type A, B, C et D (Neuzillet *et al*, 2019). Ces sous-types ont été corrélés à un plus ou moins bon pronostic de l'ACCP. Ainsi, nous retrouvons par associés à un bon pronostic le sous-type C, puis le sous-type B exprimant MYH11, qui présentent tout de même une forte production de protéines de matrice extracellulaire. En revanche, le sous-type A exprimant la periostine présente quant à lui une forte capacité proliférative, est associé à un mauvais pronostic (Neuzillet *et al*, 2019). Les CAFs existent dans des états interchangeables, c'est-à-dire qu'un type peut devenir un autre type (myCAF peut devenir iCAF et inversement). Ceci conduit à la théorie qu'ils peuvent être manipulés pour modifier les phénotypes tumoraux, avec une possibilité de modifier la réponse thérapeutique (Biffi *et al*, 2019). La reprogrammation du stroma (avec l'analogue de la vitamine A, l'ATRA, ou le calcipotriol, un agoniste des récepteurs de la vitamine D), s'est révélée prometteuse, les deux

approches favorisant un phénotype CSP quiescent, conduisant à une fibrose tumorale réduite et des réponses améliorées à la chimiothérapie (Carapuça *et al*, 2016; Froeling *et al*, 2011; Kocher *et al*, 2020; Sherman *et al*, 2014). En outre, il est important de noter que dans le cancer du pancréas, la voie du TGF- β dans ces cellules stellaires activées est très largement impliquée dans le processus de prolifération cellulaire et de sécrétions notamment de chimiokines et cytokines ainsi que de protéines de la matrice extracellulaire (Radoslavova *et al*, 2021).

La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est la composante acellulaire du micro-environnement tumoral et est notamment composée de collagènes, de fibronectines, d'élastines et de laminines (Figure 13). Les protéines qui participent à la formation de cette matrice sont des protéines qui confèrent une certaine rigidité de support pour la croissance cellulaire, et constituent également une barrière physique. Cette barrière est perméable aux molécules qui sont sécrétées par les différents types cellulaires, ce qui permet de garder une communication entre cellules notamment via certains facteurs de croissance sécrétés. La matrice extracellulaire n'est pas un élément figé dans un état, elle évolue avec le cancer en lui-même et est remodelée en permanence par la sécrétion de protéines qui la compose modifiant ainsi les concentrations de chacune de ces protéines (Henke *et al*, 2020; Bandzerewicz & Gadomska-Gajadhur, 2022).

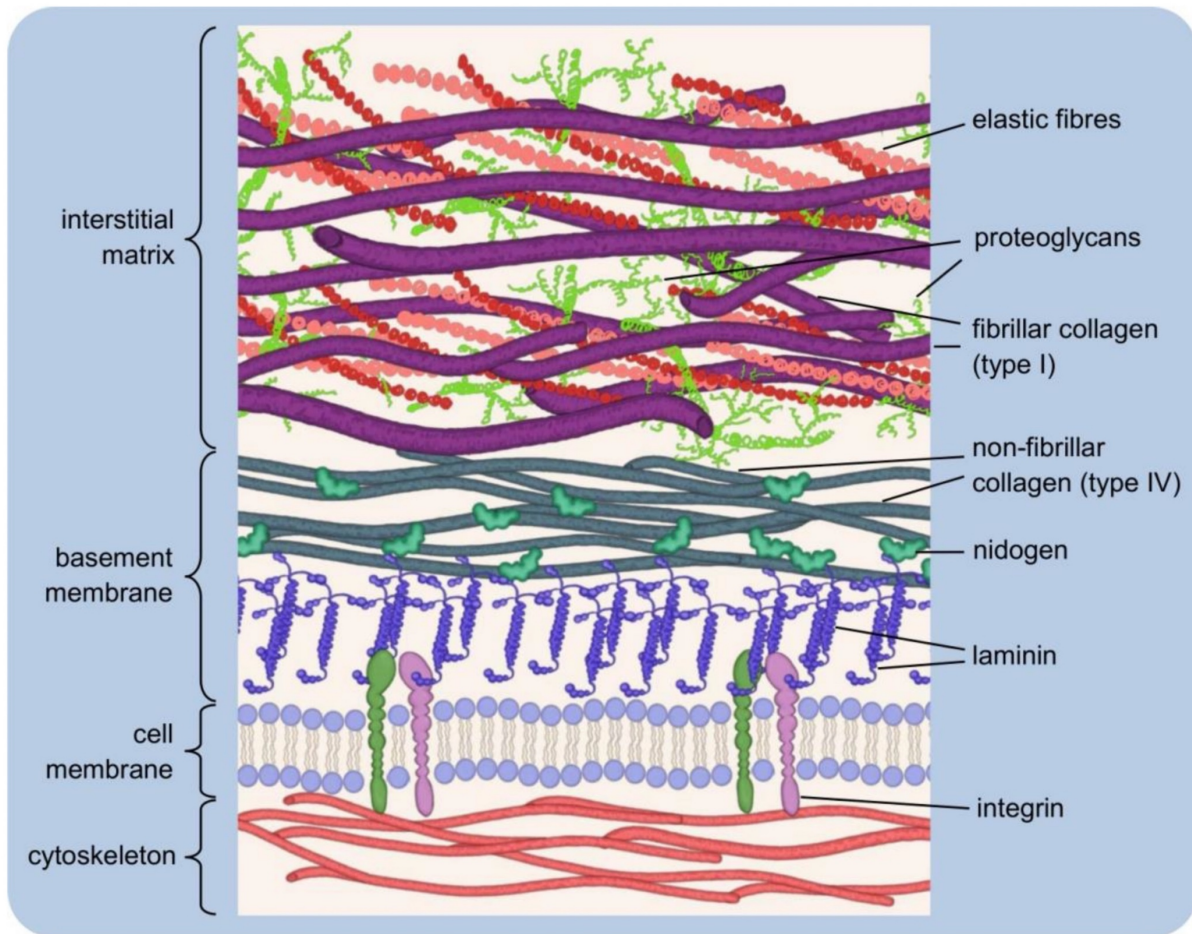


Figure 13 : représentation schématique des structures protéiques impliquées dans le maintien cellulaire. Le cytosquelette est intracellulaire (confère une structure à la cellule) et est relié aux intégrines qui participent à l'ancrage dans la membrane basale. La matrice extracellulaire est la couche la plus externe (Bandzerewicz & Gadomska-Gajadhur, 2022)

La matrice extracellulaire joue un rôle dans l'organisation tissulaire en permettant une liaison cellulaire, et est composée majoritairement de protéoglycans et de protéines fibrillaires (Mecham, 2001; Hay, 1991). Les protéoglycans vont former un gel hydrophile et principalement avoir une fonction dans l'hydratation des tissus ; ils vont également permettre de moduler les voies de signalisations en conférant une certaine plasticité à l'égard des forces de tension (Yanagishita, 1993; Esko *et al*, 2009). Les protéoglycans sont composés d'une protéine principale qui est associée à des glycosaminoglycans (disaccharide formant une chaîne linéaire). Les principaux glycosaminoglycans retrouvés sont le hyaluronane, dermatanes sulfates, et les héparanes sulfates (Singh *et al*, 2010; Simon Davis & Parish, 2013; Cui *et al*, 2013). Ces héparanes sulfates, du fait de leurs charges négatives importantes, peuvent se lier facilement à d'autres protéines telles que les facteurs de croissance, la laminine, fibronectines, ainsi que des récepteurs de surfaces cellulaires, ce qui favorise la communication cellulaire (Bishop *et al*, 2007; Aviezer *et al*, 1994).

Le collagène quant à lui, est la protéine fibrillaire la plus abondamment retrouvée dans la composition de cette matrice extracellulaire. Il existe de nombreux types de collagènes humains (28 types) qui sont parfois codés par plusieurs gènes comme le cas du collagène IV qui est codé sur 6 gènes (COL4A1- A6). Ces collagènes ont des propriétés différentes et sont plus ou moins exprimés de façon spécifique à un organe ou un tissu, cependant, la majorité du collagène exprimé est le type I qui représente près de 90% du collagène total. Ce collagène apporte des propriétés physiques importantes notamment dans la résistance aux forces de tension, participe dans l'adhésion cellulaire et également dans le processus migratoire (Rozario & DeSimone, 2010). Cette protéine est généralement sécrétée par les fibroblastes, et est constituée d'homotrimère ou d'hétéotrimère de chaîne polypeptidique en triples hélices (Brodsky & Persikov, 2005). L'enzyme lysyl-oxydase permet de créer une réticulation des fibres de collagènes afin de stabiliser la structure tridimensionnelle (Fratzl *et al*, 1998; Hulmes, 2002; Ricard-Blum & Ruggiero, 2005). C'est finalement cette structure tridimensionnelle du collagène qui va donner des propriétés plastiques face aux forces de tensions et les propriétés élastiques sont données par l'association du collagène avec l'élastine (Wise and Weiss, 2009) (Figure 14).

L'association des protéoglycanes avec les fibres de collagène confère déjà une structure importante qui est également renforcée par la présence d'autres protéines telles que la fibronectine. Cette glycoprotéine est assemblée en fibres qui sont composées d'association de motifs répétés, qui permettent l'interaction des protéines de fibronectine entre elles, mais également l'interaction avec le collagène (Singh *et al*, 2010; Schwarzbauer & DeSimone, 2011). La fibronectine s'associe en dimères qui peuvent alors interagir avec les intégrines, ce qui conduit à leur activation et leur permet d'avoir une action sur la contractilité cellulaire, indispensable dans le processus de migration. De plus, on retrouve également une forte présence d'acide hyaluronique, qui a lui aussi été associé à la progression tumorale pancréatique (Fries *et al*, 1994; Toole, 2009; Cheng *et al*, 2016). Dans l'ACCP, le niveau d'acide hyaluronique qui est détecté est plus élevé dans la masse tumorale par rapport au tissu sain (Mahlbacher *et al*, 1992). Chez les patients atteints de l'ACCP, la survie globale médiane était de 9,3 mois chez ceux présentant une forte expression d'acide hyaluronique dans le stroma, contre 24,3 mois chez les patients présentant une faible quantité d'acide hyaluronique (Whatcott *et al*, 2015). Cet acide hyaluronique présente des propriétés hydrophiles importantes, ce qui confère notamment un aspect gel de la matrice extracellulaire (Hunger *et al*, 2012).

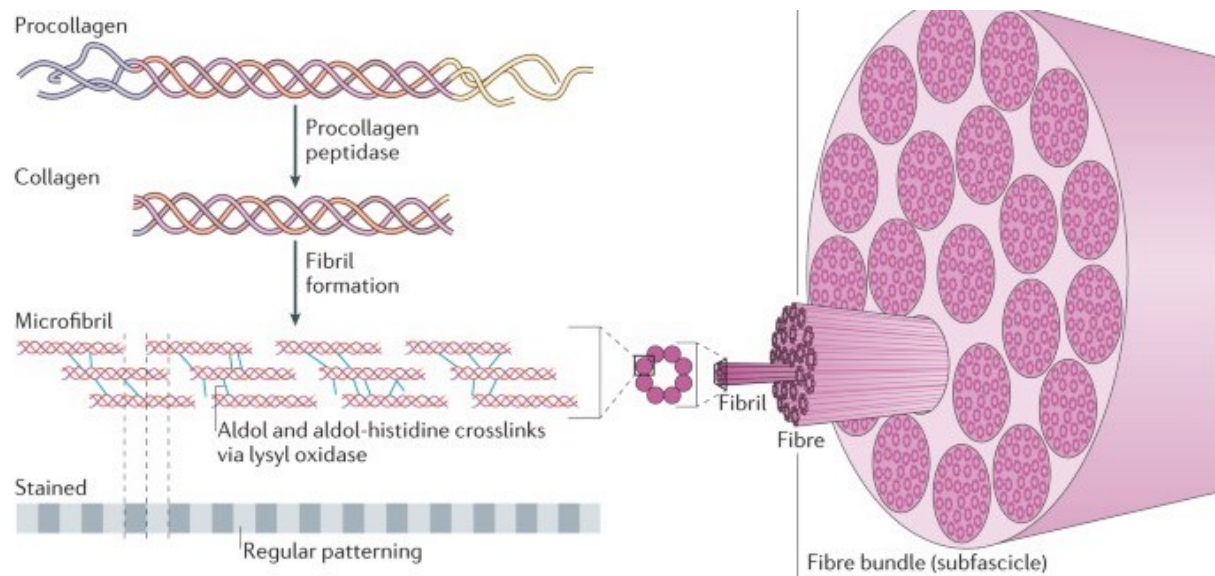


Figure 14 : structure du collagène

Le collagène est composé de procollagène qui par association, vont donner des microfibrilles qui s'associent en hexamères pour donner la fibrille dont l'association donne la fibre. (Adapté de (Mouw et al, 2014))

Cette matrice extracellulaire est également une source importante de facteur de croissance. En effet, de nombreux facteurs de croissance sécrétés peuvent être stockés dans cette matrice qui est hydrophile, ce qui permet la modulation des réponses cellulaires. Nous retrouvons notamment la présence d'une forme latente du TGF- β dans la matrice extracellulaire (Ewan et al, 2002; Dabovic et al, 2011).

Dans le cancer du pancréas, l'expression de TGF- β augmente ce qui est associée à une augmentation de l'invasion cellulaires des stades tumoraux avancés, et en conséquence, une durée de survie plus courte des patients (Park et al, 2020) et de la formation de métastases hépatiques (Teraoka et al, 2001; Culhaci et al, 2005; Wagner et al, 1999; Truty & Urrutia, 2007). Des études ont montré que la signalisation du TGF- β est régulièrement génétiquement inactivée dans le cancer du pancréas et que l'inactivation de la signalisation du TGF- β peut être un événement critique dans la progression du cancer du pancréas. Dans cette pathologie, il a pu être détecté une perte de fonction ou des mutations des gènes TGF β RI, TGF β RII, et Smad4 (Riggins et al, 1997; Schutte et al, 1996; Subramanian et al, 2004; Wagner et al, 1998). Les mutations du TGF β RII sont impliquées dans 4 à 7 % des cancers du pancréas (Lin & Feng, 2005), tandis que les mutations du TGF β RI sont retrouvées dans 2 % d'entre eux (Hansel et al, 2003; Hahn et al, 1996). De plus, on observe que 60 % des cancers du pancréas ont perdu le chromosome 18q21 qui porte le gène Smad4 (Hahn et al, 1996). Il a été établi que SMAD4 peut être soit supprimé de manière homozygote, soit inactivé par une perte allélique dans

l'ACCP (Cicenas *et al*, 2017). Smad4 agit comme un médiateur central dans la signalisation du TGF- β et son inactivation est relativement spécifique du cancer du pancréas.

La fonction de signalisation du TGF- β dans le cancer du pancréas semble complexe et il est clairement évident que le TGF- β agit à la fois dans des activités anti- et protumorigènes. Le TGF- β exerce des effets suppresseurs de tumeurs en inhibant la prolifération des cellules épithéliales et l'inflammation pro-tumorale au stade précoce de la carcinogenèse, tandis qu'au stade avancé, le TGF- β acquiert des rôles pro-oncogéniques et prométastatiques, qui sont associés à une augmentation du niveau de TGF- β sécrété localement (Padua & Massagué, 2009; Massagué, 2008).

Le TGF- β présente un effet inhibiteur de croissance au stade précoce du cancer du pancréas en favorisant l'apoptose et en inhibant la progression du cycle cellulaire par l'arrêt en phase G1 (Hanahan & Weinberg, 2011). Dans les cellules épithéliales non néoplasiques et dans les premiers stades de l'ACCP, c'est le TGF- β 1 qui agit comme un suppresseur de croissance tumorale via l'inhibition de la prolifération cellulaire. Hezel *et al.* ont découvert que le TGF- β agit dans une voie de suppression tumorale, dont l'inactivation pharmacologique favorise la progression du cancer du pancréas (Hezel *et al*, 2012). Le TGF- β inhibe la croissance du cancer du pancréas en diminuant le VEGF et en augmentant la thrombospondine-1, et les perturbations de la voie de signalisation du TGF- β au cours de la progression tumorale diminuent cette inhibition (Schwartz-Waldhoff *et al*, 2000). De plus, lors de cette progression de l'ACCP, il devient un promoteur de croissance tumorale en stimulant les propriétés oncogéniques des cellules cancéreuses pancréatiques, notamment la prolifération cellulaire et en induisant la TEM (Ellenrieder *et al*, 2001). Le TGF- β est l'un des inducteurs les plus connus de facteurs de transcription induisant la TEM tels que Snail, Slug, Twist ou Zeb1 (Hanahan & Weinberg, 2011). Le TGF- β peut favoriser « l'activation » du stroma en favorisant le dépôt de la matrice extracellulaire (Kruse *et al*, 2000; Apte *et al*, 1999) et induire l'angiogenèse (Kano *et al*, 2007; Hinz *et al*, 2007), et *in vitro* favorise la TEM et l'invasion des lignées cellulaires (Nolan-Stevaux *et al*, 2009; Horiguchi *et al*, 2009). Les cellules cancéreuses pancréatiques, sécrètent elles aussi du TGF- β , ce qui a pour conséquence d'augmenter la progression tumorale associée à un pronostic plus sombre pour les patients (Friess *et al*, 1993; Javle *et al*, 2014). De plus, la surexpression de TGF- β induite par les cellules cancéreuses pancréatiques, stimule la production d'autres signaux de croissance mitogènes, y compris le PDGF et le FGF (Masamune *et al*, 2003), conduisant à une promotion supplémentaire de la tumorigenèse (Glazer *et al*, 2017; Gupta & Maitra, 2016).

Dans l'ACCP la signalisation STAT3 est impliquée dans la progression tumorale en augmentant la fibrose. En effet, l'inhibition de l'activité de STAT3 entraîne la perte de la signalisation TGF- β , et atténue la progression l'ACCP (Laklai et al, 2016). Le double jeu du TGF- β 1 varie en fonction du micro-environnement tumoral, de la communication cellules stellaires – cellules cancéreuses, et du comportement des cellules cancéreuses pancréatiques. Les modifications de signalisation du TGF- β 1 observées dans les cellules cancéreuses pourraient être due à l'augmentation de la rigidité de la matrice induisant un remodelage de la signalisation et de la communication cellulaire. En effet, puisque cette matrice extracellulaire est de plus en plus sécrétée, ce qui exacerbe la réaction desmoplasique avec la progression de l'ACCP, cela pourrait alors favoriser la sécrétion de TGF- β 1 afin de s'autostimuler allant jusqu'à la promotion de la tumorale dans les stades plus tardif de l'ACCP.

La communication importante de tous les acteurs qui composent ce micro-environnement tumoral avec les cellules cancéreuses favorise le développement tumoral (Figure 15). En effet, la composante cellulaire remodèle cette matrice extracellulaire lors du processus de cancérogenèse. Au cours de la progression tumorale, le métabolisme du collagène est dérégulé, ce qui se manifeste par une expression et un dépôt accru de collagène accompagnés d'une activité MMPs élevée (Levental *et al*, 2009). Nous retrouvons alors une sécrétion d'autant plus importante de collagène de type I, III et IV, ainsi que de l'acide hyaluronique, fibronectine et laminine (Provenzano *et al*, 2006; Zhu *et al*, 1995; Gopal *et al*, 2017; Fullár *et al*, 2015; Koltai *et al*, 2021). De plus, cette matrice présente une rigidité du fait de sa composition, et de son organisation, ce qui induit un support plus ferme pour les cellules.

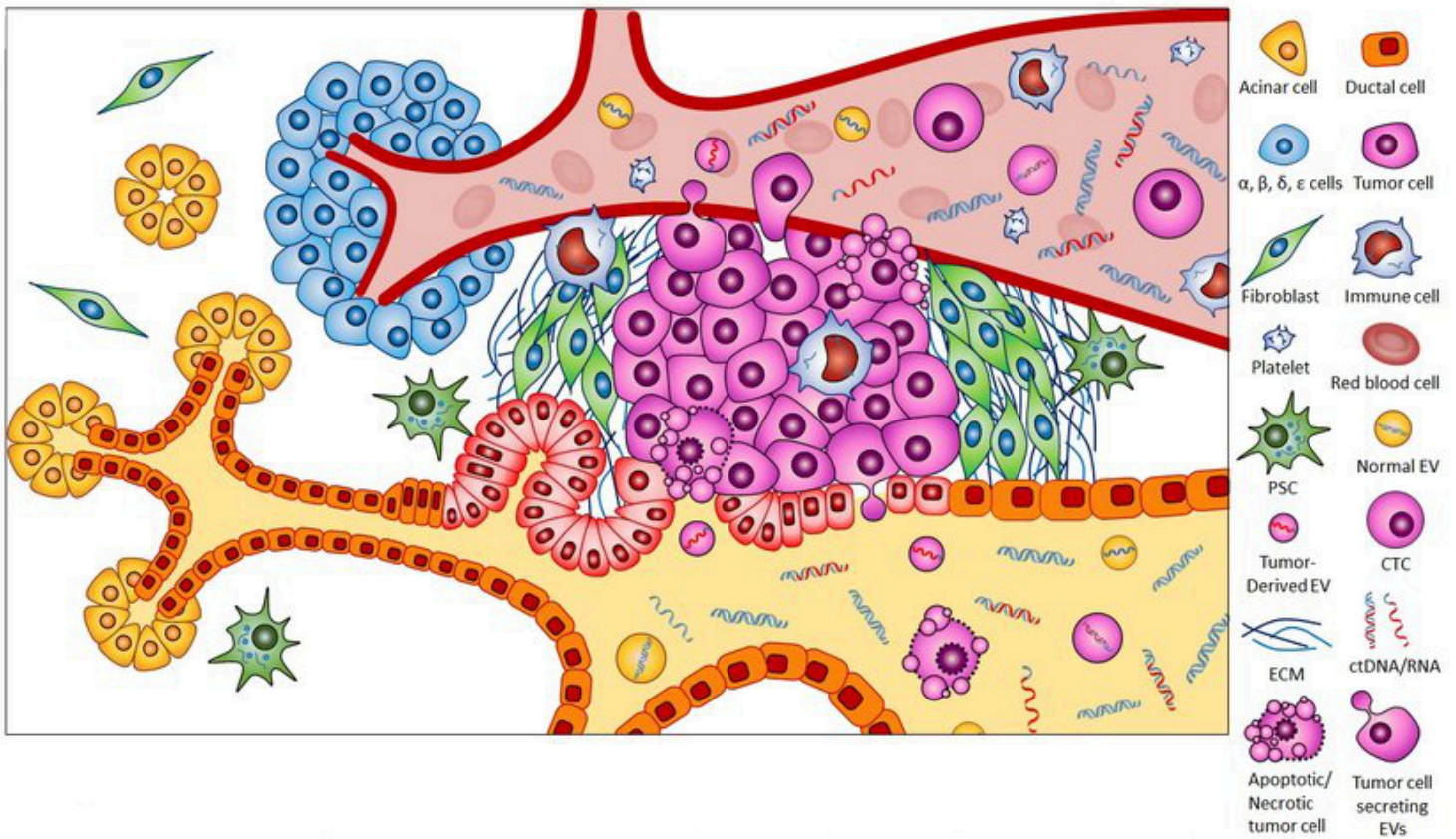


Figure 15 : Représentation schématique du développement de l'ACCP
 Représentation des lésions à l'origine de l'ACCP invasif jusqu'à son intravasation, il est entouré de cellules de types CAFs avec une matrice extracellulaire importante. (Adapté de (Samandari et al, 2018))

La rigidité de la matrice

La rigidité d'un support représente la force nécessaire exercée par les cellules pour se fixer sur celui-ci, contrairement à la pression qui représente la force appliquée par un stimulus externe sur une cellule ou un ensemble de cellules. Dans l'ACCP la pression tumorale est plus largement étudiée (Fels et al, 2016; Radoslavova et al, 2022) que la rigidité en elle-même. Souvent confondu, ces deux forces sont différentes puisque la pression est une force appliquée sur la cellule et la cellule répond à cette pression. Alors que dans le cas de la rigidité c'est la cellule qui exerce une force sur la matrice afin de modifier celle-ci pour pouvoir s'y attacher. Les expérimentations menées par la suite seront basées sur des modifications de la rigidité de la matrice sans induire de modifications de pression lors des cultures cellulaires. La rigidité de la matrice extracellulaire fournit une contrainte d'adhérence et crée une force

mécanique pour la croissance tumorale. L'altération de cette rigidité au cours du développement tumoral, affecte différentes fonctions cellulaires notamment la morphologie cellulaire, prolifération, apoptose, migration et invasion, état de différenciation et survie (Shukla *et al*, 2016). Les cellules tumorales et celles du micro-environnement remodelent continuellement la matrice extracellulaire par synthèse, dégradation, réassemblage et modification chimique au cours de la progression tumorale, ce qui crée une variation de la rigidité dans le temps (Lu *et al*, 2011). Pathologiquement, plus la rigidité va augmenter, plus cela va favoriser la sécrétion de molécules constituant la matrice extracellulaire par les CAFs, ce qui renforce encore la rigidité (Piersma *et al*, 2020; Raimondi *et al*, 2010). Certaines tumeurs solides, telles que le cancer du sein et le cancer du foie, présentent une rigidité de la matrice extracellulaire souvent accompagnée d'un alignement typique des fibres de collagène au cours de la tumorigenèse (Najafi *et al*, 2019). Dans ce cas, l'alignement des fibres de collagène favorise le caractère invasif par l'augmentation de la prolifération cellulaire, de la motilité cellulaire et de l'invasion (Azadi *et al*, 2019; Wei *et al*, 2017; Fattet *et al*, 2020). La rigidité de la matrice, est étudiée par l'utilisation de module élastique (nommé module de Young). En effet, la matrice extracellulaire présente une rigidité qui peut être mesurée en kPa, mais présente en réalité une certaine élasticité notamment due à la présence d'acide hyaluronique et de fibres d'élastines qui confèrent un aspect de gel. Les CAF, en tant que source principale de la matrice extracellulaire, modifient le micro-environnement tumoral en exprimant la lysyl oxydase (LOX) qui initie la réticulation du collagène ce qui participe à la densification de la matrice et donc à l'augmentation de la rigidité (Gkretsi & Stylianopoulos, 2018).

Les cellules détectent des stimuli mécaniques (y compris la rigidité) et répondent en modifiant leur structure cytosquelettique, ce qui module la motilité et l'invasion cellulaire (Benton *et al*, 2014; Peng *et al*, 2019). Dans des cultures sur différentes rigidités de matrice (10, 38 et 57 kPa), les cellules cancéreuses du sein ont montré une capacité de migration accrue avec l'augmentation de la rigidité en activant directement l'intégrine $\beta 1$ et FAK (Peng *et al*, 2019). Dans le cancer du sein agressif, est souvent retrouvée une zone péri-tumorale anormalement dure, qui résulte d'une réaction desmoplastique et d'une infiltration de cellules tumorales dans le stroma péri-tumoral (Zhou *et al*, 2014; Evans *et al*, 2012). Par rapport aux masses mammaires bénignes, la tumeur maligne a une bordure plus rigide. De plus, les cancers du sein avec des bordures très rigides sont plus invasifs, indiquant que la rigidité présente en bordure tumorale favorise la croissance tumorale et l'infiltration (Park *et al*, 2018).

Un autre exemple pour démontrer le rôle de la rigidité dans le développement des cancers, est celui du foie. La cirrhose du foie est un facteur de risque significatif connu pour le développement du cancer du foie. Une étude montre lors de l'utilisation de matrices de rigidités de 1 kPa, 6 kPa et 12 kPa pour représenter respectivement les tissus normaux, fibrosés et cirrhotiques du foie, que la prolifération cellulaire est fortement augmentée sur des rigidités de matrice augmentées (Schrader *et al*, 2011). Dans cette étude, la prolifération est jusqu'à 12 fois supérieure dans la condition 12kPa, comparé à la condition 1kPa. De plus, une autre étude a montré que la rigidité de la matrice augmente l'activité d'AKT via l'oncogène ZNF217 et active la voie de signalisation PI3K / Rac, et la voie ERK pour favoriser la prolifération et l'invasion cellulaires (Northey *et al*, 2020; Chaudhuri *et al*, 2014). Une étude récente a montré que le récepteur CXCR4 est une protéine clé dans la voie de la signalisation induite par la rigidité de la matrice, et contrôle la croissance des cellules du carcinome hépatique via la voie de signalisation YAP (Yang *et al*, 2020). De même, lorsque les cellules SKOV-3 (cancer de l'ovaire) sont cultivées sur différents substrats de 0,5, 4 et 25 kPa pendant 72h, le temps de doublement cellulaire est respectivement de 56h, 42h et 31h. Nous retrouvons également une expression accrue de YAP dans les noyaux des cellules SKOV-3 cultivées sur les matrices plus rigides. Ceci suggère que la voie de signalisation associée à YAP est activée par des matrices rigides et favorise la prolifération cellulaire (Fan *et al*, 2021). L'activation de la signalisation YAP/TAZ conduit à une accumulation nucléaire YAP/TAZ plutôt que cytoplasmique dans les cellules. Cela stimule alors la prolifération des cellules tumorales en modulant l'activité de facteurs du cycle cellulaire, et ainsi la duplication de l'ADN et la mitose (Zanconato *et al*, 2019; Dupont *et al*, 2011). Il est intéressant de noter que l'effet de la rigidité de la matrice sur la prolifération cellulaire peut être persistant et continuer à influencer les comportements des cellules tumorales après qu'elles se soient métastasées vers d'autres sites (Watson *et al*, 2021).

Outre le rôle de la rigidité sur la migration, invasion et prolifération cellulaire, celle-ci induit également des modifications morphologiques. Un substrat plus rigide fournit un support physique pour la croissance cellulaire et augmente l'adhésion cellulaire et la construction du cytosquelette (Sun *et al*, 2018). En effet, lorsque les cellules progénitrices rénales sont cultivées sur des hydrogels d'une rigidité allant de 0,2 kPa à 50 kPa, celles-ci sont plus étalées sur les substrats plus rigides et ont tendance à se multiplier plus rapidement (Melica *et al*, 2019). De la même façon, sur un substrat de 1 kPa, les cellules cancéreuses du col de l'utérus étaient sphériques avec peu de pseudopodes, alors que les cellules cultivées sur un substrat de 20 kPa étaient riches en pseudopodes et beaucoup plus allongées (Piao *et al*, 2017). Les

cellules de carcinome hépatocellulaire ont montré une réponse morphologique similaire à différents changements de rigidité, puisque sur un substrat de 1 kPa, elles étaient petites et arrondies contrairement aux cellules bien étalées et aplaties observées sur un substrat de 12 kPa (Schrader *et al*, 2011). En revanche, dans les lignées cellulaires du cancer de la prostate, la surface des cellules DU-145 et PC-3 s'est montrée plus importante sur un substrat de 0,75 MPa par rapport à un substrat de 2,92MPa (Prazzner-Bechcicki *et al*, 2015).

La rigidité de la matrice extracellulaire est constamment modifiée par un processus complexe en interaction avec les cellules qui compose l'environnement, accompagné de divers mécanismes de rétroaction qui sont bénéfiques pour le développement tumoral, mais qui ne sont pas entièrement compris à l'heure actuelle.

Les composantes cellulaires et acellulaires de ce micro-environnement tumoral favorisent la survie des cellules cancéreuses, leur prolifération, et également le développement des métastases notamment en favorisant une réorganisation des fibres de collagènes (Conklin *et al*, 2011; Provenzano *et al*, 2006; Gopal *et al*, 2017; Malik *et al*, 2015). Dans ce processus, une des cytokines importantes impliquées est le TGF- β , principalement utilisé pour réguler l'activité des fibroblastes et la réticulation du collagène dans la matrice extracellulaire (Gkretsi & Stylianopoulos, 2018). La régulation positive du TGF- β est considérée comme responsable du développement de la desmoplasie dans les tumeurs (Gkretsi & Stylianopoulos, 2018; Levental *et al*, 2009; Denis *et al*, 2016). Au cours de l'interaction entre le micro-environnement tumoral et les cellules tumorales, les intégrines transduisent les signaux mécaniques de la matrice extracellulaire en assemblant des complexes de plaques d'adhésion et régulent les comportements des cellules tumorales en induisant un remodelage du cytosquelette (Levental *et al*, 2009). L'activation de la voie de transduction du signal de la kinase FAK a entraîné une augmentation de la rigidité de la matrice et l'invasion des cellules de gliomes (Chen *et al*, 2018b). Par ailleurs, certains canaux ioniques mécanosensibles peuvent contribuer à la formation de la rigidité matricielle par mécanotransduction en plus de leurs implications dans les phénotypes fondamentaux des cellules cancéreuses (la migration, la prolifération, résistance à l'apoptose, induction de l'angiogenèse et invasion) (Leanza *et al*, 2013; Munaron, 2015; Prevarskaya *et al*, 2018a). Il a été montré, que Piezo1 (un canal mécanosensible), à la suite d'une pression localisée au niveau des sites d'adhésions focales, régulait la matrice extracellulaire et renforçait la rigidification des tissus en activant la signalisation intégrine-FAK. Un micro-environnement plus rigide permet également d'augmenter son expression et favorise l'agressivité du gliome (Yu & Liao, 2021).

La rigidité accrue de la matrice semble être le résultat direct de l'activation des CAFs par l'augmentation du dépôt et de la réticulation des protéines de la matrice extracellulaire (principalement le collagène). Ceci semble être un signal d'activation qui participe au processus de tumorigenèse dans différents types de tumeurs. En effet, la dérégulation des CAFs et le dépôt anormal de matrice extracellulaire du tissu tumoral entraînent une augmentation de la rigidité ce qui est corrélé à la tumorigenèse, la progression tumorale et le développement de métastases (Deng *et al*, 2022) (Figure 16).

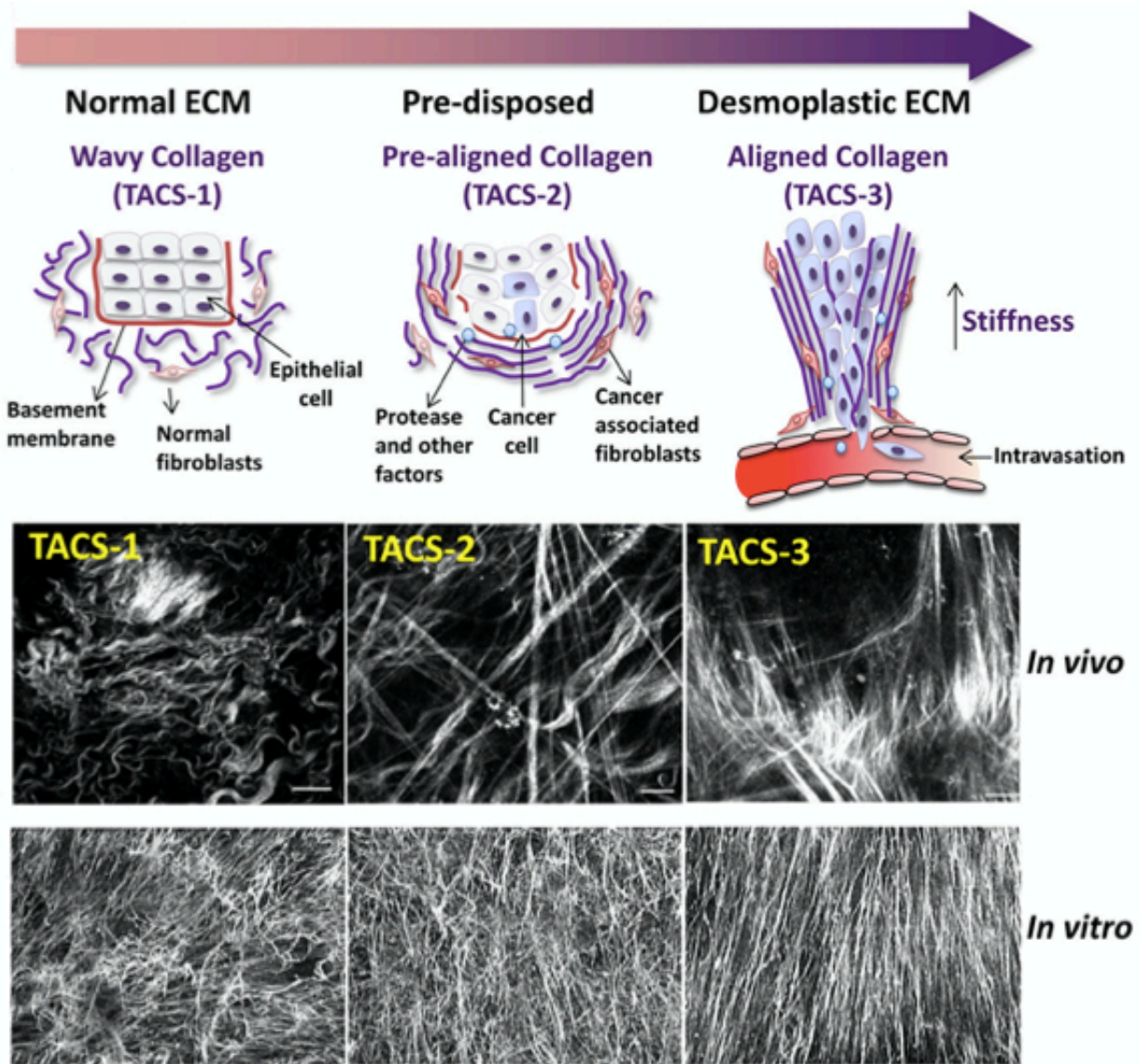


Figure 16 : évolution de la matrice extracellulaire TACS (Tumor associated Collagen Signature). Réalignement des fibres de collagènes au cours du processus de tumorigenèse. Les images *in vivo* ont été obtenues par microscopie laser multiphotonique sur un modèle de cancer du sein chez des souris, la partie *in vitro* a été obtenue par reconstruction d'image confocale de culture de fibroblaste (Adapté de (Malik *et al*, 2015))

III. L'homéostasie ionique

L'homéostasie calcique

Le calcium est le plus commun des seconds messagers intracellulaires qui est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. Dans les cellules saines, le calcium joue un rôle important lors de la fécondation (Ardestani *et al*, 2020), la sécrétion (Trampert & Nathanson, 2018; Taylor *et al*, 2020; Klec *et al*, 2019), l'expression de certains gènes et leur transcription (Roderick & Cook, 2008), la prolifération (Munaron *et al*, 2004), la migration (Rash *et al*, 2016), le métabolisme cellulaire, la survie ou encore l'apoptose (Bootman *et al*, 2012) (Figure 17).

Tous les événements de signalisation calcique ont lieu dans le cytosol, qui doit maintenir un niveau basal de concentration en calcium extrêmement bas (100nM) par rapport à une concentration extracellulaire beaucoup plus élevée (1-2mM). C'est uniquement dans ces conditions que de petites variations de calcium cytosolique en combinaison avec l'activité de senseur de calcium (kinases, protéases, phosphatases, facteurs de transcription, protéines de liaison au calcium) peuvent induire une signalisation spécifique. L'influx de calcium ainsi que la libération de calcium sont fortement contrôlés par les cellules dans l'espace, le temps et l'amplitude (Konieczny *et al*, 2012; Monteith *et al*, 2017), afin de créer des caractéristiques spatiales et temporelles uniques pour chaque processus qu'elles régulent. De plus, ce contrôle strict du Ca²⁺ est également régulé par la présence dans les cellules de compartiments spécifiques, tels que le réticulum endoplasmique (RE) qui peut contenir des concentrations de 300µM-1mM de calcium, ou également les lysosomes et les mitochondries.

La circulation de calcium entre les différents compartiments de stockage et le cytosol détermine l'homéostasie cellulaire du calcium avec l'espace extracellulaire. Cette homéostasie est régulée par un certain nombre de systèmes - canaux, pompes et transporteurs, localisés sur les membranes des organelles intracellulaires ou la membrane plasmique. Coordinée dans l'espace et dans le temps, l'activation de ces composants permet la création d'un signal calcique cytosolique avec un schéma spatio-temporel prenant souvent des formes complexes d'oscillations calciques, d'ondes, de pics (Dolmetsch *et al*, 1998; Berridge *et al*, 2000). Selon le type d'oscillation, courtes (secondes) ou très longues (heures), différentes voies de signalisation seront activées. La dérégulation de ce contrôle strict du calcium entraîne la perturbation de l'homéostasie normale du calcium et de la signalisation calcique induite. Ceci conduit à un certain nombre d'états pathologiques, y compris la plupart des caractéristiques du cancer (Bezprozvanny, 2010; Brini *et al*, 2013; Iamshanova *et al*, 2017; Prevarskaya *et al*, 2018b).

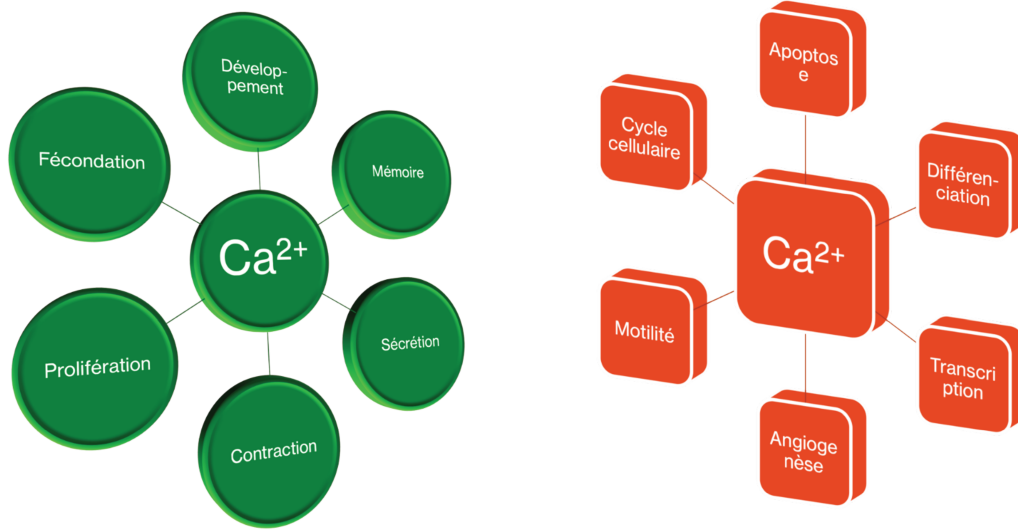


Figure 17 : double rôle du calcium en physiologie et pathologie

La représentation schématique en vert montre différents rôles du calcium dans la physiologie, et en rouge l'implication du calcium en pathologie lors d'une dérégulation de l'homéostasie calcique.

Dans le cancer, nous retrouvons une dérégulation des voies de signalisation du calcium, qui est notamment associée à une augmentation de la survie cellulaire, de la migration, de l'angiogenèse, de l'invasion, ou de la résistance aux traitements. Dans cette pathologie, il a été montré la dérégulation (surexpression ou sous-expression) de nombreux canaux perméables au calcium soit sur la membrane plasmique (PM), soit sur la membrane des compartiments intracellulaires (Réticulum endoplasmique, Mitochondrie, etc.). Cette expression aberrante induit une modulation anormale des oscillations calciques ainsi que leurs fréquences, qui sont responsables de l'activation de voies de signalisation, conduisant à l'augmentation de la progression du cycle cellulaire, ou la résistance à l'apoptose (Parkash & Asotra, 2010). La transformation maligne d'une cellule est généralement associée à un réarrangement majeur de la signalisation du Ca^{2+} , conduisant à une augmentation de la prolifération, migration (Prevarskaya et al., 2011) et invasion (Iamshanova et al., 2017), à la résistance à l'apoptose et par conséquent, à la progression du cancer.

On parle souvent de dérégulation, mais comme dans les cellules saines les processus associés sont en réalité finement régulés, il s'agit plus exactement d'une reprogrammation du signal calcique en faveur des processus associés au développement du cancer. Par exemple, l'initiation de l'invasion cellulaire nécessite la sécrétion de matrix-métalloprotéase (MMP) qui

est notamment permise par une activation des canaux de type SOCs (Store Operated Channels) à la suite de la déplétion des stocks calciques contenus dans le RE (Taylor *et al*, 2020). Ce phénomène est appelé SOCE (Store Operated Calcium Entry) et se retrouve impliqué dans de nombreux cancers (Jardin & Rosado, 2016), notamment celui de la prostate et du pancréas.

Les canaux SOCs sont principalement représentés par les protéines ORAIs composés de trois membres ORAI1, ORAI2 et ORAI3 présents sur la membrane plasmique des cellules. Ces canaux permettent l'entrée du calcium dans le cytosol. Il existe des variations de séquences entre ces trois isoformes notamment au niveau des régions C-terminal et N-terminal, mais garde plus de 60% d'homologie de séquence. (Feske *et al*, 2006; Lis *et al*, 2007; Prakriya & Lewis, 2015) (Figure 18).

En 2006, des approches par ARN interférent (siRNA) associées à une analyse des liaisons génétiques ont permis d'identifier une protéine de surface cellulaire de 33 kDa (301 acides aminés) génétiquement codée sur le chromosome 12, lors d'une étude sur les mécanismes moléculaires du trouble d'immunodéficience combinée sévère (Feske *et al*, 2006). Ces canaux ont été décrit pour la première fois sous le nom de CRACM1, plus tard nommé d'après la mythologie grecque « les Horae » transformés en Orai1, s'est avérée être l'unité de formation de pores de l'une des plus importantes voies d'entrée de calcium dans les cellules, le CRAC (Ca²⁺ release-activated channels). Le processus d'activation des canaux CRAC est très inhabituel, car il implique des protéines qui résident dans différents compartiments cellulaires : STIM1 agissant comme senseur de Ca²⁺ dans le RE et Orai1 comme une sous-unité dans la membrane plasmique formant un pore. La famille des ORAI représente des protéines à 4 domaines transmembranaires nommés de TM1 à TM4. Diverses pathologies ont pu être associées à des mutations présentes sur chacun de ces domaines transmembranaires comme le trouble d'immunodéficience sévère, qui se caractérise par une mutation R91W inactivant le canal Orai1 (Feske *et al*, 2006; Feske, 2011). On retrouve également des mutations sur d'autres boucles qui sont associées au développement de tumeur comme la mutation H134K sur le domaine transmembranaire 2, qui est associée au cancer colorectal, ou encore, le domaine transmembranaire 3 qui lorsqu'il est muté G183A ou G183D, est associé au glioblastome (Sallinger *et al*, 2020). De plus en plus d'études ont commencé à s'intéresser au rôle et à la fonctionnalité des isoformes d'Orai (Orai2 et Orai3) (Gwack *et al*, 2007; Frischauf *et al*, 2008; McNally *et al*, 2009). Cependant, le canal Orai1 reste à ce jour le canal CRAC le plus étudié, et se trouve être l'un des principaux acteurs SOCE dans différents types cellulaires (Guzman *et al*, 2014). Chez l'homme, la protéine Orai1 est exprimée sous une forme longue

(Orai1a) et une forme courte (Orai1b) provenant de l'initiation alternative de la traduction sur la Met64 (Desai *et al*, 2015; Fukushima *et al*, 2012).

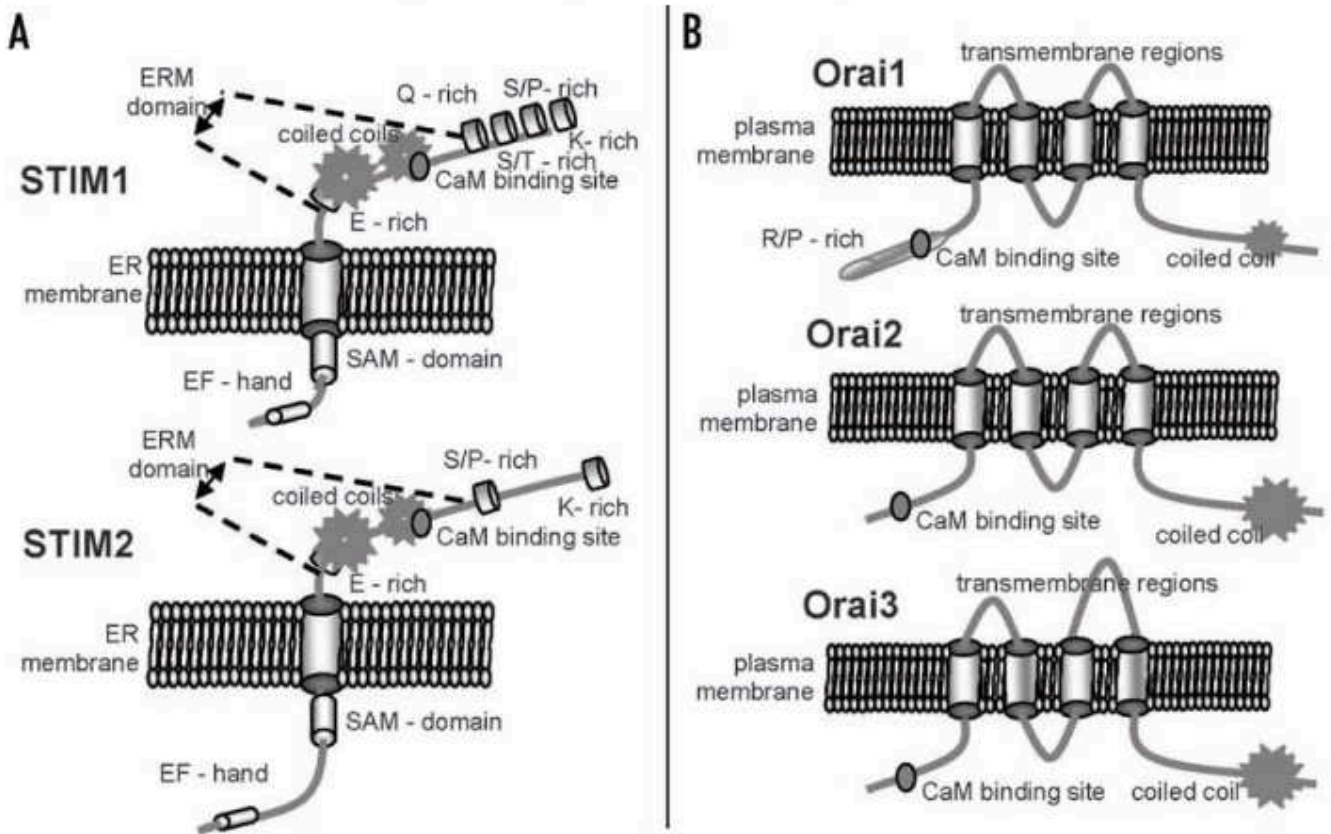


Figure 18 : représentations des protéines impliquées dans le SOCE

(A) représentations des protéines réticulaires senseurs de calcium composé de deux membres STIM1 et STIM2.

(B) représentations des membres de la famille des canaux SOCs avec les 3 isoformes d'Orai (Frischauf *et al*, 2008).

Orai1 fonctionnel forme un complexe homo- ou hétérotétramère, et il a été démontré en 2012 qu'il forme également un complexe homo- ou hétérohexamère, avec d'autres protéines Orai afin de former le canal et son pore. La structure fermée du canal d'Orai a révélé que six monomères sont disposés autour d'un axe central, dans lequel le segment transmembranaire 1 de chaque sous-unité forme la surface interne du pore, confirmant ainsi des études antérieures (Gudlur & Hogan, 2017), et les segments transmembranaires 2 à 4 sont positionnés en anneaux concentriques autour de ce pore conducteur d'ions. Il est cependant nécessaire de garder à l'esprit qu'il existe des associations avec ses deux autres homologues, Orai2 et Orai3 qui participent à la modulation du SOCE (Frischauf *et al*, 2008; Gao *et al*, 2010; Gwack *et al*, 2007). Une caractéristique essentielle du canal CRAC est sa très haute sélectivité pour le calcium par rapport au sodium et son faible courant unitaire (Lis *et al*, 2007; Mercer

et al, 2006; Li *et al*, 2007). L'activation du courant SOCE est définie par l'interaction entre Orai1 et STIM1 puisque l'inhibition d'un des deux acteurs, ou des deux acteurs, abolit le SOCE, même en cas de déplétion calcique du RE (Soboloff *et al*, 2006).

Deux modèles ont été proposés pour décrire la liaison de STIM1 à l'extrémité C-terminale cytosolique Orai1. Le modèle dimère, qui postule la liaison d'un dimère STIM1 à une paire de segment M4 d'Orai. Ce modèle crée une structure où les domaines CC2 de CAD/SOAR se replie comme une poche de liaison (Zhu *et al*, 2017) qui n'est pas facilement conciliable avec la structure ouverte d'Orai. C'est pourquoi dans le modèle de liaison monomérique, un dimère STIM1 n'engage qu'une seule extrémité C-terminale d'Orai1. Ce modèle a été proposé sur la base des expérimentations d'un mutant F394H de STIM1 (défiance de liaison avec ORAI) en dimère avec une protéine STIM1 normal qui est toujours capable d'activer Orai1 (Zhou *et al*, 2015). Néanmoins, les deux modèles peuvent représenter différentes étapes du processus d'activation du CRAC. Les réarrangements conformationnels qui ont lieu dans la structure des ORAIs lors de la liaison avec la protéine STIM ne sont que partiellement résolus. Il est fort probable que la liaison de STIM1 avec une ou plusieurs extrémités d'ORAI1 induise la propagation du signal en exerçant une force sur les quatre régions transmembranaires. Il est plutôt admis actuellement que le canal fermé est stabilisé par de multiples interactions transmembranaires, qui sont inhibées lors de la liaison de STIM1 pour ouvrir le pore permettant ainsi l'influx de calcium. Le courant calcique médié par Orai1 est généré après l'appauvrissement en calcium du RE détecté par STIM1 située généralement au niveau de la membrane du RE (Zhang *et al*, 2015; Spassova *et al*, 2006). Les protéines STIM comprennent deux isoformes, STIM1 et STIM2, l'interaction STIM1 et Orai1 étant la mieux connue à ce jour (Brandman *et al*, 2007). Ces protéines STIM sont composées d'un domaine transmembranaire unique, d'une région intraréticulaire N-terminale qui contient un domaine « EF-Hand » détectant les variations de la concentration de calcium dans le RE, et d'une région cytoplasmique C-terminale ayant deux domaines permettant son interaction avec Orai1 (Muik *et al*, 2008; Johnstone *et al*, 2010). C'est le domaine « EF-Hand » qui va être le senseur de calcium puisque celui-ci est lié aux ions calcium, et lors de la déplétion des stocks calciques du RE, ces domaines se retrouvent alors sans liaison au calcium ce qui va induire la dimérisation des protéines STIM (Luik *et al*, 2008; Liou *et al*, 2005). Les dimères de STIM1 formés interagissent physiquement par leur extrémité C-terminale avec l'extrémité C-terminale d'Orai1, activant ainsi le canal Orai1, qui permet la génération d'un courant CRAC (Figure 19). Ceci induit alors le passage des ions calcium à travers le canal Orai1, ce processus est appelé SOCE (Soboloff *et al*, 2006; Wang *et al*, 2010b). Ce processus SOCE fait entrer du calcium dans

le cytosol et va permettre le restockage de calcium dans le RE. Ceci induit le phénomène inverse de la dimérisation des STIMs. En effet, puisque les domaines « EF-Hand » sont de

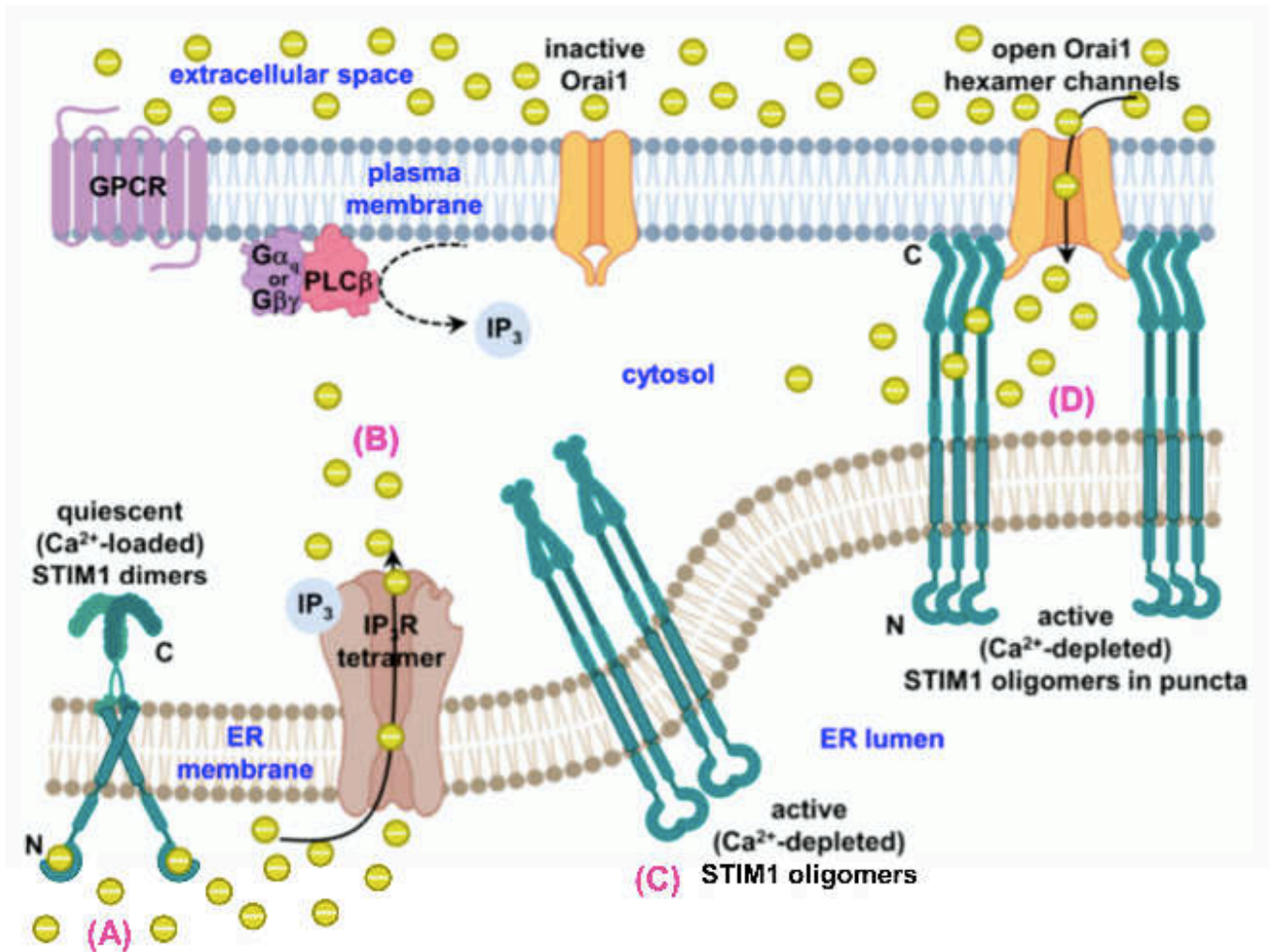


Figure 19 : mécanisme d'activation des canaux SOCs

Les étapes à l'origine du SOCE sont représentées à partir de la lettre A jusque D. (A) STIM1 est associé au calcium intraréticulaire et est stable dans cet état. À la suite d'un stimulus externe et de l'activation de la phospholipase C la production d'IP3 induit une plus forte activation du récepteur à l'IP3 présent sur la membrane du réticulum (B). Ce processus induit alors le relargage du calcium contenu dans le réticulum et produit alors un déficit de la liaison en calcium sur la protéine STIM1, ce qui va provoquer son activation (C). L'activation de STIM1 se traduit par une oligomérisation et une translocation vers la membrane plasmique où se trouve le canal ORAI1 et interagit directement avec ORAI1 ce qui induit l'ouverture de ce canal et la génération d'un courant de type SOCE (D). (Noble et al, 2020)

nouveau en liaison avec le calcium présent dans le RE, une dé-dimérisation des protéines STIM s'opère ce qui conduit à l'inactivation des protéines ORAI1, et l'arrêt du SOCE.

Cette entrée induite par le SOCE est une source importante de calcium dans la cellule. Ce calcium, entrant très rapidement en grande quantité dans le cytosol, doit être stocké dans la cellule notamment grâce à certains organites de stockage. LE RE est l'un d'entre eux, mais

d'autres sont également présents et peuvent jouer ce rôle de réservoir de calcium comme les lysosomes (Kilpatrick *et al*, 2013). Cette entrée calcique peut induire sous certaines conditions des oscillations calciques qui correspondent à des mouvements de pics d'ion calcium qui sont ensuite réabsorbés. Ce phénomène d'oscillations calciques est décrit notamment dans les processus cancéreux puisqu'elles permettent la formation des invadopodes qui sont à l'origine de l'invasion cellulaire (Sun *et al*, 2014). Ces oscillations calciques sont fortement dépendantes de l'activité des SOCs puisque l'inhibition d'un des acteurs du SOCE est suffisante pour empêcher toutes oscillations calciques intracellulaires. De plus, l'abolition des oscillations calciques lors d'une répression de l'expression de ORAI1 ou STIM1 induit une forte diminution de la formation des invadopodes et également une forte diminution de la sécrétion de MMPs.

Un remodelage de la signalisation calcique SOCE avec une modification de l'expression des canaux calciques, qui activent les voies alternatives, pourrait expliquer la rechute du cancer. Il a été démontré que le calcium est un régulateur clé de différents processus cancéreux et qu'il est impliqué dans la résistance à la thérapie (Büsselberg & Florea, 2017), par conséquent, des recherches supplémentaires sur le calcium dans le cancer et la détermination de nouvelles cibles sont très importantes. Depuis le début de ces recherches, de nombreux transporteurs, pompes ou canaux calciques ont été décrits comme des cibles potentielles et ont fait l'objet d'essais cliniques (Cui *et al*, 2017)). De nouveaux essais cliniques ciblant des canaux ont été mis en place notamment en combinaison avec la chimiothérapie (Sallán *et al*, 2018).

La régulation du calcium intracellulaire qui résulte de l'entrée calcique induite par le SOCE fait intervenir d'autres acteurs qui sont présents à la surface d'autres organites comme sur les mitochondries, mais aussi avec des échangeurs présents dans la membrane plasmique souvent associés à la signalisation sodique comme l'échangeur NCX (Hilgemann, 2020). Cette interaction avec les autres organites de la cellule crée localement des pics de concentrations calciques au sein de la cellule, et crée ainsi une spatialité du calcium intracellulaire.

Organisation spatiotemporelle du calcium intracellulaire

Le contrôle de plusieurs fonctions par l'activation spécifique de voies de signalisations dépendantes du calcium nécessite une organisation du calcium intracellulaire. En effet, il a pu être montré, un rôle important de l'amplitude et de la présence ou non d'oscillations calciques dans le contrôle de ces voies de signalisations, et plus récemment également par un contrôle spatial du calcium intracellulaire. Cette organisation dans l'espace définit des microrégions avec différentes concentrations de calcium afin d'activer certaines voies (Monteith *et al*,

2017). Par exemple, l'apparition d'un gradient de calcium au sein de la cellule peut permettre d'induire une polarisation de la cellule et favoriser la sécrétion biliaire (Trampert & Nathanson, 2018).

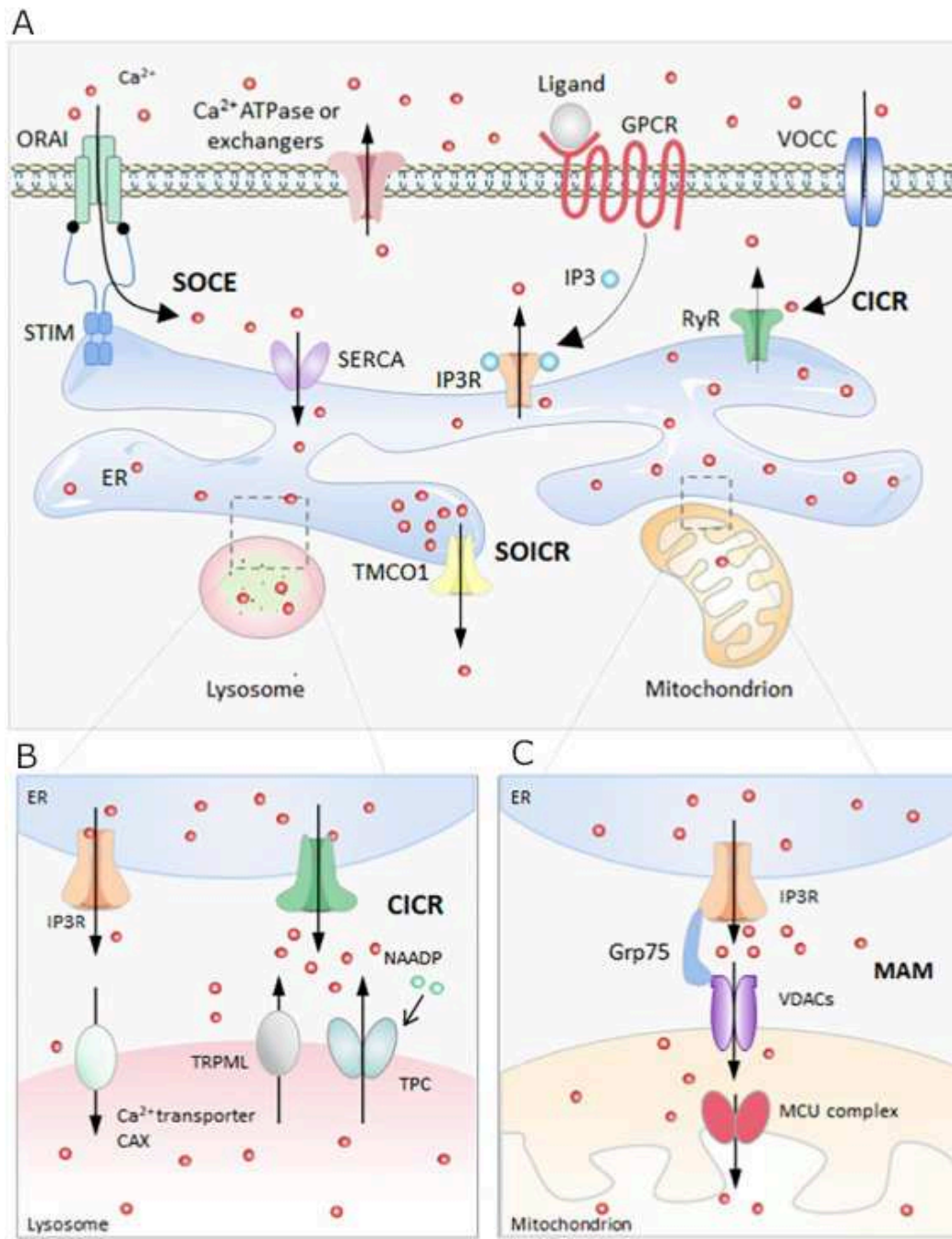


Figure 20 : structure et acteurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie calcique dans le temps et l'espace (A) Entrée de calcium dû à une entrée SOCE, mais également par des VOCC (voltage operated calcium channel) créent un surplus de calcium cytosolique qui est réabsorbé par la pompe réticulaire SERCA. La présence de GPCR à la membrane permet la stimulation d'IP3R via la production d'IP3 régulant de concours avec RYR la concentration calcique réticulaire. (B) Lysosomes conteneur de calcium qui peut être associé au réticulum et permettre d'échanger du calcium rapidement entre ces deux compartiments Par la présence de canaux tel que TRPML et TPC ou encore d'échangeur tel que CAX. (C) La mitochondrie qui peut également échanger du calcium rapidement par l'intermédiaire de MAM par l'interaction de plusieurs canaux VDACS avec IP3R faisant entré le calcium dans la mitochondrie pris en charge par MCU. Adapté de (Zheng et al, 2022)

Cette polarisation cellulaire est également retrouvée dans le cas du cancer de la prostate avec l'expression spécifique de TRPM8 (canal calcique de la famille TRP) au pôle apical cellulaire (Bidaux *et al*, 2005). De plus, plusieurs études montrent que la direction prise lors de la migration cellulaire est corrélée avec des pics de calcium intracellulaire localisés au pôle migrant de la cellule (Villalobo & Berchtold, 2020). Le contrôle de l'aspect spatiotemporel du calcium intracellulaire passe également par la présence du calcium dans d'autres organites (Figure 20A). La mitochondrie est désormais bien démontrée comme participant au contrôle du flux de calcium notamment par une liaison avec le RE. Cette liaison directe entre le RE et la mitochondrie, est appelé MAM (Mitochondria Associated Membrane) (Missiroli *et al*, 2017; Burgoyne *et al*, 2014) (Figure 20C). La mitochondrie est notamment responsable de la génération d'ATP (source d'énergie indispensable à la cellule), ce qui induit une production d'espèce réactive à l'oxygène (ROS = reactive Oxygen Species). Ce fonctionnement est sous le contrôle de la concentration calcique cytosolique. Dans une cellule saine, le relargage transitoire de calcium par les réservoirs cellulaires comme le RE induit la production d'ATP, en revanche une concentration calcique cytosolique élevée pendant un temps plus long induit l'apoptose notamment par le relargage du cytochrome C de la mitochondrie (Bononi *et al*, 2017). Dans la cellule saine, cette concentration calcique cytosolique est élevée de façon transitoire puisque, suite à la déplétion des stocks calciques réticulaire, il y a certes une activation du phénomène SOCE, mais il est à noter que les ROS ont un effet inhibiteur sur l'activité des canaux SOCs comme ORAI1. Les ROS produits sont donc une façon de réguler l'entrée calcique induite par les canaux SOCs. Il a également été montré que les ROS favorisent également la phosphorylation du canal RYR conduisant à son activation et ainsi au relargage de calcium et la prise en charge de ce calcium par les mitochondries favorisant la production d'ATP ce que l'on peut supposer comme présent dans les cellules cancéreuses (SanMartín *et al*, 2020). De plus, dans les cellules cancéreuses, la « dérégulation » de la signalisation calcique mitochondriale conduit à une augmentation de l'invasion et de la migration cellulaire (Delierneux *et al*, 2020). La connexion directe du RE à la mitochondrie par les MAM induit une forte entrée de calcium dans la mitochondrie, un phénomène qui est très largement mis en avant dans le processus du développement du cancer et la résistance à l'apoptose (Khan *et al*, 2006; Marchi *et al*, 2012; Szado *et al*, 2008; Danese *et al*, 2017). Cette organisation en MAM permet donc à la cellule d'induire des voies de signalisations qui sont spécifiques du calcium dans la mitochondrie sans avoir la nécessité de transiter par le cytosol. Ceci permet donc un meilleur contrôle de la concentration calcique à la fois dans le temps et dans l'espace, mais ce n'est pas la seule solution pour le contrôle du calcium dans l'espace cytosolique. En effet, de nouveaux réservoirs de calcium ont été mis en avant avec les endolysosome (Figure 20B). Ces

endolysosomes ont un rôle important dans la fonction physiologique calcique notamment au niveau neuronal par la production d'un aSOCE (acidic SOCE) médié par des canaux calciques présents à la surface des endolysosomes (Hui *et al*, 2015; Lakpa *et al*, 2020). Ils sont également décrits comme pouvant à eux seuls générer des oscillations calciques dans les myocytes cardiaques (Davidson *et al*, 2015), ou encore comme initiateur de voie de signalisation dans les fibroblastes en relarguant leur contenu calcique allant jusqu'à 600 μ M de concours avec le RE (Kilpatrick *et al*, 2013). Plus récemment, les études de ces endolysosomes montrent leur présence et leurs rôles dans le développement du cancer (Grimm *et al*, 2018). Ils sont présent plus spécifiquement sur le pôle migrant des cellules et favorise le relargage du calcium essentielle à la contraction notamment par l'implication du canal calcique TPC2 (Alharbi & Parrington, 2019).

Outre le contrôle de la concentration calcique dans l'espace et dans le temps par des organites intracellulaires, d'autres voies de signalisations sont impliquées via des échangeurs tels que NCX (Na⁺/Ca²⁺ exchanger). Ce lien étroit entre la signalisation calcique et sodique, notamment via NCX, a déjà été mis en évidence dans certains cancers gastro-intestinaux (Ding *et al*, 2020). Mais l'implication de l'homéostasie sodique dans la régulation de ces processus semble être beaucoup plus large.

La communication calcium - sodium

Plusieurs rapports ont suggéré un rôle important de nombreux acteurs calciques dans le cancer. Cependant, certains acteurs ont été mis en avant, comme des régulateurs de la concentration et de la localisation du calcium. Dans les radeaux lipidiques notamment, nous retrouvons une association de différents types de canaux ou transporteurs qui permet une meilleure activation et communication entre ces acteurs. Par exemple, dans le même radeau lipidique, il a été montré la présence du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et de certains canaux chlorure et calcium, qui sont essentiels pour augmenter l'invasion et la migration cellulaires (Guéguinou *et al*, 2015). Cela suggère que le calcium, impliqué dans le contrôle du mouvement cellulaire, nécessite également d'autres ions et notamment le sodium (Wong *et al*, 2019). En effet, ces deux ions (calcium et sodium) sont essentiels pour la contraction cardiaque, la modification de la concentration en calcium et des oscillations est sous le contrôle de la concentration en sodium, en particulier par l'échangeur NCX (Hilgemann, 2020). Cette modulation réciproque du calcium et du sodium par l'échangeur NCX a également été décrite dans le cancer gastro-intestinal (Ding *et al*, 2020). De plus, il a été montré que la surexpression des canaux sodiques et de l'échangeur NCX est responsable du

développement du cancer. NCX est l'un des acteurs membranaires, qui permet de réguler la quantité d'ions calcium présents dans le cytosol par une sortie d'ions calcium et une entrée d'ions sodium. Le processus normal de cet échangeur est de faire sortir 1 ion calcium en échange d'une entrée de 3 ions sodium, mais cet échangeur est capable de changer son mode d'action (reverse mode de NCX) en cas de concentration sodique importante dans le cytosol ou en cas de besoin spécifique en calcium comme cela a été montré dans l'activation de la voie MEK ERK1/2 (Askari, 2019). Les connexions entre le calcium et le sodium sont très importantes dans de nombreux processus physiologiques et les flux de ces ions sont déterminés différemment en physiologie et en pathologie. C'est pourquoi certaines études portent directement sur le rôle de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) dans la régulation de ces deux ions (Verkhatsky *et al*, 2018b).

Outre cette double régulation calcium / sodium, la communication étroite entre le calcium et le sodium est également un concept qui implique différents acteurs puisque l'homéostasie sodique est elle aussi finement régulée. En effet, les canaux sodiques ont été décrits comme promoteur de l'invasion cellulaire avec une augmentation de la concentration de sodium intracellulaire qui induit l'activation de NHE1 et le mode inverse de NCX essentiel pour une initiation d'invadopodes (Roger *et al*, 2015). Les auteurs ont montré que NHE1 (échangeur sodium/proton 1) est impliqué par son activité dans la modification du pH qui contrôle en partie la sécrétion des MMPs. De plus, la surexpression de NHE1 est couramment décrite dans le cancer et est associée à la modification du pH intracellulaire et extracellulaire. Le contrôle de ce pH intracellulaire par NHE1 augmente le potentiel de survie des cellules par le métabolisme de Warburg qui protège les cellules contre la mort (Cardone *et al*, 2019).

L'homéostasie sodique

La concentration sodique intracellulaire répond à certains critères et, lors d'un déséquilibre de la balance sodique intracellulaire, nous retrouvons des pathologies qui y sont associées comme le cas du cancer. Dans celui-ci, nous observons une augmentation de la concentration sodique dans les cellules, mais également de façon plus générale dans la tumeur (Barrett *et al*, 2018). La concentration sodique élevée n'est pas unique au cancer de la prostate, mais est également retrouvée dans le cas de cancer du cerveau (Ouwkerk *et al*, 2003), ou encore du sein (Jacobs *et al*, 2011; Ouwkerk *et al*, 2007) (Figure 21). Cette caractéristique de concentration sodique élevée dans le cancer et dans la masse tumorale a été utilisée pour le développement de processus d'imagerie afin de mieux définir la masse tumorale et ses bordures (Gawlitza *et al*, 2017; Poku *et al*, 2020).

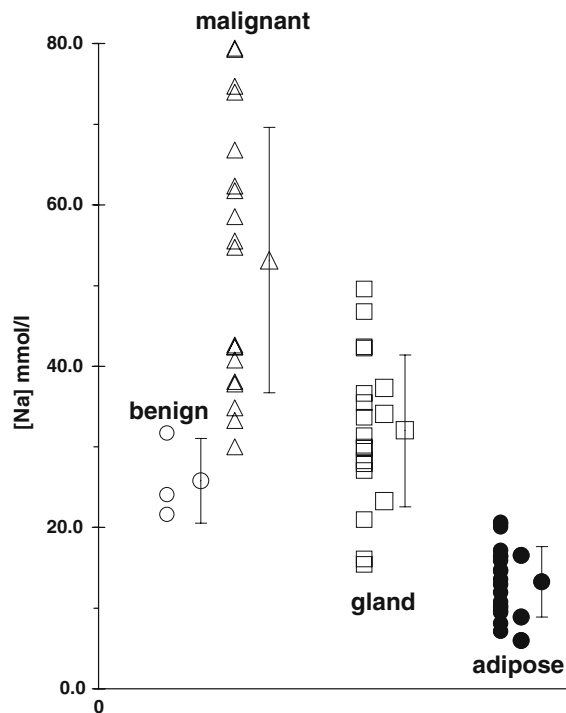


Figure 21 : concentration sodique de différents tissus
 La concentration sodique tissulaire est plus élevée dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus sains (Ouwerkerk *et al*, 2007)

Le contrôle du sodium intracellulaire semble jouer un rôle crucial dans le développement du cancer et de plus en plus les canaux de type sodiques sont mis en avant comme vecteur de l'entrée sodique responsable d'une invasion plus accrue (Anderson *et al*, 2019). Dans le cancer du côlon, les canaux sodiques voltages dépendants tel que Nav1.5 sont montrés comme responsables de l'activation de la voie de signalisation MAPK et ERK1/2, qui induit l'expression de facteurs de transcription favorisant la migration et l'invasion (House *et al*, 2015). Sur les mêmes principes, d'autres Nav sont mis en avant comme le Nav1.6 (Lin *et al*, 2019), Nav1.7 (Campbell *et al*, 2013), Nav 1.8 (Suy *et al*, 2012), tous associés à une agressivité cancéreuse. Ces canaux sont également en étroite relation avec des échangeurs tels que NHE1 participant à la régulation du pH, mais également montrés comme impliqués dans la migration et l'invasion cellulaire (Luo *et al*, 2019; Roger *et al*, 2015). Cet échangeur NHE1 semble jouer un rôle important sur le potentiel métastatique des cellules cancéreuses notamment par une augmentation accrue de la motilité (Spugnini *et al*, 2015; Amith & Fliegel, 2013; Amith *et al*, 2017). Il est également démontré comme impliqué dans la sécrétion des MMPs (Busco *et al*, 2010; Steffan *et al*, 2009), et également retrouvé de façon plus importante dans les

protrusions membranaires spécifiques de l'invasion, les invadopodes (Amith *et al*, 2015; Lauritzen *et al*, 2012). Dans le cas du cancer du sein, NHE1 favorise la formation des invadopodes par son activité en étroite collaboration avec le canal Nav 1.5 qui se retrouve au sein du même microdomaine (Brisson *et al*, 2013a). Ce même Nav 1.5 est également démontré comme responsable de la colonisation du poumon par les cellules métastatiques du sein (Driffort *et al*, 2014), et participe également à la résistance à l'apoptose (Nelson *et al*, 2015). NHE1 est également suractivée dans les cancers gastriques par le canal Nav1.7 qui induit une modification du pH responsable de la translocation de NF- κ B dans le noyau afin de favoriser la transcription de gènes responsables de la migration cellulaire (Xia *et al*, 2016), l'invasion et la prolifération (Luo *et al*, 2019). De plus, le canal Nav1.7 est également mis en évidence lors de l'invasion et la migration des cellules du cancer du poumon non à petites cellules par l'activation de la voie ERK1/2 à la suite d'une stimulation par de l'EGF (Campbell *et al*, 2013).

Tout ceci met en avant que la plupart des mécanismes connus comme étant sous le contrôle de l'homéostasie calcique comme l'expression de facteurs de transcriptions, la motilité, migration et l'invasion cellulaire et également la sécrétion de MMPs, peuvent également être associés à une modification de l'homéostasie sodique. Nous pouvons donc tout à fait envisager aux vues du lien étroit existant entre ces deux ions, une modulation réciproque permettant encore de réguler plus finement l'activation des différentes voies de signalisation. D'autre part, récemment dans les cancers, il a été mis en évidence la réexpression d'un canal de fuite sodique NALCN (Na leak Channel non-selective), ayant un rôle crucial dans les neurones. NALCN se retrouve exprimé et muté dans le cancer du pancréas, ce qui a été associé à son développement (Biankin *et al*, 2012).

IV. Le canal sodique NALCN (Sodium Leak Channel Non-selective)

Un autre canal sodique est très largement mis en avant dans de nombreuses pathologies, il s'agit de canal de fuite NALCN qui est constitutivement actif lorsqu'il est présent à la membrane. Ce canal a été très récemment mis en avant comme ayant un rôle prépondérant dans le développement des métastases (Rahrmann *et al*, 2022). Il s'agit cependant d'un canal connu depuis longtemps puisque dès les années 1930, l'utilisation des rayons X a généré des drosophiles mutantes (appelées narrow abdomen) qui présentaient un abdomen mal formé (Senatore *et al*, 2013). Ce n'est que dans les années 2000 que la région mutée a été identifiée comme codant pour une protéine transmembranaire (Nash *et al*, 2002). Par homologie de

séquence, il a pu être mis en évidence que cette protéine existait également chez les mammifères et avait été appelée Rb21 (Lee *et al*, 1999a). C'est en 2007 que l'activité de cette protéine a été mise en évidence dans les neurones, puisque montré comme générant un courant de fuite sodique. Cette caractéristique a valu à la protéine Rb21 d'être renommée en NALCN (Na⁺ Leak Channel Non selective) (Lu *et al*, 2007). La séquence de ce canal a un cadre de lecture ouvert qui code pour 1737 acides aminés et un poids moléculaire prédit d'environ 200kDa. Il présente une structure globalement similaire à celles rapportées pour les canaux calciques et sodiques.

Famille et structure

NALCN (également connu sous le nom de Rb21, VGCNL-1 ; NA et Dm α 1U pour la sous-unité α 1 unique chez *Drosophila melanogaster*, et NCA-1, NCA-2 chez *Caenorhabditis elegans*) a été associé à la famille des canaux ioniques à 24 domaines transmembranaires (qui se compose de 21 membres au total) (Figure 22). En plus, de NALCN cette famille comporte dix canaux sodiques (canaux voltage-dépendants Nav (numéroté de 1.1 jusque 1.9 et Nax non voltage-dépendants), et dix canaux calciques voltage-dépendants (Cav 1.1-1.4, Cav 2.1 , Cav 2.2, Cav 2.3 et Cav 3.1-3.3).

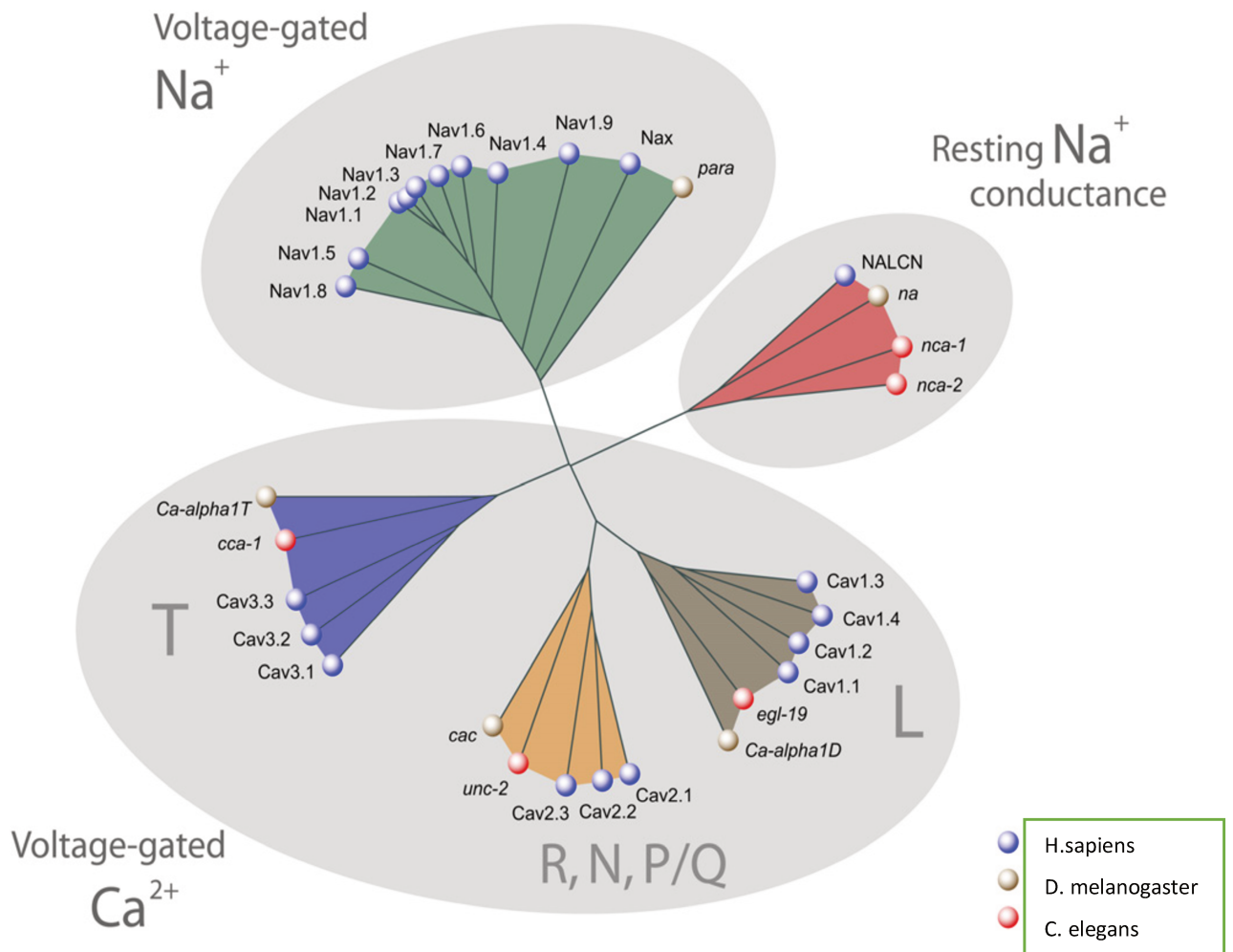


Figure 22 : famille des canaux ioniques à 24 domaines transmembranaires
 Représentation des sous-familles humaines des canaux sodiques et calciques voltage dépendant et de NALCN et ses homologues chez *D melanogaster* et *C elegans*. Adapté de (Snutch & Monteil, 2007)

Le canal NALCN est exprimé dans toutes les espèces animales, du placozoaire à l'Homme. La plupart des espèces ne possèdent qu'un seul gène NALCN à l'exception de *C. elegans*, qui possède deux gènes (*Nca-1*, *Nca-2*) (Senatore *et al*, 2013). Dans le génome humain, le gène NALCN est localisé sur le chromosome 13q32.3-q33.1 (Snutch & Monteil, 2007) et est composé de 44 exons (Cochet-Bissuel *et al*, 2014a) (Figure 23 partie haute). Il est hautement conservé chez les mammifères avec 99% d'identité entre l'homme et le rat. Chez la souris et le rat, le gène NALCN est situé respectivement sur le chromosome 14 en 14E5 (47 exons) et le chromosome 15 en 15q25 (42 exons). Chez *Drosophila melanogaster*, le NALCN présente 57 % d'identité avec le NALCN humain. Pour *Caenorhabditis elegans*, *NCA-1* et *NCA-2* présentent

une identité de 48 % avec le NALCN humain (Impheng, 2020). La protéine NALCN est plus petite que la plupart des canaux Navs et Cavs (Senatore *et al*, 2013)

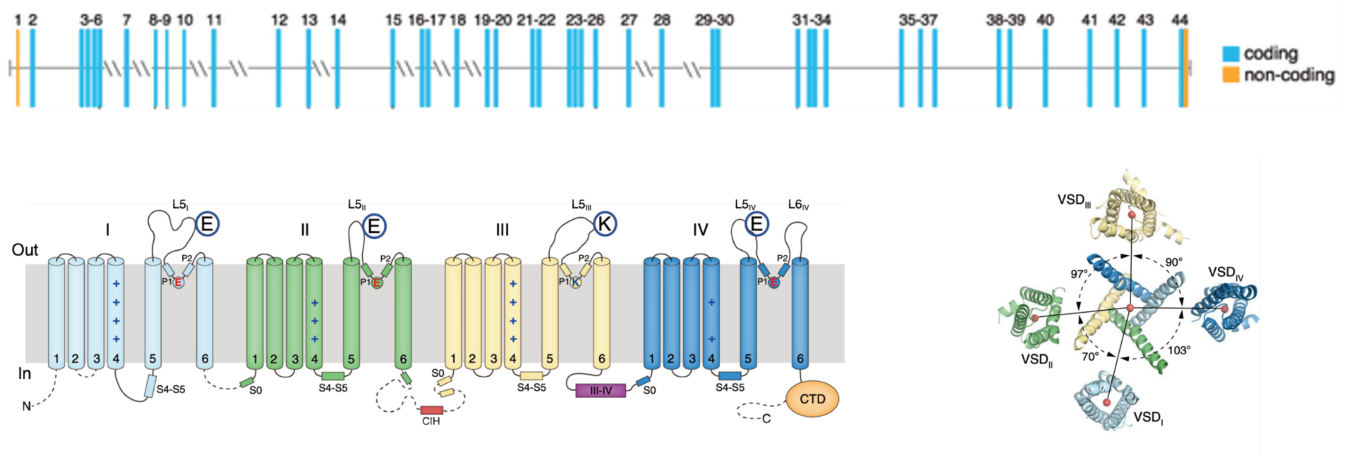


Figure 23 : Représentation du canal NALCN

La partie haute montre les 44 exons qui composent le canal NALCN. (Partie basse) représentation des 4 domaines à 6 segments transmembranaires avec l'apparition du motif EEKE responsable de la sélectivité pour le sodium, et à droite la vue de dessus de l'assemblage pour former le pore. Adapté de (Kang *et al*, 2020; Fukai *et al*, 2016)

Propriété physique et fonctionnelle

Comparé aux 20 autres membres de la famille des canaux ioniques à 24 domaines transmembranaires, le canal NALCN est différent. Ses propriétés biophysiques ont été décrites pour la première fois par Lu *et al*. en 2007. Le canal NALCN a d'abord été décrit comme voltage indépendant avec une relation linéaire I (courant)/ V (tension) et un potentiel d'inversion de 0 mV. Il s'est avéré qu'il s'agissait d'un canal non sélectif avec une perméabilité au sodium, potassium et césium. Le remplacement de plus de 90 % de chlore dans la solution de bain par du méthanesulfonate (MES) n'a pas modifié la taille ou le potentiel d'inversion du courant, ce qui signifie que le NALCN est imperméable aux anions. L'estimation de la sélectivité ionique du canal a été déterminée dans diverses solutions ioniques. Ce canal est non-sélectif cependant, présente des affinités différentes pour les ions avec une préférence pour le $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Ca}^{2+}$, ($\text{PNa } 1,3 > \text{PK } 1,2 > \text{PCs } 1,0 > \text{PCa } 0,5$) (Lu *et al*, 2007), et plus récemment montré comme étant perméable au nickel également (Chua *et al*, 2020). La sélectivité est apportée par la séquence protéique de la région du pore (Figure 23 partie basse).

NALCN est une lignée distincte de canaux à domaines transmembranaires avec la sélectivité ionique dans différentes espèces qui peuvent ressembler à la fois à une sélectivité pour le calcium ou pour le sodium. Les canaux de type Cav1 et Cav2 sont sélectifs au calcium, et

présentent une séquence d'acide aminé EEEE au niveau du pore, et les canaux Nav1 sélectifs au sodium, qui présentent les motifs DEKA, DEKG, ou DKEA. Le filtre sélectif du NALCN est le mélange des canaux voltage-dépendant sodiques et calciques : EEKE (Stephens *et al*, 2015) (Figure 24).

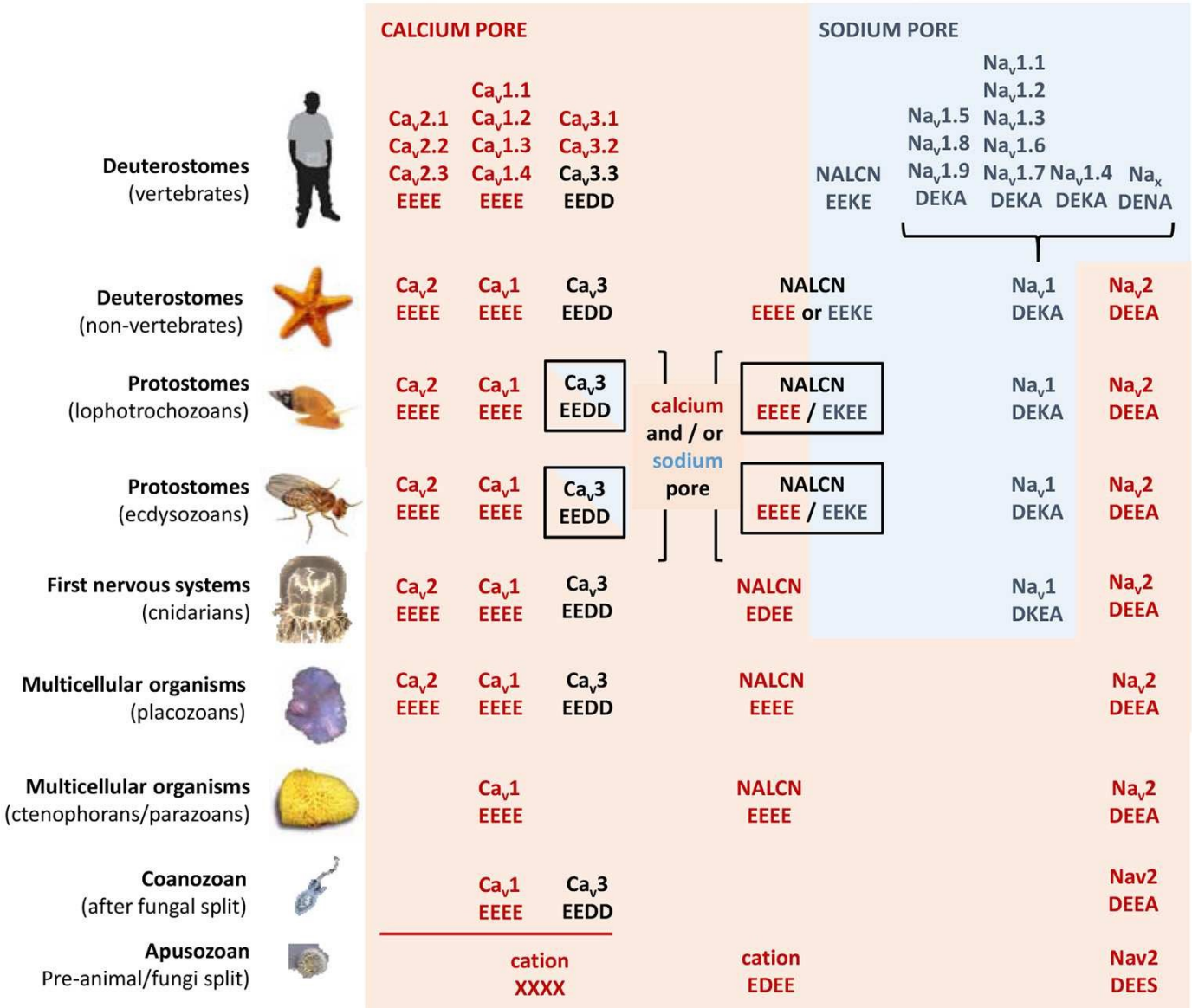


Figure 24 : Représentation du motif du pore de NALCN dans différentes espèces. Sur l'arbre phylogénétique des espèces à l'apparition de NALCN celui-ci présentait des propriétés calciques avec un motif EEEE qui évolue tout au long de l'arbre phylogénétique jusqu'à devenir sodique chez les vertébrés avec le motif EEKE (Stephens *et al*, 2015)

Les canaux NALCN possèdent le motif d'un canal calcique (EEEE) chez les organismes multicellulaires basaux (éponges, placozoaires et cnidaires) et les non vertébrés (les céphalocordés) (Senatore *et al*, 2013). Cependant, chez d'autres animaux, les canaux NALCN ressemblent aux canaux sodiques avec une lysine dans le domaine II ou III. Ainsi EKEE est le motif retrouvé chez les vers plats schistosomes, et la sangsue *Helobdella* (Lu & Feng, 2011), et le motif EEKE chez les arthropodes et vertébrés non-myriapodes (Senatore *et al*, 2013). Le motif EEKE de NALCN est conservé chez les mammifères, *D. melanogaster* et *C. elegans*. Un groupe distinct de non-vertébrés conserve une double sélectivité pour le calcium et le sodium. Les invertébrés lophotrochozoaires (mollusques, annélides) et les deutérostomiens non vertébrés (échinodermes, hémicordés) possèdent deux formes d'exon 15, générant un pore avec un motif calcique alternatif (EEEE) (Cochet-Bissuel *et al*, 2014a; Senatore *et al*, 2013). Les résidus du pore de NALCN sont importants pour la fonction de ce canal. Des expériences de réexpression de ce canal chez le mutant *Drosophila na* (abdomen étroit) ont indiqué que la mutation des résidus EEKE en résidus EEEE ne restaure pas le phénotype normal chez ces mutants *na* (Lear *et al*, 2013). Phylogénétiquement, il semble apparaître une transformation évolutive de la sélectivité de NALCN du calcium vers le sodium (Senatore *et al*, 2013; Senatore & Spafford, 2013). En supplément de cette spécificité chimique qui confère au pore des propriétés physiques particulières, l'insensibilité au voltage pourrait être en partie due à la composition en acide aminé des segments 4 de chaque domaine transmembranaire. En effet, NALCN ne comporte que 13 acides aminés chargés, donc presque deux fois moins que pour ses homologues voltage dépendant CaV et NaV. Ces canaux voltage-dépendants calciques et sodiques présente des résidus lysines, arginines à chaque troisième position le long des segments S4 contrairement à NALCN (Ren, 2011a; Lee *et al*, 1999b; Chua *et al*, 2020). Les charges positives sur le segment S4 de chaque domaine sont impliquées dans la dépendance au voltage dans les canaux Nav et Cav, en détectant les changements de potentiel de membrane, ce qui conduit à l'ouverture de ces canaux sous la dépendance du voltage (Cha *et al*, 1999; Ren, 2011a). L'activité de ce canal est principalement décrite dans des cellules dites excitables. Il a été montré dans les neurones que la perte d'expression de NALCN induit une diminution du potentiel membranaire cellulaire (Lu *et al*, 2007).

D'un point de vue pharmacologique, NALCN est considéré comme insensible à la tétrodotoxine (TTX) et résistant au césium (Lu *et al*, 2007). Il n'existe pas à l'heure actuelle d'antagoniste spécifique identifié de cette protéine, seul quelques métaux tels que le cobalt, le cadmium et le gadolinium permettant son inhibition (Alexander *et al*, 2017). Ce canal est également décrit, comme régulé par le calcium, cette régulation se faisant par des protéines

senseurs de calcium telles que CaSR (Boone *et al*, 2014; Lu *et al*, 2010). Ces senseurs induiraient l'activation de protéines G conduisant à une inhibition de l'activité de NALCN.

Expression de NALCN

Chez les invertébrés tels que *C. elegans*, les gènes NCA sont exprimés dans de nombreux neurones sensoriels et tous les motoneurons. Le NCA se localise le long des axones et s'enrichit dans les régions non synaptiques (Yeh *et al*, 2008). Pour les espèces plus lointaines dans l'arbre phylogénétique, le canal NALCN a été montré comme principalement exprimé dans le cerveau (rat et humain), le cœur (rat et humain) et le pancréas humain. Lu *et al.* en 2007 ont confirmé que le canal NALCN, est largement exprimé dans le système nerveux central en utilisant l'hybridation *in situ* de tranches de cerveau de souris avec des sondes d'ARN marquées. Une expression des transcrits de NALCN a été retrouvée dans plusieurs régions du cerveau, notamment le cortex occipital, le cervelet, la moelle épinière, le corps calleux, la substance noire, le cortex frontal, le striatum, le tronc cérébral et le cortex pariétal (Köroğlu *et al*, 2013). Aucune expression n'a été détectée dans les tissus non neuronaux, y compris le foie, la moelle osseuse, le muscle squelettique et le sang (Köroğlu *et al*, 2013). Cependant, Al-Sayed *et al.*, 2013 ont découvert que l'ARNm de NALCN était présent dans les muscles et les fibroblastes humains avec un niveau d'expression modéré (Al-Sayed *et al*, 2013). Swayne *et al.* ont également confirmé un profil d'expression élevé dans toutes les régions du cerveau ainsi que dans la moelle épinière, mais aussi dans le cœur et les glandes endocrines en utilisant une analyse d'ARNm humains. Dans le pancréas, l'expression de l'ARNm de NALCN, est retrouvée dans les îlots de Langerhans, et pas dans le tissu exocrine du pancréas (Swayne *et al*, 2009a). Dans le cas du cancer du pancréas, ce canal est également présent, mais porteur de mutation (Biankin *et al*, 2012). Récemment, il a été démontré comme ayant un rôle important dans les cellules musculaires lisses du myomètre humain lors de l'accouchement en favorisant la contraction. Dans cette même étude les auteurs mettent en avant un contrôle de l'expression de NALCN par les hormones œstrogènes et progestérones, avec une forte augmentation de l'expression de l'ARNm de NALCN en présence de progestérone (Amazu *et al*, 2020).

La formation d'un « canalosome »

De nombreux membres de la famille des canaux ioniques à quatre domaines nécessitent des sous-unités auxiliaires pour accomplir leur fonction de canal (Catterall *et al*, 2007; Wang *et al*, 2017; Iftinca, 2011; King *et al*, 2008; Chow *et al*, 2020). Il a été démontré que le canal NALCN

n'est fonctionnel que lorsqu'il est associé à ses protéines partenaires, formant une structure appelée « canalosome » (Cochet-Bissuel *et al*, 2014a) (Figure 25). Parmi ces protéines partenaires, on retrouve les protéines UNC80 (Jospin *et al*, 2007), UNC79 (Humphrey *et al*, 2007) et la protéine kinase SRC (Swayne *et al*, 2009b) et certains GPCR (récepteur couplé aux protéines G) (Cochet-Bissuel *et al*, 2014a). La protéine NLF-1 (NCA localization factor 1) également appelé FAM155A, est également considérée comme une protéine partenaire de ce canalosome. Cette protéine réticulaire permet à la protéine NALCN d'être intégrée à la membrane plasmique des axones (Xie *et al*, 2013). NLF-1 est une protéine résidente dans le réticulum endoplasmique, qui régule l'excitabilité et la locomotion neuronales à travers les canaux NCA chez *C.elegans* (Xie *et al*, 2013). Des mutations dans les gènes homologues du NALCN chez *Drosophila melanogaster* (*na*) et *Carnorhabditis elegans* (*nca*) ont entraîné des anomalies de la locomotion, de la sensibilité anesthésique, des comportements rythmiques et de la fonction synaptique (Humphrey *et al*, 2007; Pierce-Shimomura *et al*, 2008). Dans les neurones primaires de l'hippocampe de souris et les neurones dopaminergiques de la zone tegmentale ventrale (VTA), les neurotransmetteurs peptidiques tels que la substance P et la neurotensine peuvent activer les canaux NALCN via les récepteurs aux protéines G (Lu *et al*, 2009; Ren, 2011b). Cependant, l'activation du canal NALCN semble nécessiter une phosphorylation de la tyrosine qui se produit en recrutant SRC dans le complexe via une interaction physique avec UNC80 (Wang & Ren, 2009a). De plus, il a été rapporté que l'ACh active les canaux NALCN via les récepteurs M3 dans les cellules bêta pancréatiques d'une manière indépendante des petites protéines G, mais dépendante de SRC (Swayne *et al*, 2009b). Des expériences d'immunoprécipitation sur le cerveau de souris ont montré l'interaction physique entre l'UNC-79, l'UNC-80 et le canal NALCN (Lu *et al*, 2010, 2009).

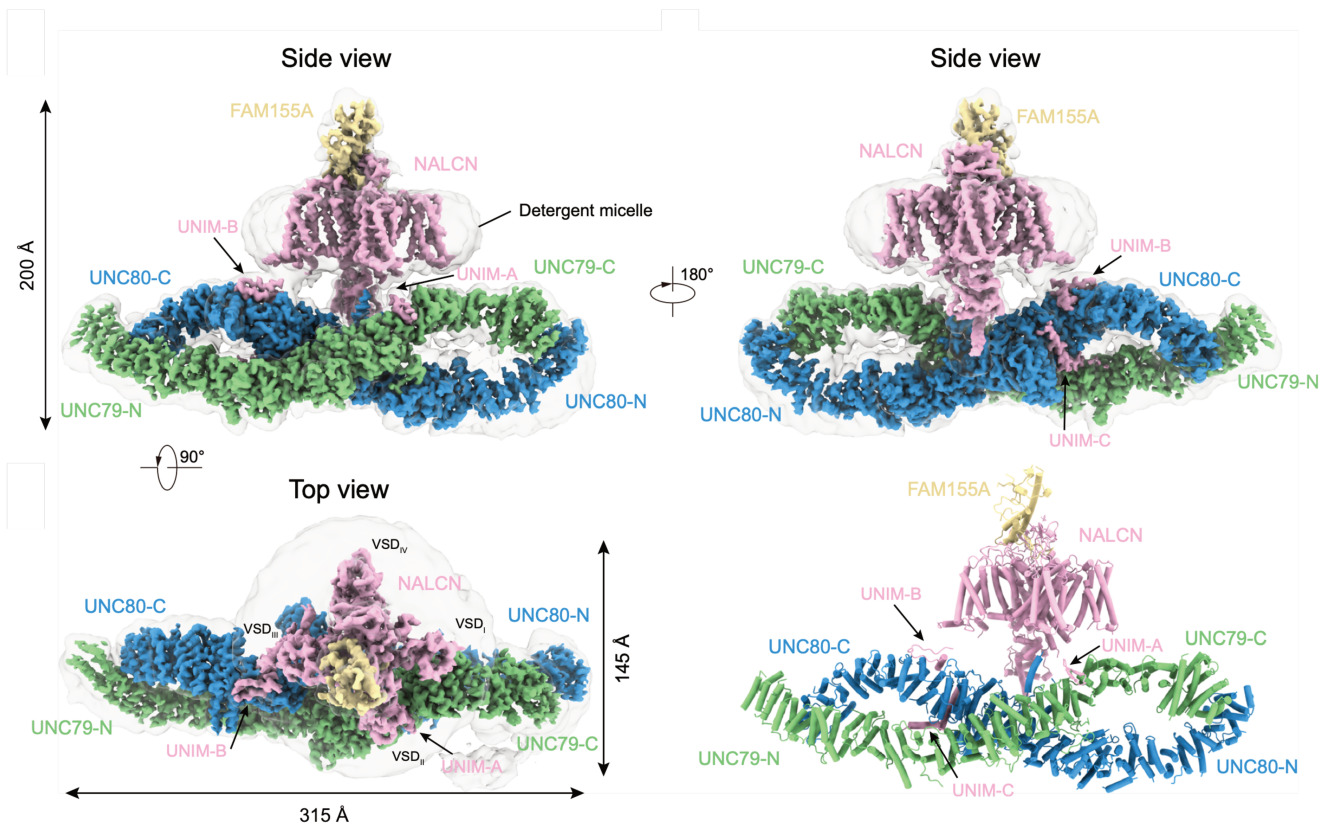


Figure 25 : représentation du canalosome NALCN

Différentes vues représentant le canalosome NALCN et l'association entre les différentes protéines qui le compose. (Kang & Chen, 2022)

UNC80, codé par UNC80, permet la liaison de NALCN à UNC79, et la présence de UNC80 et UNC79 sont nécessaires pour la fonction de canal de la protéine NALCN (Lu *et al*, 2010) (Figure 26). Le rôle de liaison a été mis en évidence par des expérimentations de co-immunoprécipitation dans des extraits de cerveau chez la souris, et en l'absence de UNC80, il est impossible de co-immunoprécipiter NALCN et UNC79 (Lu *et al*, 2010). De plus, UNC-80 se comporte comme une protéine d'échafaudage se liant également à la kinase SRC et recrute SRC dans le complexe du canal NALCN (Wang & Ren, 2009b). Le gène de cette protéine est situé sur le chromosome 2q34, et code pour une grande protéine avec 3258 acides aminés. Dans les neurones de l'hippocampe et de la zone tegmentale ventrale de la souris, l'UNC-80 fait partie du complexe NALCN, et il est nécessaire à la modulation positive du courant NALCN par la substance P et la neurotensine dans une voie indépendante des petites protéines G, mais dépendante de la kinase src (Lu *et al*, 2009). La protéine UNC-80 est impliquée dans le défaut d'endocytose dans les cellules neuronales mutées à la synaptojanine, et contribue à la transmission d'un signal de dépolarisation à la synapse dans les neurones de *C. elegans* (Yeh

et al, 2008; Jospin *et al*, 2007). De plus toujours chez *C. elegans*, l'UNC-80 est fortement exprimé dans le système nerveux, dans les motoneurones cholinergiques et GABAergiques (Jospin *et al*, 2007). Le gène *Unc-79* est situé sur le chromosome humain 14q32.12. Il code pour une protéine de 2635 acides aminés qui reste pour l'instant très peu étudiée (Figure 26). Chez la souris, l'ARNm de cette protéine est principalement exprimé dans le cerveau (Specca *et al*, 2010). La protéine UNC-79 est impliquée dans la localisation neuronale et la fonction du complexe NALCN chez *C. elegans* et *D. melanogaster* (Yeh *et al*, 2008; Humphrey *et al*, 2007). Il reste cependant à noter que les mutations de *Unc-79* chez la souris, *C. elegans* et *D. melanogaster* entraînent les mêmes phénotypes que les mutants de NALCN. Ceci prouve que cette protéine est absolument nécessaire à l'activité de ce canalosome et que les symptômes dus aux mutations de NALCN sont principalement dus à l'activité de canal de NALCN. Ces deux protéines UNC80 et UNC79 s'associent entre elles, et forment un dimère, la liaison de ce dimère par trois domaines UNIM (UNC interacting motif A,B et C) avec la protéine NALCN confère l'activité au canal NALCN (Kang & Chen, 2022).

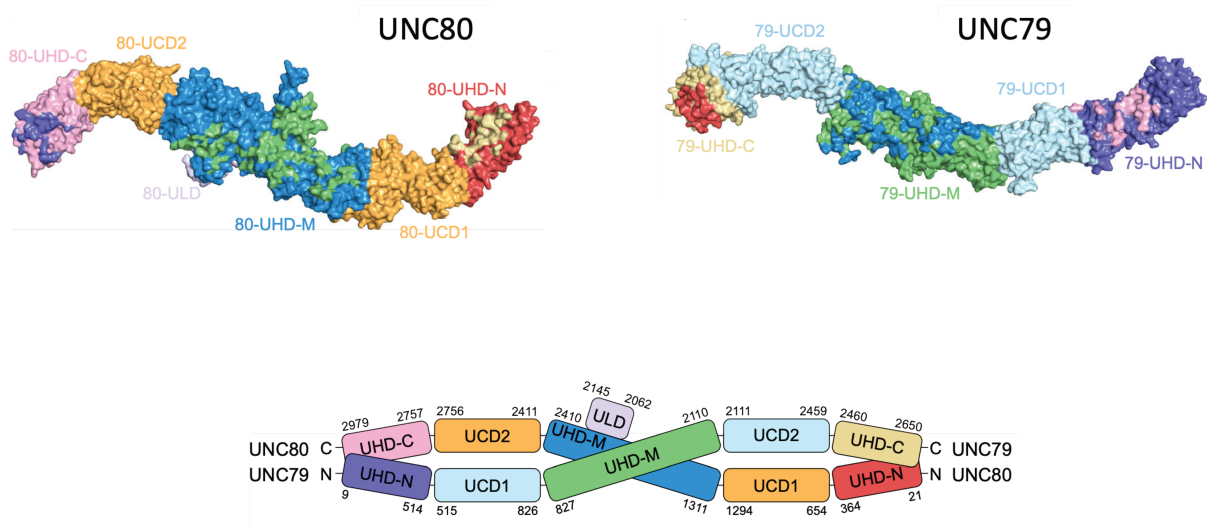


Figure 26 : Représentations des protéines partenaires UNC79 et UNC80
 Représentation des deux protéines intracellulaire UNC80 et UNC79 qui s'associe entre elles de façon antiparallèle.
 (Adapté de (Kang & Chen, 2022))

Ces trois protéines sont très largement liées entre elles, et interdépendantes les unes des autres. En effet, la mutation dans l'un des gènes modifie l'expression protéique et/ou la localisation neuronale des autres (Yeh *et al*, 2008; Humphrey *et al*, 2007; Lu *et al*, 2010; Pierce-Shimomura *et al*, 2008). Il a été constaté que l'UNC-79 affectait le niveau d'expression de l'UNC-80 puisque la protéine UNC-80 était indétectable chez les souris knock-out *unc-79* (Lu *et al*, 2010).

La protéine NLF1 ou FAM155 est quant à elle codée par le gène NLF-1 (NCA localization factor 1) qui est situé sur le chromosome humain 13q33.3. FAM155 est une famille de protéines transmembranaires avec un domaine riche en cystéine. Il existe deux membres de la famille FAM155 chez l'homme, à savoir FAM155A et FAM155B, qui pourraient tous deux interagir avec le complexe NALCN (Chua *et al*, 2020). FAM155 est l'homologue de NLF-1 chez *C. elegans*, qui est nécessaire pour la localisation membranaire de NALCN (Xie *et al*, 2013). Il est proposé que l'interaction entre NALCN et FAM155 soit similaire à l'interaction entre le canal calcique de levure Cch1 et son régulateur Mid1 (Ghezzi *et al*, 2014). NLF-1 a été décrit pour la première fois comme une protéine résidente du réticulum endoplasmique qui régule l'excitabilité et la locomotion neuronales à travers les canaux NCA chez *C. elegans* (Xie *et al*, 2013). La protéine NLF-1 contient environ 458 acides aminés. Chez *C. elegans*, la perte de NCA-1/2 ou de NLF-1 diminue la conductance de fond de Na⁺ et hyperpolarise le potentiel de membrane au repos des interneurons prémoteurs. Tout comme les protéines UNC79 et UNC80, la protéine NLF1 est également très liée et interdépendante des autres protéines qui forment le canalosome. En effet, NLF1 interagit directement avec NALCN, mais joue également un rôle dans le contrôle de l'expression de NALCN, puisque le niveau d'expression de NALCN augmente également lorsqu'il est coexprimé avec NLF-1.

Rôle physiologique

De nombreuses études génétiques sur des cellules de mammifères ont montré une variété de rôles physiologiques et pathologiques pour le canalosome NALCN. Des mutations et/ou des délétions du gène NALCN ou de ses protéines partenaires, entraînent une perturbation de l'activité respiratoire (Yeh *et al*, 2008; Xie *et al*, 2013), de l'activité cardiaque (Kim *et al*, 2012), et de l'osmorégulation systémique (Sinke & Deen, 2011). En effet, en plus d'autres canaux protéiques tels que les canaux TRPV (TRPV1, TRPV2 et TRPV4), le canal NALCN a été décrit comme étant impliqué dans l'osmorégulation (Sinke & Deen, 2011). Une cartographie associée aux haplotypes sur des souches de souris avec différentes concentrations sériques de sodium a été générée afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la pathologie et la physiologie de l'osmorégulation (Kho *et al*, 2020; Sinke & Deen, 2011).

Il existe des preuves provenant de nématodes (*C. elegans*), de mouches (*Drosophila*) et de mammifères, qui montrent que les canaux NALCN contribuent aux courants de stimulation cardiaque conduisant à une activité rythmique (Pierce-Shimomura *et al*, 2008; Jospin *et al*, 2007; Kasap *et al*, 2017; Yeh *et al*, 2008; Xie *et al*, 2013; Kasap *et al*, 2020; Gao *et al*, 2015; Bonnett *et al*, 2014). Il participe également dans le contrôle de l'horloge circadienne (Ghezzi

et al, 2014; Lear *et al*, 2013; Nash *et al*, 2002; Flourakis *et al*, 2015; Moose *et al*, 2017) et la respiration (Shi *et al*, 2016; Lu *et al*, 2007). Il est également impliqué dans la contraction des muscles gastro-intestinaux en contrôlant l'activité pacemaker par les cellules interstitielles de Cajal (CIC). Ces cellules stimulatrices des muscles gastro-intestinaux, génèrent d'une manière dépendante de SRC les oscillations rythmiques du potentiel membranaire appelées ondes lentes (Kim *et al*, 2012).

Une mutation ponctuelle induisant une perte de fonction chez l'homologue murin du gène *unc-79*, allèle nommé *Lightweight* (Specia *et al*, 2010), induit chez les hétérozygotes une altération de la consommation alimentaire. Ici ce n'est pas directement NALCN qui est impliqué, mais bien une protéine partenaire formant le canalosome impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire. En effet, la longueur et le poids de ces souris hétérozygotes étaient légèrement inférieurs à ceux des souris de type sauvage. Les souris présentant cette mutation ont une plus grande proportion de masse maigre et une plus petite proportion de graisse corporelle par rapport aux témoins (Specia *et al*, 2010) bien que celles-ci consommaient plus de nourriture par rapport aux animaux de type sauvage de même poids.

Rôle pathologique

Par le nombre important de fonctions physiologiques du canalosome NALCN, il est logique de le retrouver impliqué dans de nombreuses pathologies lorsque celui-ci est dérégulé ou muté. Des mutations des gènes NALCN et UNC-80 ont été décrites dans des troubles neurodéveloppementaux sévères. Des mutations héréditaires et récessives des gènes NALCN et UNC-80 se sont avérées entraîner une hypotonie infantile, un retard psychomoteur et un faciès caractéristique (Bourque *et al*, 2018; Al-Sayed *et al*, 2013; Angius *et al*, 2018; Bouasse *et al*, 2019; Ope *et al*, 2020). D'autres mutations du gène NALCN ont également été décrites comme entraînant des contractures des membres et du visage, une hypotonie musculaire et un retard global de développement (Aoyagi *et al*, 2015; Angius *et al*, 2019; Bramswig *et al*, 2018; Chong *et al*, 2015). Au-delà des mutations trouvées dans les troubles neurodéveloppementaux sévères, le canalosome NALCN a été suggéré comme potentiellement impliqué dans d'autres maladies. Parmi ces maladies, on retrouve notamment la maladie d'Alzheimer (Perez *et al*, 2016; Prokopenko *et al*, 2020, 2021), la schizophrénie et les troubles bipolaires (Askland *et al*, 2009; Baum *et al*, 2008; Zhang *et al*, 2018; Wang *et al*, 2010a), ou encore l'autisme (Krupp *et al*, 2017; Zhang *et al*, 2020b). Outre ces pathologies qui sont plutôt associées à des modifications neuronales, nous retrouvons

également des pathologies cardiaques comme l'hypertension (Kho *et al*, 2020; Adeyemo *et al*, 2009), ou encore le cancer (Huang *et al*, 2022; Rahrman *et al*, 2022).

Le canalosome NALCN et le cancer

Des études génétiques chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé ont suggéré un lien entre le canal NALCN et ce type de cancer (Lee *et al*, 2013). Le génotypage réalisé chez 348 patients atteints d'un cancer du poumon non à petite cellule avancé ayant reçu une chimiothérapie, a révélé que le gène NALCN, étaient associées à cette pathologie (Lee *et al*, 2013). Au vu de l'expression importante de NALCN dans les neurones, il n'est pas étonnant de retrouver des cancers cérébraux associés à une dérégulation de ce canalosome. En 2012, dans le glioblastome, une analyse des altérations du nombre de copies d'ADN et de l'expression des gènes basées sur les régions génomiques clés du glioblastome, met en évidence une régulation négative de l'expression génique et une perte du nombre de copies des régions NALCN et NLF-1 dans un état cancéreux (Fontanillo *et al*, 2012). Une autre étude a également associé le canalosome NALCN avec le neuroblastome. Un séquençage génomique a été réalisé dans une cohorte italienne de patients présentant un neuroblastome au stade métastatique avec une courte survie comparé à ceux avec une longue survie (Esposito *et al*, 2018). Les résultats ont révélé spécifiquement chez les patients avec une courte survie des mutations somatiques comprises dans six réseaux d'interactions (31 gènes fonctionnellement connectés), dont NALCN et UNC79 retrouvés chez des patients avec une survie courte (Esposito *et al*, 2018; Lasorsa *et al*, 2022). Récemment, une analyse pondérée du réseau de co-expression génique a révélé que NALCN était l'un des gènes clés qui étaient significativement liés à l'avancement, au pronostic et à la survie dans le gliome (Zhang *et al*, 2020b, 2020a).

Chez 2 patients atteints d'un carcinome hépatocellulaire de stade précoce lié au virus de l'hépatite B, deux variants de la protéine UNC-79 ont été trouvés (Zhan *et al*, 2017). Toujours dans le carcinome hépatocellulaire, une étude montre la régulation de l'expression génique via les microARNs et un mécanisme de méthylation de l'ADN dans une lignée cellulaire L02 d'hépatocytes humains (Chen *et al*, 2018a). Les analyses ont mis en évidence un changement significatif des ARNm et des microARN de plusieurs gènes, dont celui de NALCN. Par le biais d'une PCR spécifique à la méthylation (qui amplifie spécifiquement des gènes d'intérêt méthylés ou non méthylés), ils ont prouvé que le niveau de méthylation était régulé négativement pour le gène NALCN (Chen *et al*, 2018a) ce qui pourrait expliquer l'expression anormale de NALCN dans cette pathologie. Nous retrouvons également des implications de ce canalosome dans le contexte de l'ACCP. Un séquençage génomique a été réalisé dans le

cadre de l'Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative, comprenant 142 patients atteints d'un ACCP primaire opérables et non traités qui ont subi une pancréatectomie à visée curative aux stades cliniques préopératoires I et II. L'analyse de 99 tumeurs a identifié une hétérogénéité substantielle avec 2 016 mutations non silencieuses et 1 628 variations du nombre de copies de gènes. Parmi les 16 gènes mutés de façon significative, nous retrouvons le gène NALCN (Biankin *et al*, 2012; Kleeff *et al*, 2016).

De façon similaire dans le carcinome rénal, l'étude des ARNm et des longs ARN non codants par des analyses d'expression génique dans 611 échantillons (539 de carcinome rénal, 72 normaux) a montré qu'un long ARN non codant chevauche la partie 3' du gène NALCN (appelé NALCN-AS1) est associé à une diminution de la survie globale des patients de façon significative (Wang *et al*, 2018). Ce même long ARN non codant est également retrouvé dans le cancer de la prostate. L'analyse des profils d'ARN de 499 tissus cancéreux de la prostate et de 52 tissus cancéreux non prostatiques révèle que NALCN-AS1 est associée également à une diminution de la survie globale dans le cancer de la prostate (Xu *et al*, 2018).

Cette association à l'avancement et aux stades du cancer dans les gliomes est également en corrélation avec les données préliminaires obtenues au sein du laboratoire qui montrent la présence de ce canal NALCN associée au stade tardif du cancer de la prostate.

V. Problématique de recherche

Est-ce que moduler l'activité des acteurs régulant l'homéostasie calcique et sodique peut contrecarrer l'adaptation tumorale avec son environnement, ralentir, voire empêcher, l'évolution vers des stades métastatiques ?

Cette problématique de recherche se découpe en deux grandes parties. La première partie, en utilisant les différents modèles du cancer de la prostate *in vitro* et *in vivo*, portera sur l'étude du rôle du canal sodique NALCN dans l'invasion des cellules cancéreuses et le développement des métastases. La deuxième partie portera sur la communication des cellules cancéreuses avec leur micro-environnement en utilisant les modèles du cancer du pancréas par une approche d'exploration large, notamment RNAseq. Si la première partie cible un acteur spécifique déjà identifié (le canal NALCN) et étudie les mécanismes moléculaires de la signalisation induisant l'invasion des cellules cancéreuses, la deuxième partie explore de nouveaux acteurs intervenant dans la régulation des cellules cancéreuses par leur micro-environnement.

Objectifs spécifiques de thèse :

- Découvrir les mécanismes moléculaires par lesquels NALCN participe à l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques.
- Identifier les acteurs du dialogue entre les signalisations sodiques et calciques et leurs rôles respectifs dans l'invasion et la sécrétion des enzymes protéolytiques.
- Développer un modèle d'adénocarcinome canalaire pancréatique et son environnement *in vitro*.
- Effectuer le screening génique sur ce modèle afin de déterminer des acteurs (et notamment les canaux ioniques) impliqués dans les effets synergiques de la rigidité cellulaire et du micro-environnement stromal sur le développement des phénotypes cellulaires responsables de la progression du cancer pancréatique.



Matériels et méthodes



Lignées cellulaires et culture

Les lignées cancéreuses prostatiques sont issues d'une même lignée cellulaire PC-3 androgéno-indépendante qui sont issues de métastases osseuses chez un patient de 62 ans atteint d'un adénocarcinome prostatique de stade 4.

Nom	Caractéristiques	Sélection
PC-3	Cancer de la prostate androgéno-indépendant	Non Concerné
PC-3-luc	PC-3 exprimant la luciférase pour le suivi in vivo	G418
PC-3-luc+hNALCN	PC-3-luc surexprimant NALCN de façon stable	G418/Blasticidine
PC-3-luc-mCherry	Contrôle de la lignée PC-3-luc+hNALCN	G418/Blasticidine
PC-3-luc-shNALCN	PC-3-luc sous-exprimant NALCN	G418/Puromycine
PC-3-luc-shCTRL	Contrôle de la lignée PC-3-luc-shNALCN	G418/Puromycine
KO-4G5	PC-3-luc n'exprimant pas NALCN	G418
2I19	PC-3-luc n'exprimant pas NALCN	G418
5J5	PC-3-luc n'exprimant pas NALCN	G418

Les lignées cellulaires utilisées pour les expérimentations en relation avec le pancréas sont de différentes origines : des lignées cellulaires cancéreuses de type PANC1 et Capan-1 et également une lignée cellulaire stromale (cellules stellaires) de type PS-1 issu d'un patient sain.

Les cellules PS-1 ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Hemant Kocher (Queen Mary University of London). Les cellules PANC1 sont issues d'un patient de 56 ans atteint d'un adénocarcinome canalaire pancréatique, les cellules Capan-1 sont issues d'un patient de 40 ans atteint d'un adénocarcinome canalaire pancréatique.

Nom	Caractéristiques	Sélection
PS-1	Cellule stellaire issu d'un patient sain	Non concerné
PANC1	Lignée cancéreuse pancréatique, mutée KRAS CDKN2A TP53	Non concerné
Capan-1	Lignée cancéreuse pancréatique, mutée KRAS MAP2K4 SMAD4 TP53 BRCA2 FZD10 GLT6D1 GRM1 SMAP2	Non concerné
PS-1-GFP	PS-1 exprimant la GFP par induction Doxocycline	Blasticidine
Panc-1-dsRed	Panc-1 exprimant dsRed par induction Doxocycline	Blasticidine

Capan-1-dsRed	Capan-1 exprimant dsRed par induction Doxocycline	Blasticidine
---------------	---	--------------

Les lignées cellulaires prostatiques sont cultivées dans du milieu de type RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), et 2mM de L-Glutamine.

Les lignées pancréatiques, y compris la lignée de cellules stromales, sont cultivées dans du milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF superior, 1mM de sodium pyruvate, et 2mM de L-Glutamine.

La culture de ces cellules se fait dans un incubateur à 37°C et 5% de CO₂.

Transfection

Il s'agit d'un processus permettant d'insérer du matériel génétique étranger afin d'exprimer dans une cellule une séquence nucléotidique d'intérêt de manière non naturelle. Les ARN ou les ADN sont transfectés par lipofection, utilisant un kit HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) pour les siRNA, et le kit X-tremeGeneHP DNA Transfection Reagents (Roche) pour les plasmides.

siRNA	Séquence	Origine
siLuc	5'- CUUACGCUGAGUACUUCGA -3'	Kondratska et al., 2014
Pool siNALCN	5'- GGUGAAGACUGGAACAAGAUU -3' 5'- GGAACAAGAUUAUGCAUGAC -3' 5'- AAUGUAUGACAUAACCCAGCA -3'	Dr lamshanova Oksana Dr lamshanova Oksana Swayne et al., 2009
siNCLX	5'- AACGGCCACUCAACUGUCU -3'	Ben-Kasus Nissim et al., 2017

Plasmide	Origine
pcDNA3.1-GFP	Addgene
pcDNA3.1-NALCN	Dr Monteil Arnaud
pcDNA	Addgene
pcDNA4-AR	Dr Bokhobza Alexandre

Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire, a été testée par le biais de méthode colorimétrique telle que la Sulforhodamine B qui colore les protéines ou encore par l'utilisation de test MTS qui cible

l'activité mitochondriale. Nous avons également procédé aux comptages cellulaires sur les photos obtenues des puits de culture lors de l'utilisation du CD7 (Cell Discover 7)

Extraction d'ARN et retrotranscription

Les ARNm sont extraits à partir d'un lysat cellulaire grâce au kit Nucleospin RNA Plus Kit (Macherey-Nagel) suivant les préconisations du fournisseur. La quantité d'ARN extrait est mesurée par un spectrophotomètre (Eppendorf).

Les ARN extraits sont rétrotranscrits en ADNc par l'utilisation d'une rétrotranscriptase (M-MLV RT).

RT-PCR et qRT-PCR

100ng d'ADNc sont utilisés pour une RT-PCR et 25ng d'ADNc pour une qRT-PCR.

Des amorces différentes sont utilisées pour la RT-PCR et qRT-PCR

Amorces rt-PCR	Séquences	Référence
GAPDH	FW-5'-ACCCACTCCTCCACCTTTG-3' RV-5'-CTCTTGTGCTCTTGCTGGG-3'	Borowiec et al., 2013
TBP	FW-5'-CTTGACCTAAAGACCATTGCACTTC-3' RV-5'-AACTTCACATCACAGCTCC-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169
NALCN	FW-5'-GCAAAGCAGAAGAAACCGATAC-3' RV-5'-AACTTAAAAGCTGGTCCTCCTC-3'	Dr Arnaud Monteil
UNC80	FW-5'-CTGAGGAAGGCACTCAGTGGTC-3' RV-5'-GTTTATGCAGGAGTCTGTGAGGC-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169
UNC79	FW-5'-TATGGTTCTTAGTGAGCCTCTGCAC-3' RV-5'-CAATAGTCCTTCCTCCTGGGTGTC-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169

Amorces qrt-PCR	Séquences	Référence
GAPDH	FW-5'-ACCCACTCCTCCACCTTTG-3' RV-5'-CTCTTGTGCTCTTGCTGGG-3'	Borowiec et al., 2013
TBP	FW-5'-CTTGACCTAAAGACCATTGCACTTC-3' RV-5'-GTTCTTCACTCTTGCTCCTGTG-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169

Actine	FW-5'-ATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3' RV-5'-CACCTTCTACAATGAGCTGCGT-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169
HPRT1	FW-5'-AGTTCTGTGGCCATCTGCTT-3' RV-5'-CAATCCGCCCAAAGGGAAGT-3'	(Radoslavova <i>et al</i> , 2021)
NALCN	FW-5'-CACAGGTGAAGACTGGAACAAGA-3' RV-5'-CCACAGTCTGTTGCCAGTATGTA-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169
UNC80	FW-5'-GTCAAGGAAGTGCATCTCAGATC-3' RV-5'-GTTTATGCAGGAGTCTGTGAGGC-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169
UNC79	FW-5'-GCATCTCGAAGGGTGAGTG-3' RV-5'-CAATAGTCCTTCTCTGGGTGTC-3'	https://doi.org/10.1101/2020.08.13.249169
NCLX	FW-5'- CGAGGCCACCGGAGC-3 RV-5'- CACAAAGCACACTCAGTGCC-3'	Antoine Folcher

Immunodétection

Plus communément appelé Western-Blot, processus de SDS-PAGE en condition dénaturante. Lyse cellulaire par le tampon RIPA, et centrifugation pour éliminer les noyaux cellulaires. Les protéines en suspension sont dosées par spectrophotométrie utilisant le kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific), puis 30µg de protéine sont déposés dans un gel d'acrylamide/bisacrylamide, dans un tampon de migration afin de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. Ces protéines sont alors transférées sur une membrane de PVDF ou nitrocellulose avant d'être exposées aux anticorps d'intérêt.

Anticorps primaire	Concentration	Anticorps secondaire	Origine
Calnexin (MAB3126, C8.B6)	1:1000	anti-souris	Merck Millipore
Cortactin (sc-55578)	1:100	anti-souris	Santa-Cruz
Dynamin-1/2 (MABT188)	0.5 µg/ml	anti-souris	Merck Millipore
E-Cadherin (sc-21791)	1:200	anti-souris	Santa-Cruz
Integrin- β1	1:200	anti-lapin	Santa-Cruz

(sc-8979)			
MT1-MMP (sc-377097)	1:100	anti-lapin	Santa-Cruz
N-Cadherine (sc-59987)	1:200	anti-souris	Santa-Cruz
NALCN	1:1000	anti-lapin	Eurogentec (produit à la demande)
p-Src-Y418 (ab40660)	1:1000	anti-lapin	Abcam
p-Src-Y530 (sc-166860)	1:100	anti-souris	Santa-Cruz
Src-total (ab109381)	1:1000	anti-lapin	Abcam
Tks5 (sc-736241)	1:100	anti-souris	Santa-Cruz
β -actin (A5441, AC-15)	1:1000	anti-souris	Sigma
NCLX	1 : 500	anti-lapin	Sigma
NALCN	1 : 1000	anti-lapin	Biotem (produit à la demande)

Biotinylation

Utilisation de l'EZ-Link™ NHS LC-LC Biotin (Thermo Fisher Scientific) afin de marquer la surface membranaire. Lyse cellulaire et incubation avec de la Streptavidine fixée sur des billes magnétiques (Dynabeads™ MyOne™ Streptavidin C1) afin de séparer la fraction contenant la surface membranaire fixée sur les billes. Chaque fraction obtenue est alors déposée sur gel de polyacrylamide afin de réaliser une immunodétection.

Immunofluorescence

Les échantillons sont cultivés sur des lamelles en verre puis fixés avec 2% de paraformaldéhyde (PAF), avant d'être perméabilisés ou non avec de la saponine. Les anticorps primaires sont incubés toute la nuit à 4°C, après lavage, l'anticorps secondaire (de type

AlexaFluor) fixé à un fluorochrome est incubé pendant une heure avant de procéder au lavage puis aux marquages des noyaux avec du DAPI. Les lames sont observées au microscope confocal LSM 700 lasers (Zeiss)

Migration et invasion en chambre de Boyden

La migration et l'invasion cellulaire se basent sur le même outil l'insert Transwell® (Corning™). Pour l'invasion cet insert est recouvert d'une couche de matrigel dilué dans du RPMI sans sérum afin d'obliger les cellules à dégrader afin de pouvoir migrer et donc envahir. 75×10^3 cellules sont déposées sur la partie haute de l'insert et après 16h00, les cellules sont fixées par du méthanol froid. Les cellules sont ensuite colorées par une solution de 1% crystal-violet dans 25% de méthanol. La partie supérieure de l'insert est nettoyée des cellules restantes afin de visualiser uniquement les cellules qui ont traversé l'insert, qui sont ensuite comptées manuellement.

Patch-clamp

Les enregistrements en voltage-clamp sont réalisés en configuration patch perforé en utilisant de la gramicidine afin de perforer la membrane sans la rompre. Le poste de patch-clamp composé d'un microscope inversé (NIKON Diaphot 200), d'un amplificateur (Axopatch 200B, Axon/Molecular Devices), un micromanipulateur motorisé (MP-225 Sutter Instrument Company) qui permet le mouvement de la pipette. Les données analogiques provenant de l'amplificateur sont numérisé par un Digidata® 1440A digitizer. Les expérimentations ont été réalisées et enregistrées à l'aide du logiciel Clampex (Axon Instruments, Molecular Devices). Les pipettes sont fabriquées à partir de Borosilicate étiré et microforgé de façon à obtenir une résistance comprise entre 2-4MΩ.

Les solutions intrapipettes sont composées (en mM) de 150 KCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES ; pH ajusté à 7.3 avec KOH. Afin d'obtenir du Patch perforé est ajouté à cette solution et préparé à chaque nouvelle pipette 100µg/mL de gramicidine. La solution de bain de base est quant à elle composée (en mM) : 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 glucose et 10 HEPES; pH ajusté à 7.3 avec NaOH.

Imagerie calcique et sodique

La concentration calcique cytosolique est mesurée par l'utilisation d'une sonde fluorescente ratiométrique Fura-2-AM (Interchim), alors que la concentration sodique intracellulaire est mesurée par la sonde SBFI-AM (Interchim) selon le protocole (Iamshanova *et al*, 2016).

Les acquisitions sont réalisées avec un microscope inversé Superfluor Nikon Eclipse Ti (objectif 20X) couplé à une caméra Rolera EM-C2 (Qimaging) et du logiciel Metafluor 7.7.5.0.

Les solutions utilisées pour l'imagerie sont composées de la façon suivante : (1) Hank's Balanced salt solution (HBSS) – NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, D-Glucose 10, HEPES 10; pH 7.4 avec du NaOH; (2) solution sans sodium – choline chloride 150, MgCl₂ 1, KCl 5, CaCl₂ 2, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 avec du KOH; (3) solution sans calcium – EGTA-NMDG 5, NaCl 150, MgCl₂ 3, KCl 5, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 avec du NaOH; (4) Haute concentration en calcium (uniquement pour la partie concernant NALCN) – NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 8, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 avec du NaOH ; (5) Solution de calcium extracellulaire – NaCl 150, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, KCl 5, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 avec du NaOH.

Préparation des matrices de différentes rigidités

Les matrices sont préparées au fur et à mesure de la nécessité des expérimentations suivant une adaptation du protocole (Tseng *et al*, 2011; Mandal *et al*, 2014). Les gels d'acrylamide polyacrylamide sont produits selon des concentrations spécifiques afin d'obtenir des rigidités de l'ordre de 1kPa, 8kPa, 16kPa, et 34kPa (Tse & Engler, 2010). Ces gels sont ensuite recouverts de collagène de type 1 d'origine humaine avant d'y cultiver nos cellules.

Acrylamide stock (ml)	40%	Bisacrylamide stock (ml)	2%	Eau (ml)	Rigidité obtenu (kPa)
1,25		0,15		8,6	1
1,25		1,125		7,625	8
2,5		0,75		6,75	16
2,5		1,5		6	34

RNAseq

La fluorescence des cellules est induite 3 jours avant de cultiver les cellules sur les matrices de différentes rigidités. Après 48h00 de culture de ces cellules sur les matrices, elles sont alors détachées de leur support en utilisant de la Trypsine puis la suspension cellulaire est passée au trieur de cellules FACS pour les cultures, afin de séparer chaque lignée cellulaire de cette

solution en fonction de la fluorescence émise. Les ARN sont extraits selon la méthode d'extraction d'ARN précédemment décrite, afin d'être envoyée pour séquençage. Les « reads » obtenus ont alors été nettoyés des adaptateurs permettant la création de la librairie Illumina, et des séquences de faible qualité via TRIMMOMATIC. Les séquences nettoyées ont ensuite été alignées sur le génome de référence Humain GRCh38 (Genome Reference Consortium human 38) avant d'être comptées via Featurescount en utilisant le serveur Galaxy (Perteau *et al*, 2016; Faugeroux *et al*, 2020; Batut *et al*, 2021). Le comptage de ces séquences a ensuite été analysé via le programme R suivant les méthodes Deseq2, afin de créer le différentiel d'expression des gènes et statiquement analysé et graphiquement monté en utilisant les librairies tidyverse, airway, ggplot, pHeatmap. La mise en concordance entre l'expression des gènes et la fonction biologique ou le processus physiologique est réalisée via le serveur Toppgene, et les réseaux d'interaction via STRING ou metascape.



Résultats



PARTIE 1 CANCER DE LA PROSTATE

Le canal sodique NALCN est présent dans les cellules cancéreuses prostatiques

Mon travail se base sur des données qui ont été obtenues précédemment au sein du laboratoire, qui montrent que le canal NALCN est exprimé dans les tumeurs prostatiques de patients (Figure 27). En effet, chez ces patients, on retrouve une expression du canal NALCN alors qu'il n'est pas exprimé dans le tissu sain de prostate. De plus, il existe une corrélation positive entre l'expression de ce canal et les grades du cancer. En effet plus le cancer se trouve être à un stade avancé, plus l'expression de NALCN est importante chez les patients.

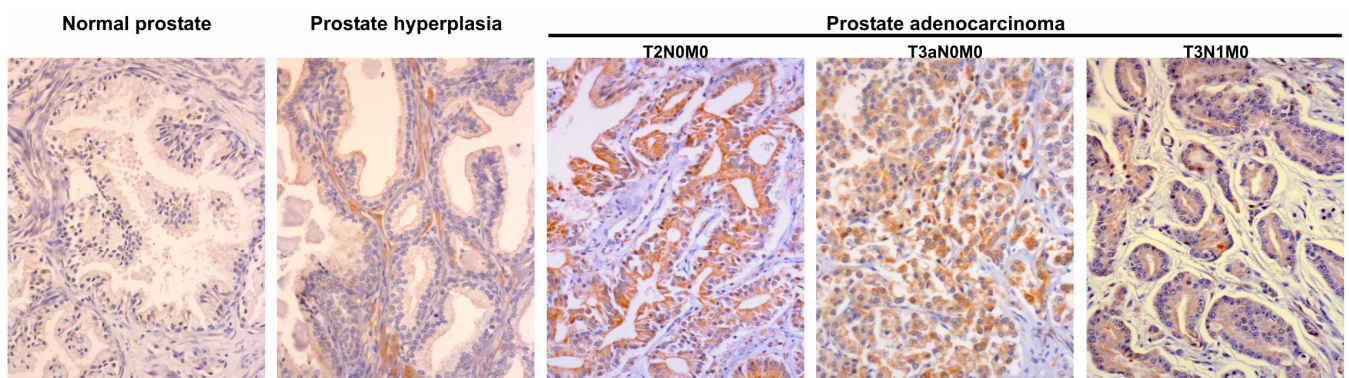


Figure 27 : immunohistochimie sur des coupes tumorales issues de patients
Marquage de coupe de patient avec l'anticorps ciblant NALCN qui montrent une corrélation entre l'expression de ce canal et un état plus avancé du cancer de la prostate.

En se basant sur la théorie que les cellules n'expriment pas de protéines qui leur sont inutiles, la réexpression du canal NALCN dans les cellules cancéreuses prostatiques n'a rien d'anodin. De plus, lorsque le cancer évolue, nous retrouvons également une expression d'autant plus forte du canal NALCN. Cette expression graduelle de NALCN a également pu être mise en évidence sur les lignées cellulaires du cancer de la prostate (Figure 28). Ces expérimentations *in vitro* réalisées montrent que NALCN est exprimé dans certaines lignées cellulaires et plus particulièrement dans les lignées cellulaires qui ont un potentiel invasif important (du-145, PC-3 et PC-3M). De plus parmi ces lignées, seulement deux d'entre elles expriment l'intégralité des protéines partenaires (UNC80, UNC79 et NLF1 formant le canaloosome) qui sont les lignées PC-3 et PC-3M représentant les lignées les plus agressives et androgéno-indépendantes du cancer de la prostate.

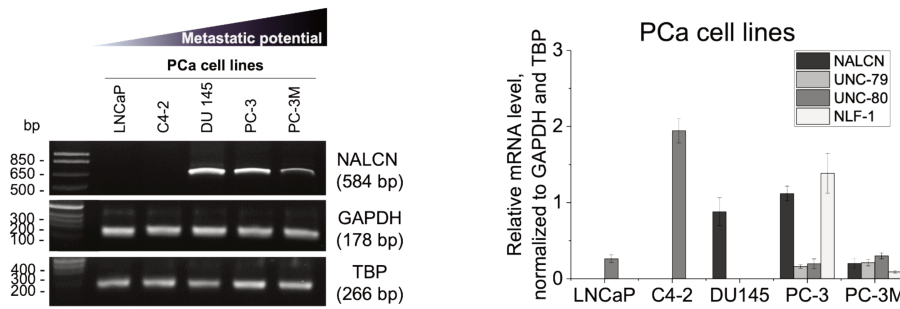


Figure 28 Expression du canal NALCN dans les lignées cellulaires cancéreuses prostatiques

Le canal NALCN n'est exprimé que dans les cellules cancéreuses prostatiques les plus agressives (PCR à gauche). Le canalosome n'est présent que dans les lignées androgéno-indépendantes de type PC-3 et PC-3M (qPCR à droite).

Ces lignées cellulaires, constituent un bon modèle avec la non expression de NALCN dans les lignées androgéno-dépendantes puis une évolution vers les stades androgéno-indépendants avec un intermédiaire étant les DU-145 exprimant NALCN (mais pas les protéines partenaires) jusqu'à l'évolution vers un stade androgéno-indépendant métastatique avec les PC-3 et PC-3M exprimant l'intégralité du canalosome.

Cette expression de ce canal NALCN dans les cellules cancéreuses prostatiques et non pas dans les cellules saines, et corrélé aux différents stades du cancer a naturellement amené à se questionner sur le rôle de ce canal dans l'évolution du cancer de la prostate. Pour y répondre, des expérimentations visant à inactiver cette protéine ont été mises en place *in vitro*.

La régulation négative de NALCN diminue l'invasion cellulaire

Afin de déterminer le rôle de NALCN dans le phénotype invasif de ces lignées cellulaires, des tests d'invasion et de migration ont été réalisés *in vitro*. Le protocole expérimental consiste à inhiber l'expression protéique de NALCN par l'utilisation de siRNA en chambre de Boyden recouvert ou non d'une couche de Matrigel afin de mimer des conditions d'invasion cellulaire ou de migration (Figure 29). Les résultats montrent une diminution de plus de 50% de l'invasion et de la migration cellulaire lors de l'utilisation des siNALCN sur les cellules PC-3. A contrario, les cellules PC-3 transfectées avec un plasmide portant l'ADNc de NALCN montrent une augmentation du potentiel invasif, ce qui se traduit par une migration et une invasion 1,5 fois plus importante.

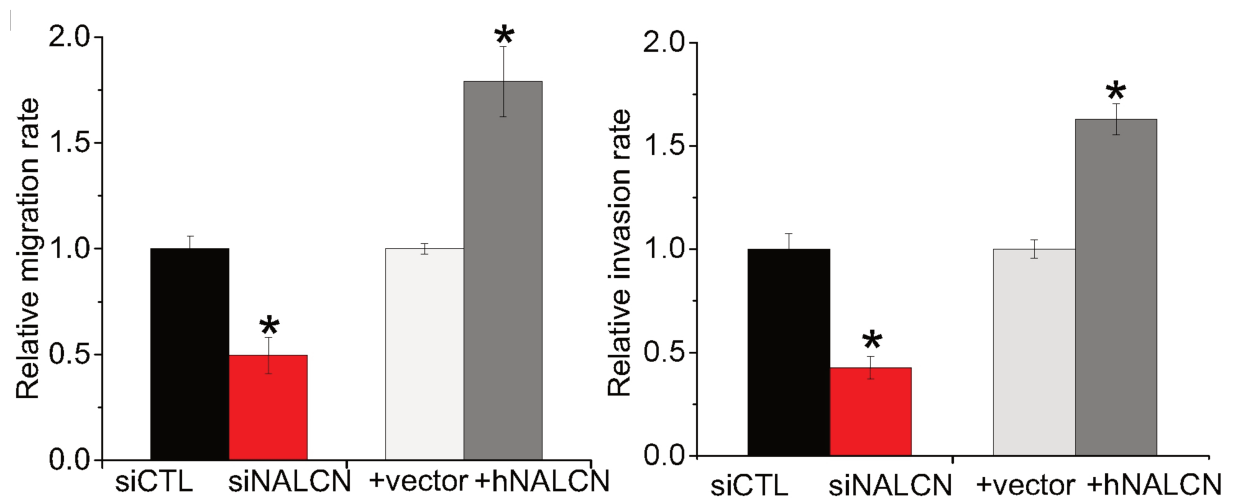


Figure 29 : Rôle de NALCN sur la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*
 L'inhibition de l'expression du canal NALCN par l'utilisation de siRNA contre NALCN est à l'origine d'une diminution de l'invasion et de la migration cellulaire. A contrario, la surexpression transitoire de cette protéine induit une augmentation de la migration et de l'invasion comparativement au contrôle.

Ces premières expérimentations démontrent un rôle important de la protéine NALCN dans le phénotype agressif de ces cellules cancéreuses prostatiques par le contrôle de la migration et de l'invasion. Néanmoins, la présence protéique de NALCN ne signifie pas que ce canal présente une activité dans ces lignées cellulaires. De plus, étant démontré muté avec un gain de fonction dans d'autres cancers (Biankin *et al*, 2012), il est possible que l'augmentation de la présence de NALCN s'accompagne d'une augmentation de l'activité canal, et que ce soit son activité de canal qui participe à la régulation du phénotype agressif de ces cellules.

La régulation négative de NALCN diminue l'entrée sodique intracellulaire

Nous savons que le canal NALCN et ses protéines partenaires se trouvent être exprimés dans les cellules cancéreuses prostatiques. Mais est-ce que la présence protéique de tous les acteurs est suffisante pour avoir une activité de ce canal dans ces cellules cancéreuses, ou s'agit-il de la présence d'une protéine mutée non fonctionnelle. Pour répondre à cette question, des expérimentations ont été réalisées par imagerie sodique, utilisant une sonde fluorescente ratiométrique, le SBFI-AM. Ces expérimentations d'imagerie sodique

démontrent que dans les cellules de type PC-3 (qui expriment le canal NALCN de façon endogène ainsi que toutes les protéines partenaires) il existe une entrée sodique. Cependant, d'autres protéines que NALCN peuvent être une source d'entrée sodique cellulaire. C'est pourquoi il a été utilisé un siRNA contre le canal NALCN afin de prouver qu'une proportion de l'entrée sodique observée dans ces cellules était due à NALCN (Figure 30). Le canal NALCN étant un canal de fuite sodique donc théoriquement constitutivement actif, cela nécessite un protocole permettant un changement de la concentration extracellulaire en sodium passant de 0mM de sodium extracellulaire à 140mM de sodium extracellulaire. De façon surprenante, l'utilisation de siRNA contre NALCN sur ces cellules en imagerie montrent une très forte diminution de la densité de sodium entrant (divisé par 6).

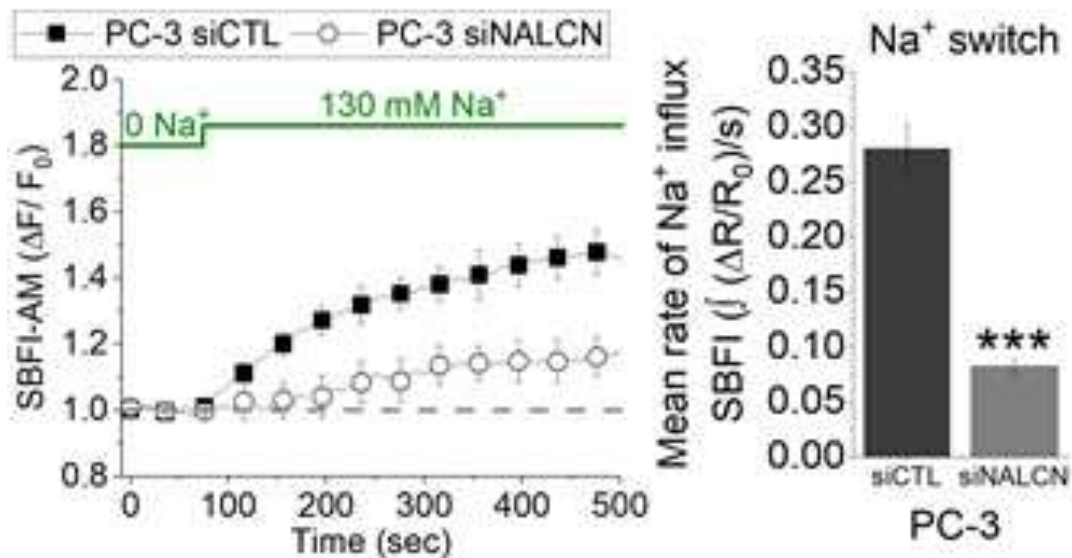


Figure 30 : L'entrée sodique dans les cellules de type PC-3 est due en partie à l'activité du canal NALCN
 Mesure de l'entrée sodique induite par NALCN dans les cellules cancéreuses prostatiques de type PC-3 par imagerie sodique utilisant une sonde ratiométrique de type SBFi-AM

L'inhibition de l'expression de NALCN est suffisante pour permettre une inhibition de l'entrée sodique de l'ordre de 75%, donc la majorité du sodium entrant dans ces cellules. La diminution de la migration et l'invasion cellulaire pourraient donc être liées à l'activité du canalosome NALCN. Cependant, ces processus d'invasion et de migration ont déjà été associés dans ces cellules à l'activité des canaux calciques, et plus particulièrement à l'activité des canaux SOCs. Ce SOCE peut être activé lors de la stimulation cellulaire par le SVF, ce qui induit une forte

entrée de calcium cytosolique à l'origine d'oscillations calciques qui ont été associées à une augmentation de l'invasion cellulaire.

La régulation négative de NALCN diminue les oscillations calciques

L'activation par le SVF permet de stimuler la voie PI3K et ainsi permettre la production de IP3. Cet IP3 produit va alors activer le récepteur à l'IP3 présent à la surface du RE, et ainsi, favoriser la libération du calcium contenu dans le RE. Cette diminution de la concentration calcique intraréticulaire est perçue par la protéine STIM1 qui va se dimériser et s'activer. Ceci se traduit par la translocation du RE vers la membrane plasmique afin de permettre une liaison entre STIM1 et le canal ORAI1 qui est le principal acteur du phénomène SOCE. L'activation du SOCE induit une très forte entrée calcique intracellulaire, ce qui produit alors une réabsorption du calcium cytosolique dans le réticulum endoplasmique grâce à la pompe SERCA notamment. D'autres acteurs sont également impliqués dans la réabsorption du calcium cytosolique afin de contrôler la concentration calcique cytosolique. Nous retrouvons notamment l'implication des organelles comme les mitochondries qui participe via MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) à une réabsorption du calcium, ce qui modifie également l'activité mitochondriale et favorise la production de ROS. Mais également, certaines pompes et échangeurs présents dans la membrane plasmique permettent l'extrusion de calcium du cytosol. L'intervention de tous ces acteurs, crée alors des variations de la concentration calcique, dans le temps et l'espace, et apparaissent des oscillations calciques. Ces oscillations ont été montrées comme à l'origine de la sécrétion de molécule, et plus particulièrement lors de l'invasion cellulaire, dans la sécrétion des matrix métalloprotéases. De façon inattendue, ces oscillations calciques intracellulaires sont abolies lors de l'utilisation d'un siRNA contre NALCN (Figure 31). En effet, les données obtenues montrent que dans le cas de l'inhibition de NALCN dans ces cellules, cela abolit les oscillations calciques à la suite de l'activation par le SVF, mais avec un phénomène SOCE qui est toujours présent.

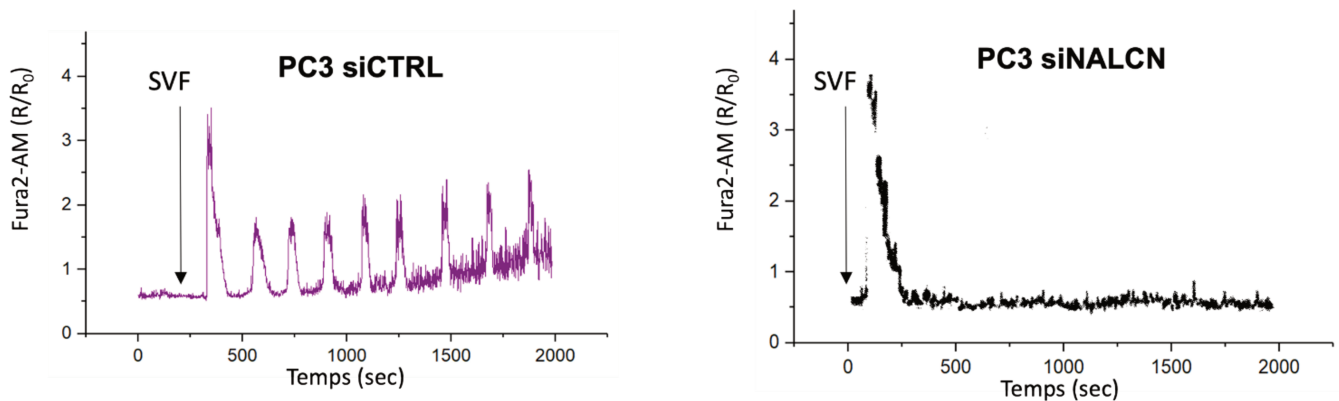


Figure 31 : La présence de NALCN participe au contrôle des oscillations calciques.

L'utilisation de SVf sur des cellules de type PC-3 permet d'induire des oscillations calciques visibles en imagerie calciques par l'utilisation de sonde ratiométrique de type Fura2-AM. L'inhibition de NALCN par siRNA abolit les oscillations induites par la stimulation par le SVF.

L'inhibition de ces oscillations lors de la perte d'expression de NALCN pourrait donc être responsable de la diminution de la migration et de l'invasion cellulaire. NALCN par le biais du contrôle des oscillations calciques intracellulaires, pourrait être un régulateur de l'agressivité cancéreuse notamment en régulant l'activité de sécrétion de MMPs. Cependant l'activité des canaux SOCs, en dehors de l'initiation des oscillations calciques, est aussi impliquée dans la migration cellulaire. C'est pourquoi de plus amples investigations ont été menées sur les liens entre les canaux SOCs et le canal NALCN, par l'utilisation de l'imagerie sodique et l'imagerie calcique en utilisant une sonde ratiométrique de type FURA2-AM. L'entrée SOCE peut être activée artificiellement par le biais de l'utilisation de la TG (Thapsigargin) qui est un bloqueur irréversible de la pompe SERCA. Cette inhibition de la pompe SERCA induit alors le relargage du contenu calcique du RE, qui comme précédemment a pour conséquence l'activation de STIM ce qui induit l'activation des canaux SOCs. Lors de l'utilisation de ce protocole en imagerie sodique, nous pouvons alors remarquer que cette entrée calcique est à l'origine d'une entrée sodique (Figure 32). En effet à une concentration sodique extracellulaire constante de 150mM, l'utilisation du protocole SOCE permet une augmentation de sodium à la suite de l'entrée calcique SOCE.

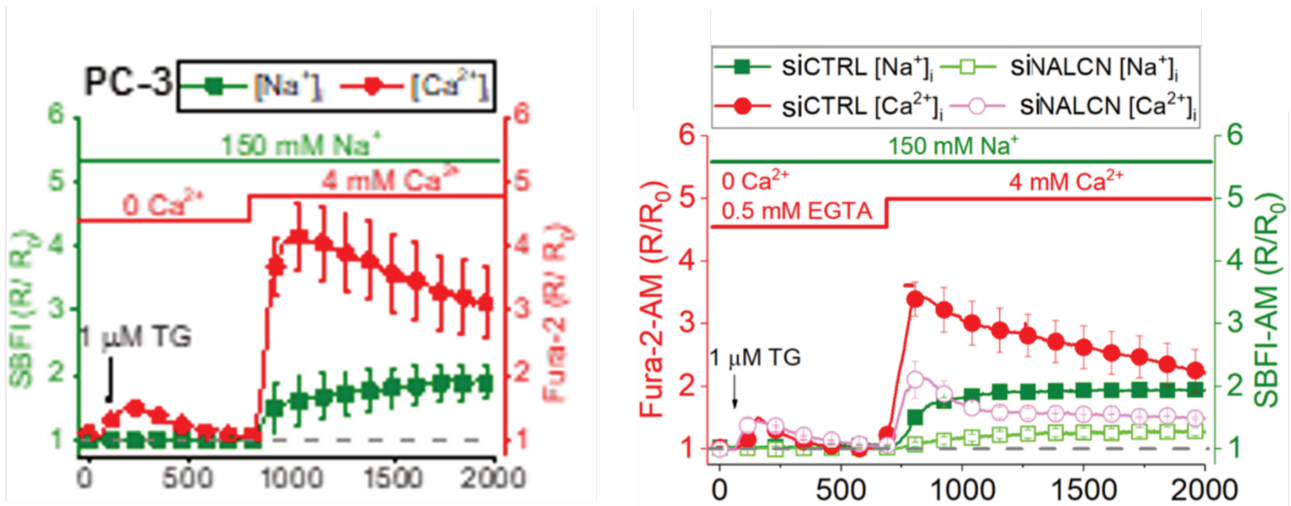


Figure 32 : L'activité de NALCN est régulée par l'homéostasie calcique
L'entrée calcique de type SOCE induit une entrée sodique (graphique à gauche). L'utilisation de lignées shNALCN montre que cette entrée sodique est induite par NALCN, et que la diminution de l'expression de NALCN diminue l'entrée SOCE. Il existe une régulation réciproque de l'homéostasie calcique et sodique par NALCN.

Cette entrée sodique qui est induite à la suite de l'entrée calcique SOCE, est bien due à l'entrée sodique NALCN, puisque lors de l'utilisation de siRNA contre NALCN avec ce même protocole nous pouvons remarquer que l'entrée sodique induite est beaucoup plus faible (Figure 32 panel droit). Donc l'entrée de calcium induite par l'activation des canaux SOCs est responsable d'une entrée sodique via NALCN. Il est également intéressant de noter que l'entrée SOCE semble être, elle aussi diminuée lors de l'utilisation d'un siRNA contre NALCN. Ces résultats semblent montrer l'existence d'une régulation mutuelle entre les flux sodiques et calciques médiée par NALCN et les canaux de type SOCs dans les cellules cancéreuses prostatiques.

NALCN est responsable de courant sodique entrant dans les cellules cancéreuses prostatiques à la suite d'une activation cellulaire par du SVF

Les résultats préliminaires obtenus montrent une entrée sodique induite par NALCN dans les cellules de type PC-3 à la suite d'un ajout de SVF. Ces expérimentations ont été réalisées en imagerie sodique et l'utilisation de siRNA contre NALCN a permis de mettre en évidence que cette entrée sodique dans ces cellules prostatiques est majoritairement due à la présence de NALCN. Afin de mesurer le courant généré par l'entrée de sodium via NALCN dans ces cellules,

il a été décidé de procéder à des expérimentations de patch-clamp (Figure 33). Pour cela, un protocole de patch-clamp perforé a été mis en place par l'utilisation de gramicidine dans la solution intrapipette. Nous avons gardé la même source de stimulation cellulaire, soit l'utilisation de SVF sur des cellules dénutries dans un milieu de bain contenant du sodium ou du NMDG (non perméable) et également lors d'un traitement par un siRNA contre NALCN.

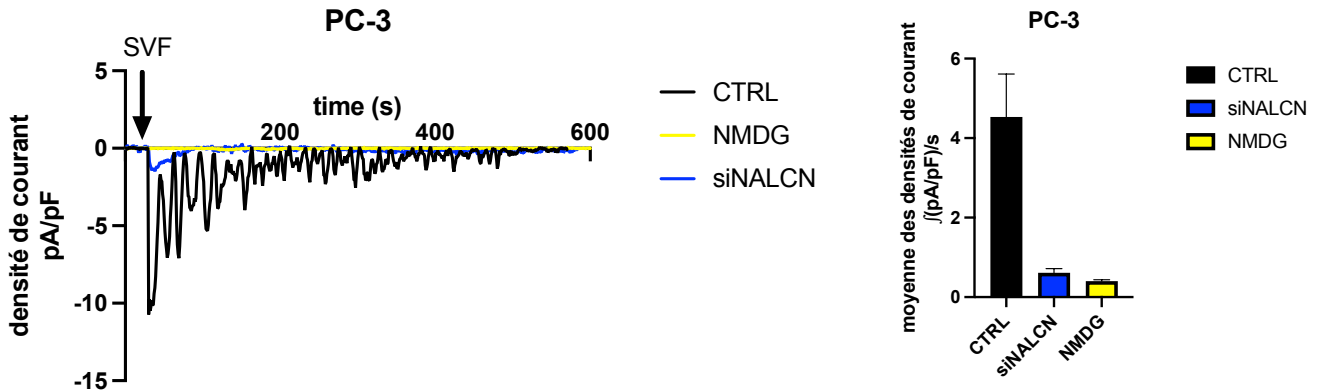


Figure 33 : Mesure de l'entrée sodique induite par NALCN en patch-clamp perforé. L'utilisation de patch-clamp perforé sur les cellules de type PC-3 a permis de quantifier le courant induit par NALCN à la suite d'une stimulation par le SVF. (Gauche) graphes représentatifs de l'entrée sodique induite par NALCN. (Droite) quantification de la densité de courant induite par NALCN à la suite de la stimulation cellulaire par le SVF.

Nous pouvons constater que lors de l'utilisation de NMDG en remplacement du sodium dans la solution de bain, la stimulation par le SVF n'induit pas d'entrées de courant cellulaire contrairement au contrôle. Lors de l'utilisation d'un siRNA dirigé contre NALCN, le courant sodique mesuré est presque inexistant, mais une petite partie persiste. Ceci semble confirmer que la quasi-totalité du courant sodique généré dans les cellules de type PC-3 est issue de l'activité du canal NALCN. Il est également intéressant de noter que le courant sodique entrant est variable à la suite de cette stimulation par le SVF, et apparaît comme des oscillations de sodium. Afin de confirmer les résultats obtenus par l'utilisation de siRNA montrant que ce courant dans les PC-3 est issu de l'activité de NALCN, nous avons décidé d'utiliser les propriétés pharmacologiques spécifiques, notamment la résistance à la tétrodotoxine (TTX). En effet, l'une des caractéristiques principales de NALCN est d'être résistant à la tétrodotoxine et sensible au gadolinium (inhibiteur non spécifique). Les mêmes expérimentations de patch-clamp perforé sur ces cellules ont été réalisées par l'ajout de SVF en présence ou absence de TTX ou Gd3+ (Figure 34).

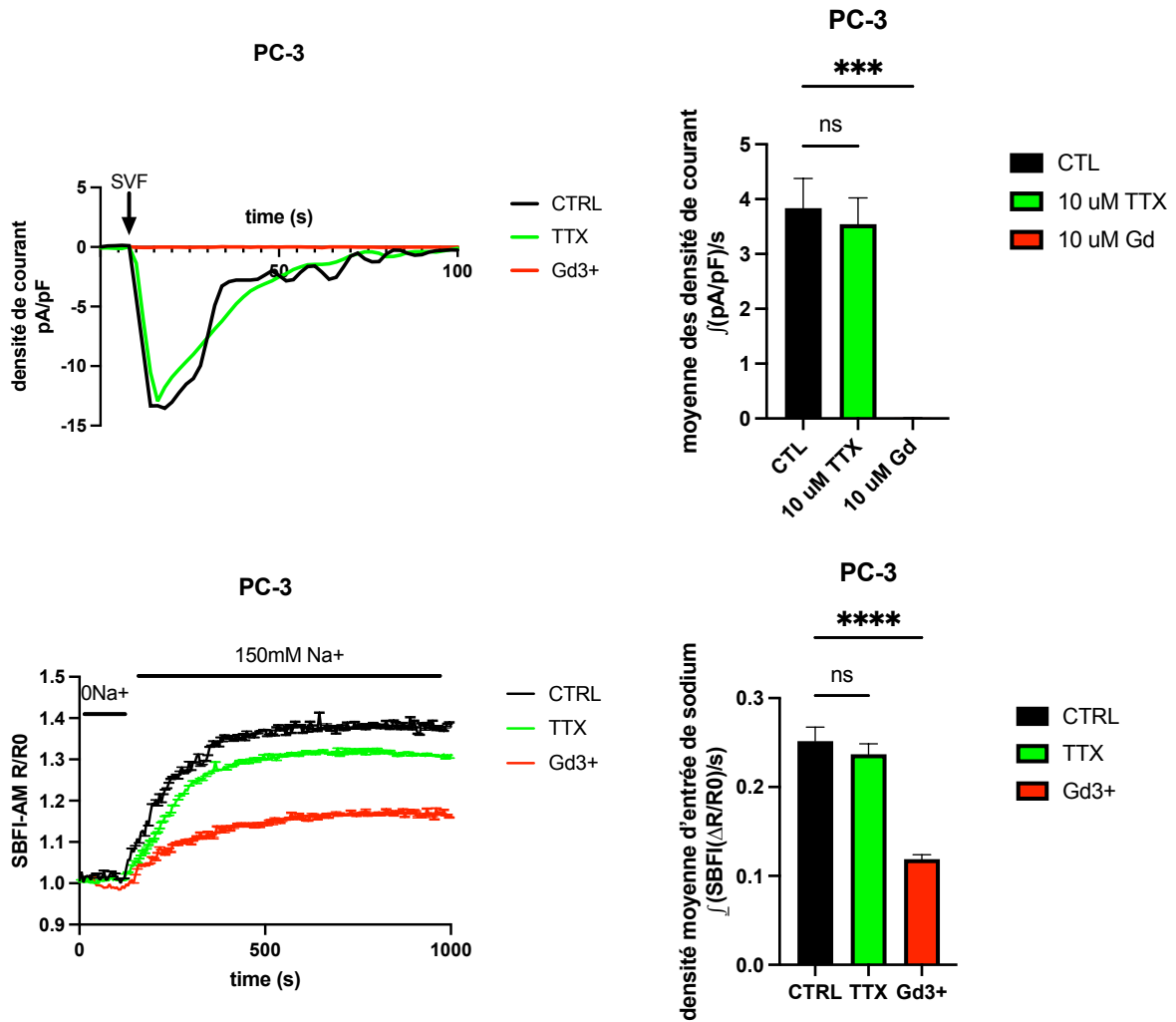


Figure 34 : Le courant induit dans les cellules exprimant NALCN est résistant à la TTX et sensible au gadolinium. La partie haute représente la mesure en patch-clamp perforé de la densité de courant induit à la suite d'une stimulation par le SVF sur des cellules de type PC-3 en présence de TTX et gadolinium. La partie basse représente l'entrée sodique induite lors d'un changement de concentration sodique extracellulaire en imagerie sodique.

Les résultats montrent un courant sodique entrant avec un pic de l'ordre de 12pA/pF à la suite de l'ajout de SVF dans le milieu de bain. Cette entrée sodique correspond à une entrée moyenne d'environ 4pA/pF/s à la suite de l'ajout de SVF dans le milieu. Ces valeurs de courant entrant dans les cellules ne sont pas impactées par l'utilisation de la TTX qui montre des propriétés similaires. En revanche, l'utilisation de gadolinium inhibe complètement ce courant sodique entrant de ces cellules. Le même protocole expérimental a été mis en place sur ces cellules PC-3 en imagerie sodique lors d'une variation de la concentration sodique extracellulaire (Figure 33 partie basse). De façon similaire, l'entrée sodique générée en présence de TTX est identique au contrôle. Il est à noter, que contrairement aux mesures réalisées en patch clamp, il reste une quantité de sodium entrant dans la cellule en présence

de Gd3+. Cette différence est probablement due à l'activation de pompe ou d'échangeur permettant l'entrée de sodium à la suite de la variation en sodium extracellulaire sur un temps plus long. Afin de confirmer que ce courant sodique mesuré en patch-clamp et l'entrée sodique en imagerie sont NALCN-dépendants comme le suggère l'utilisation de siRNA et la réponse spécifique à la TTX, les mêmes expérimentations ont été réalisées sur la lignée cellulaire C4-2 qui n'exprime pas le canal NALCN (Figure 35).

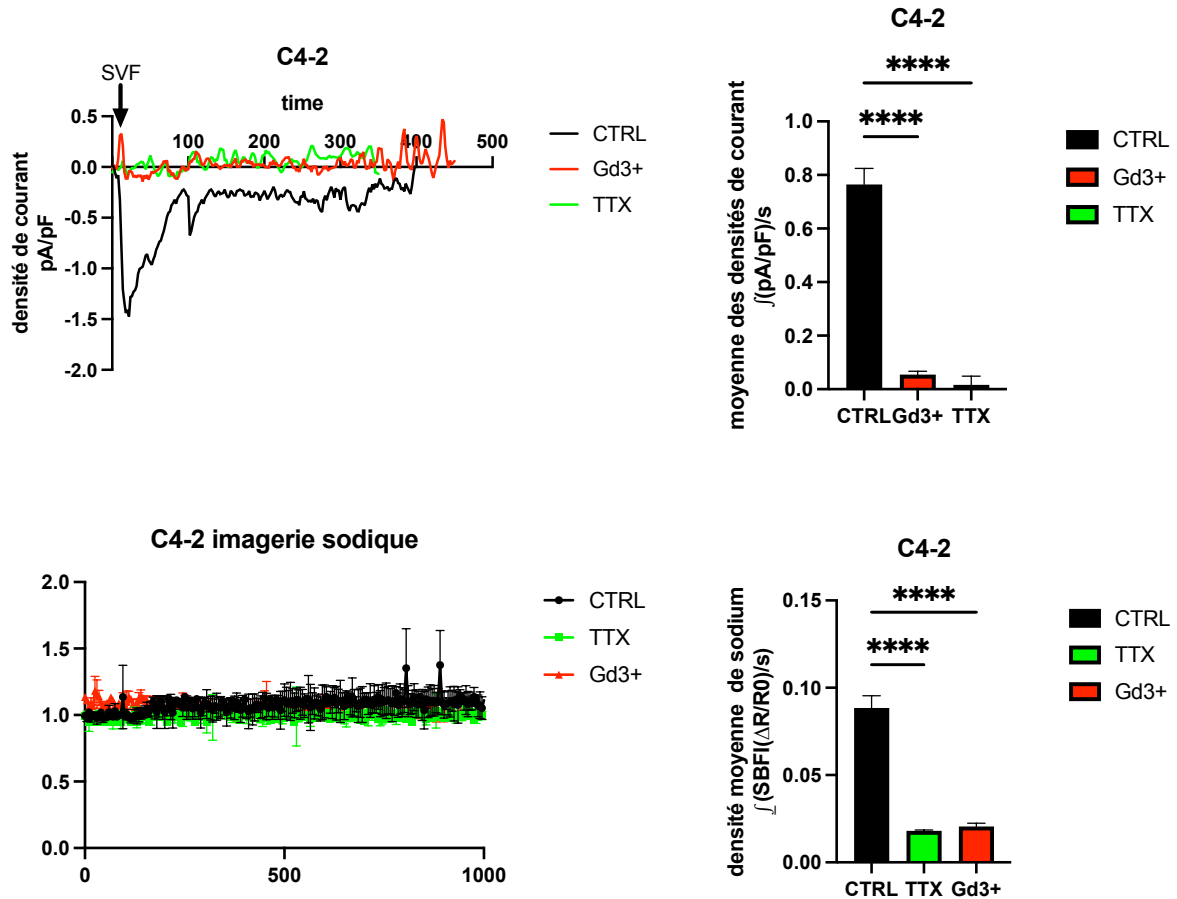


Figure 35 les cellules n'exprimant pas NALCN sont sensibles à la TTX et au gadolinium. Sur la lignée C4-2 n'exprimant pas la protéine NALCN, il demeure un très faible courant sodique qui est inhibé par l'utilisation de la TTX et du gadolinium. Partie haute en patch clamp perforé et la partie basse en imagerie sodique.

Cette lignée cellulaire présente un très faible courant sodique entrant à la suite de la stimulation par le SVF qui est totalement aboli lors de l'utilisation de la TTX et du gadolinium (Figure 35 partie haute). Les résultats obtenus en imagerie sodique sur cette lignée montrent également une très faible entrée sodique qui est totalement inhibée par la TTX. Ces expérimentations confirment l'efficacité de la TTX sur les courants sodiques cellulaires, et

confirmant, de ce fait, que le courant sodique généré est bien dû à l'activité NALCN dans les PC-3. En effet sur cette lignée qui n'exprime pas le canal NALCN (mais d'autres canaux sodiques) ici le courant est inhibé par la TTX ce qui n'est pas le cas dans la lignée PC-3. Ici, nous montrons que les autres sources de sodium sont inhibées par la TTX, par conséquent, il est fort probable que le courant sodique mesuré en présence de TTX sur les cellules PC-3 soit issu de l'entrée par NALCN. Cette théorie est soutenue par l'utilisation d'un siRNA contre NALCN qui a pour conséquence de réduire considérablement l'entrée sodique en imagerie et en patch-clamp. Ces résultats associés démontrent que l'entrée sodique induite dans les cellules de type PC-3 résulte de l'activité du canal NALCN dans cette lignée.

Ce canal est connu dans la littérature pour avoir un rôle dans la régulation du potentiel de membranaire dans les neurones (Kim *et al*, 2012; Lu & Feng, 2011; Egan *et al*, 2018; Cochet-Bissuel *et al*, 2014b; Impheng *et al*, 2021). C'est pourquoi nous avons voulu déterminer si cette propriété du canal était également présente dans les cellules cancéreuses prostatiques par la mesure du potentiel membranaire de ces cellules PC-3 à la suite du traitement par siRNA contre NALCN (Figure 36). Nous nous attendions à obtenir une hyperpolarisation de la membrane à la suite du traitement par siRNA, mais paradoxalement nous avons obtenu sur ces cellules une dépolarisation de la membrane.

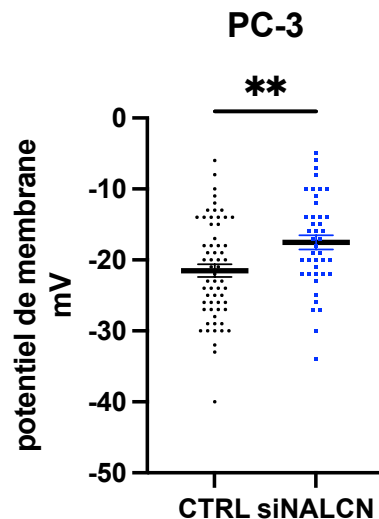


Figure 36 : Mesure du potentiel de membrane sur la lignée PC-3
 Mesure du potentiel de membrane en patch-clamp sur la lignée cellulaire PC-3 lors de l'utilisation d'un siARN contre NALCN et un siCTRL.

Cette situation inattendue pourrait être expliquée par la variation très importante du potentiel membranaire au sein même de chaque population (CTRL et traité siRNA) ce qui

pourrait avoir un effet sur l'analyse de ce potentiel de membrane. En effet, le potentiel membranaire des cellules cancéreuses prostatiques de type PC-3 est peu élevé et présente une forte variabilité, cependant, les tests statistiques montrent une différence significative entre ces deux conditions. Une autre explication pourrait être un impact de ce siRNA sur une autre protéine participant aux potentiels de membrane (bien que cette solution soit peu probable). Cependant, cette dépolarisation de la membrane d'environ 4mV est une question toujours sans réponse actuellement. Si NALCN ne semble pas jouer le même rôle sur le potentiel de membrane des cellules PC-3 que dans les neurones, il participe tout de même à l'entrée sodique de ces cellules. De plus, nous savons que la présence de cette protéine NALCN est corrélée positivement avec l'évolution des stades du cancer de la prostate. Nous savons également que l'utilisation de siRNA contre NALCN conduit à une diminution de l'invasion et la migration cellulaire (déjà réalisée en chambre de Boyden). Il est donc probable que l'activité de NALCN participe au contrôle du phénotype invasif de ces cellules cancéreuses prostatiques. Afin de poursuivre les investigations sur l'activité de NALCN et son effet physiologique, nous avons décidé de produire une lignée KO NALCN, ce qui permettrait de réduire le biais d'expérimentation du fait de l'efficacité partielle du siRNA, et permettrait la réexpression de mutant de NALCN.

NALCN est responsable du phénotype invasif in vitro

Les données préliminaires obtenues montrent l'implication de ce canal dans le phénotype invasif et migratoire des cellules cancéreuses prostatiques PC-3. Afin de pouvoir confirmer l'effet observé lors de la diminution transitoire de l'expression du canal NALCN, nous avons mis en place une méthodologie CRISPR-Cas9 afin d'obtenir un KO-NALCN. Dans le but d'utiliser cette lignée in vivo également, nous avons choisi de créer ce KO sur une lignée de type PC-3-luc (exprimant la luciférase).

Méthodologie CRISPR-Cas9

Par cette méthodologie, nous allons créer une cassure double brins à un endroit précis du génome afin d'induire une réparation NHEJ pour obtenir une non-expression de cette protéine. Étant donné le nombre d'exons de NALCN il a fallu dans un premier temps déterminer la position pour sectionner l'ADN. Plusieurs critères sont entrés en compte, premièrement, la possibilité de trouver des ARNg (ARNguide qui positionne la Cas9 pour la section de l'ADN) qui soient spécifiques dans les premiers exons de cette protéine. Deuxièmement, avoir un moyen rapide de vérifier l'efficacité de la cassure double brin et de

la réparation induite. Le choix s'est porté sur deux lieux de coupure de l'ADN pour générer ces KO. Le premier choix entre l'exon 5 et l'exon 6 et le second lieu entre l'exon 8 et l'exon 9. Le dessin des ARNg permettant de cibler l'ADN dans ces exons a été réalisé en collaboration avec le Dr Bokhobza. Cette position de coupure entre deux exons permettait notamment en cas de cassure doubles brins puis de réparation de l'ADN, de supprimer toute la partie intronique située entre ces deux exons. Cette délétion de toute cette partie intronique plus une partie de l'exon 5 et une partie de l'exon 6, permet d'avoir une diminution de 314 paires de bases à la suite de la coupure et de la réparation par jonction immédiate via le système NHEJ. Concernant la coupure entre l'exon 8 et 9 cela induit une perte de 307 paires de bases. Ceci permettait avec une simple PCR sur l'ADN génomique des clones obtenus de déterminer si la procédure avait bien fonctionné ou non.

Le plasmide codant pour la Cas9 portait également une séquence de la protéine GFP afin de trier les cellules qui avaient bien intégré au moins la Cas9 par FACS. Ce tri via le FACS est une étape essentielle après la transfection afin de permettre une expansion cellulaire issue d'un seul et unique clone qui est remis en culture dans des plaques 96 puits.

Clones d'intérêt obtenus

Via cette méthodologie à la suite du tri par FACS, 960 puits ont été obtenus contenant une seule cellule fluorescente avec pour cible l'exon 5-6 et également 960 puits contenant chacun une cellule dont la cible était l'exon 8-9.

Pour l'exon 5-6 beaucoup de puits ont donné une population cellulaire, ce qui a permis de tester 170 clones, en revanche beaucoup moins concernant l'exon 8-9 avec seulement 11 clones obtenus sur les 960 puits. Un tri de ces populations cellulaires a été effectué à la suite d'une PCR sur l'ADN génomique afin de déterminer s'il y avait eu une modification de l'ADN génomique ou non (voir Annexes 1 et 2). Sur l'intégralité des clones obtenus, seuls 11 présentaient une perte d'ADN sur tous les allèles. En effet, les autres clones présentaient soit une taille d'amplicon similaire au PC-3-Luc, soit présentaient plusieurs tailles d'amplicon dont une avec la taille attendu de 270pb correspondant à la délétion d'environ 300pb, ou encore des tailles supérieures présumant de recombinaisons génétiques. Pour poursuivre le tri de nos clones obtenus, nous avons poursuivi par de l'imagerie sodique afin de mesurer l'influx sodique comparativement au contrôle PC-3-luc (Figure 37). La plupart d'entre eux présentent des modifications quant à l'entrée sodique, et parmi ces clones, seul le clone 4G5 présente une diminution aussi forte, voire plus importante, de l'entrée sodique que lors de l'utilisation des siRNA contre NALCN. Les autres clones présentent une diminution partielle de l'entrée sodique ou alors une augmentation de l'entrée sodique cellulaire comme le clone 5B2.

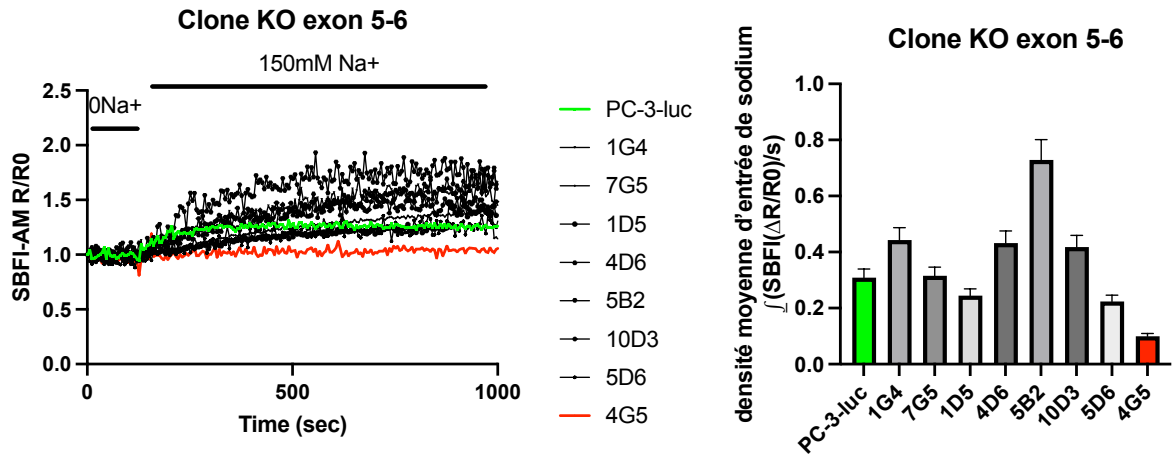


Figure 37 : Mesure de l'entrée sodique sur des clones issus de la méthodologie CRISPR-Cas9 ciblant NALCN

Représentation et quantification de l'entrée sodique induite chez certains clones testés à la suite du CRISPR-Cas9 réalisé entre l'exon 5 et 6

Les clones hétérozygotes présentant un allèle muté et un non muté peuvent présenter des caractéristiques intéressantes comme le clone 1G4 ou encore le clone 5B2 qui présentent une hétérozygotie et également une augmentation de l'entrée sodique comparée au CTRL. Il est donc fort probable que ces clones aient subi une modification de l'ADN lors de la réparation NHEJ qui a conduit à la production d'une protéine NALCN altérée, et il s'agirait donc plutôt de « mutant » NALCN. Ces « mutants » présentent des caractéristiques différentes, mais outre la possibilité d'avoir la présence de NALCN sauvage puisqu'hétérozygotes, certains présentent une entrée sodique plus importante que les PC-3-luc (comme le clone 5B2), il est donc nécessaire de déterminer quelles sont les mutations présentes dans ces clones afin de pouvoir les utiliser. Dans le but de confirmer les précédents résultats sur la fonction de la protéine NALCN dans l'agressivité des cellules cancéreuses prostatiques, et également la possibilité d'exprimer des protéines mutantes connues de NALCN dans ces cellules, il était nécessaire d'obtenir un véritable KO de la protéine NALCN. Nous nous sommes donc focalisés sur le clone 4G5 qui présente les caractéristiques attendues tant sur la PCR que sur l'entrée sodique. Nous avons donc procédé sur ce clone à la restauration de l'entrée sodique par la réexpression transitoire de la protéine NALCN (Figure 38A et B).

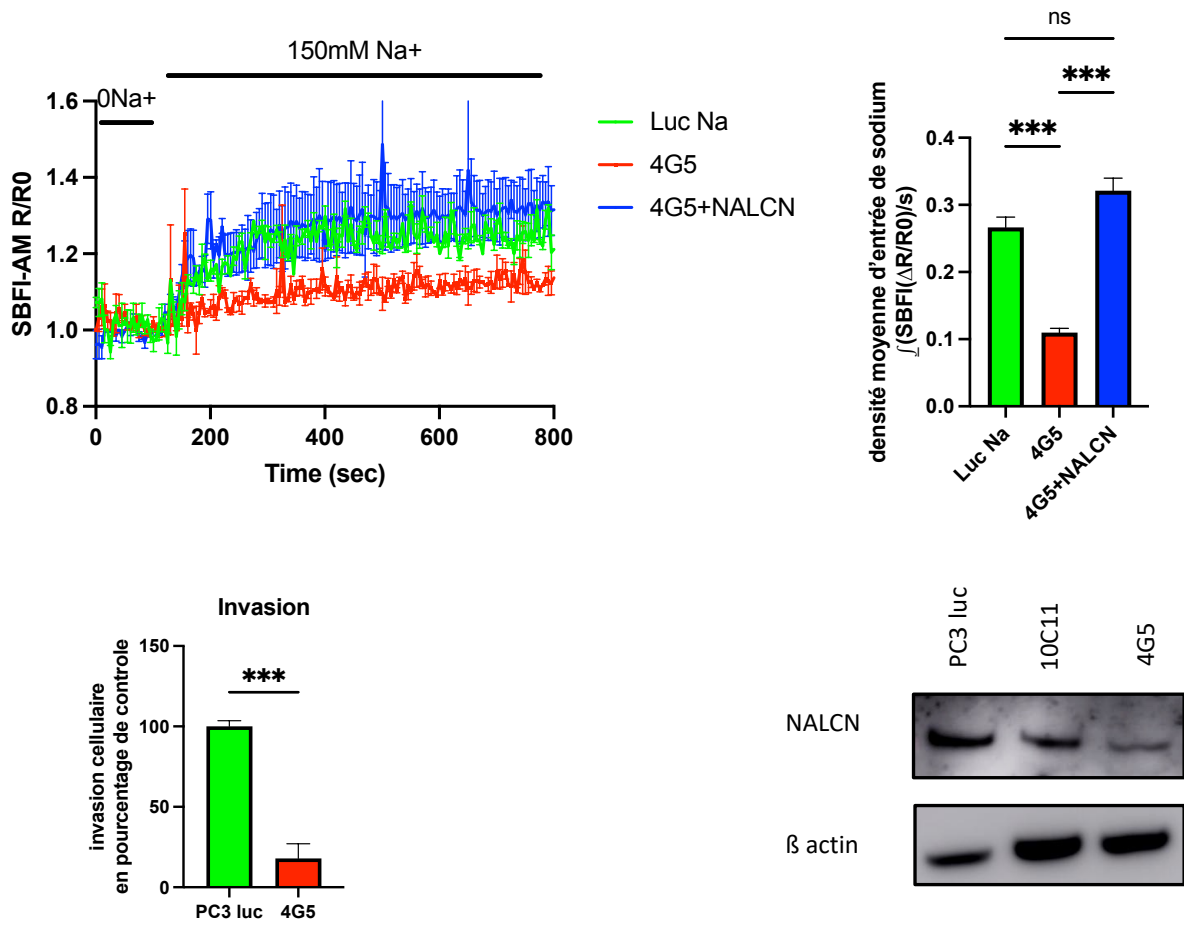


Figure 38 :Propriété du clone KO NALCN sélectionné 4G5

(A) imagerie sodique réalisée sur le clone 4G5 en comparaison de la lignée parentale PC-3 -Luc qui montre une diminution de l'entrée sodique qui peut être restaurée lors la transfection transitoire de NALCN. (B) quantification de l'entrée moyenne de sodium induite chez le clone 4G5 comparativement à la lignée parentale PC-3-Luc et à la réexpression transitoire de NALCN. (C) test d'invasion réalisé en chambre de Boyden montrant une diminution de près de 80% de l'invasion chez ce clone. (D) Immunodétection de la protéine NALCN dans le clone 4G5.

La réexpression transitoire de la protéine NALCN dans ce clone 4G5 permet en imagerie sodique de restaurer le phénotype sauvage (Figure 38A). En effet, comme le montre la quantification de l'entrée sodique dans ces conditions, il n'existe pas de différence significative entre les PC-3-luc et le clone 4G5+NALCN (Figure 38B) avec une densité de sodium entrante de 0,3. En revanche, il existe bien une diminution significative de l'entrée sodique dans ce clone 4G5 avec une densité de sodium entrant 3 fois inférieur comparativement aux PC-3-luc et 4G5+NALCN. Afin de compléter ces résultats d'imagerie, nous avons réalisé des tests d'invasion en chambre de Boyden, dans le but de corroborer les données obtenues par siRNA (Figure 38C). De manière similaire aux données préliminaires, ce clone présente une très faible capacité invasive (diminué de 80% par rapport au contrôle). Ce clone 4G5 semble

présenter les caractéristiques que nous recherchions en revanche, nous n'avons jamais pu mettre en évidence par immunodétection l'absence de protéine NALCN. En effet, il subsiste une présence protéique lors de la révélation en immunodétection sur ce clone (Figure 38D). Bien que l'intensité de cette bande soit nettement inférieure, celle-ci est présente. Il existe donc la possibilité que la protéine NALCN soit toujours présente dans ce clone 4G5 sous sa forme WT, s'il subsiste un allèle sauvage de NALCN qui était en trop faible quantité pour être détecté par PCR par exemple. Ceci pourrait être l'explication de la présence protéique en plus faible quantité cependant, est peu probable compte tenu de la diminution drastique de l'entrée sodique et également des capacités invasives. Néanmoins, il est possible que lors de la réparation induite par le système NHEJ cela ne génère pas de codon stop sur l'ARN produit. Ce qui serait à l'origine d'une protéine non fonctionnelle de NALCN dû à un décalage du cadre ouvert de lecture par exemple. Cette explication semble la plus plausible puisque l'anticorps utilisé reconnaît une séquence d'acides aminés proches du C-terminal de la protéine NALCN, et il faut donc que la protéine soit complète pour avoir une reconnaissance de la protéine à la bonne taille. Si l'ARNm est traduit et génère une protéine complète, mais non fonctionnelle, la délétion de quelques acides aminés ne permettrait pas la visualisation d'une différence de poids moléculaire, mais explique l'effet important sur l'entrée sodique et les capacités invasives.

L'objectif de ces expérimentations étant de générer une lignée n'exprimant pas la protéine NALCN afin de pouvoir par la suite exprimer des mutants connus de NALCN, nous avons décidé de recommencer le processus afin d'obtenir d'autres clones KO. En effet ne connaissant pas l'effet que pourrait avoir la présence d'une protéine non fonctionnelle de NALCN, il est préférable de laisser ce clone dans l'immédiat.

Autres clones obtenus par commandes à la société Horizon

Le même schéma d'expérimentation a été choisi pour générer d'autres clones, avec cette fois-ci, l'utilisation de moyen technique plus important. En effet, nous nous sommes adressés à une société spécialisée dans la génération de KO. Tous les clones qu'ils ont obtenus ont été séquencés ce qui nous a permis de récupérer deux clones nommés 5J5 et 2119 (voir Annexe 3). Ces deux clones présentent l'apparition de codons stop et de ce fait ne peuvent pas exprimer la protéine NALCN. Pour les deux clones un allèle présente un codon stop très prématuré, sur le deuxième allèle, l'insertion d'une paire de bases laisse apparaître le codon stop plus tardivement.

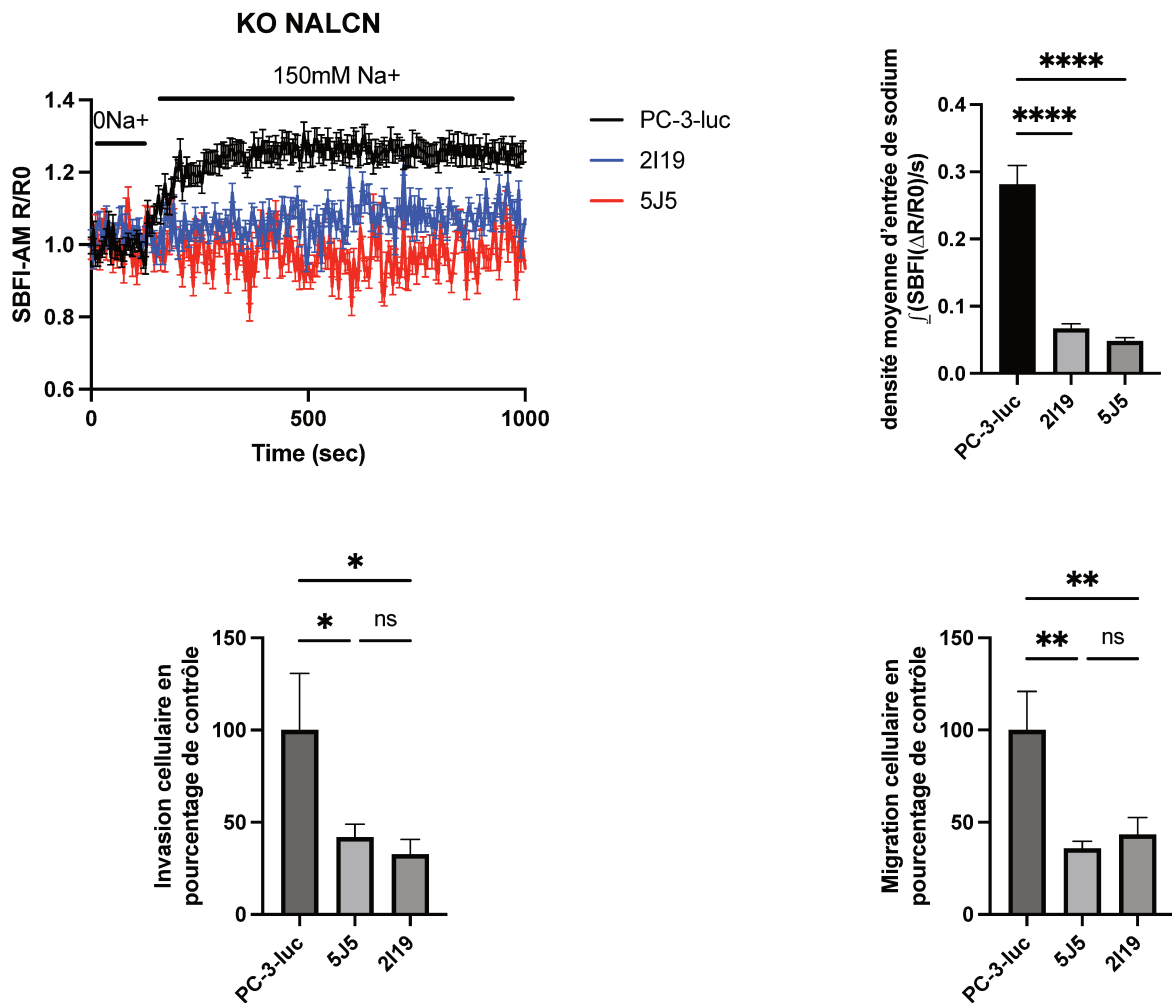


Figure 39 : Propriété des clones KO NALCN 5J5 et 2I19

(A) et (B) imagerie sodique et sa quantification sur les clones 5J5 et 2I19 par rapport à la lignée parentale qui présente près de 90% de diminution de l'entrée sodique. (C) et (D) test d'invasion et de migration cellulaire réalisé en chambre de Boyden présentant une diminution de plus de 50% de ces deux processus

Ces deux clones présentent des caractéristiques similaires au clone 4G5 avec une entrée sodique en imagerie qui est très faible divisée par 3 par rapport au contrôle (Figure 39A et B) et un potentiel invasif et migratoire diminué de plus de 50% par rapport à la lignée parentale (Figure 39C et D). Ces clones pourraient donc être utilisés dans le but de créer des lignées exprimant des mutants de NALCN.

Le temps nécessaire pour générer ces autres clones nous a donné l'opportunité de créer en collaboration avec le Dr A. Monteil une lignée PC-3-luc qui surexprime cette fois-ci le canal NALCN.

La surexpression de NALCN augmente l'agressivité des cellules cancéreuses

En théorie, si la sous-expression de NALCN diminue le phénotype agressif des cellules cancéreuses, la surexpression devrait au contraire l'augmenter. Afin de vérifier cette théorie, nous avons obtenu une lignée qui surexprime le canal NALCN sauvage. Cette lignée a été générée à partir de la lignée PC-3-luc qui exprime déjà le canal et ses protéines partenaires. L'utilisation du clone 4G5 nous semblait trop risquée ne connaissant pas l'impact de la présence potentielle d'une protéine NALCN muté non fonctionnelle.

La lignée obtenue nommée +hNALCN montre une très forte expression de l'ARNm de cette protéine, plus de 2500 fois supérieure aux cellules contrôles (Figure 40A), et une réponse sodique multipliée par 3 en imagerie sodique (Figure 40B).

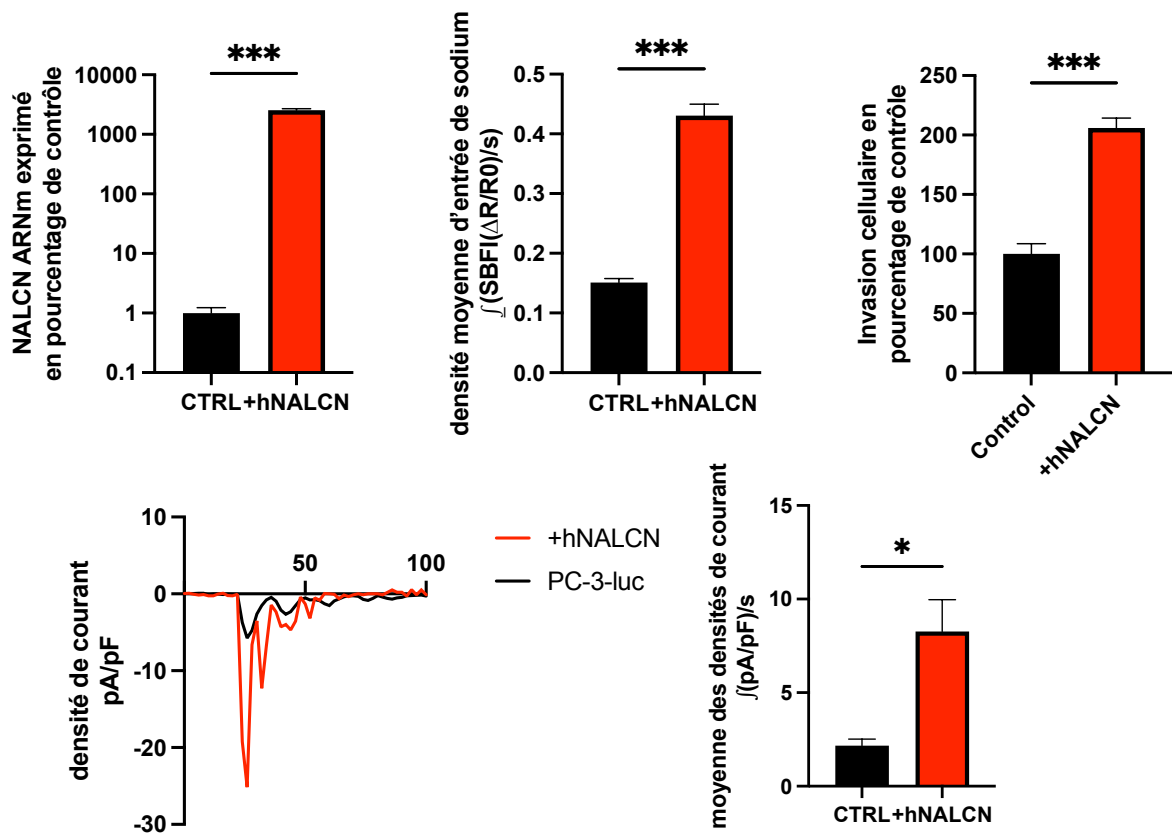


Figure 40 : Propriétés de la lignée surexprimant NALCN (+hNALCN)

(A) quantification de l'ARNm par qPCR de NALCN surexprimé environ 2500 fois dans la lignée +hNALCN comparativement à la lignée parentale. (B) quantification de la densité de sodium entrant en imagerie sodique 3 fois supérieure dans la lignée +hNALCN. (C) Doublement de la capacité invasive des cellules qui surexpriment NALCN (test en chambre de Boyden). (D) traces représentatives de la densité de courant entrant à la suite d'une stimulation par le SVF en patch-clamp perforé et sa quantification à droite montrant une entrée de sodium plus importante d'environ 3 fois dans la lignée +hNALCN.

Cette lignée démontre donc une nette augmentation de la quantité de sodium entrant par le biais d'imagerie et également un courant sodique induit par le SVF en patch clamp très largement supérieur au contrôle (Figure 40D). Les mesures réalisées en patch-clamp montrent une entrée de sodium augmentée de 4 fois en moyenne par rapport au contrôle. Cette entrée de sodium augmentée, est également accompagnée d'une augmentation de l'invasion de cette lignée (Figure 40C). En effet, ces cellules montrent une capacité invasive presque 2 fois supérieure au contrôle. Ces expérimentations mettent en évidence un potentiel invasif beaucoup plus important dans cette lignée +hNALCN comparé à la lignée parentale (CTRL). D'autres lignées générées avec des mutants de NALCN montrent également une augmentation de l'invasion cellulaire. Ces lignées présentent un mutant gain de fonction et un mutant montrant une diminution de l'activité de canal. Le mutant qui présente la diminution de la fonction activité de canal présente une diminution de l'invasion par rapport à la lignée qui surexprime NALCN. En effet, ici il s'agit d'une surexpression de cette protéine, le contrôle de ce mutant reste donc la surexpression de NALCN sauvage. Ceci tend à montrer que l'activité du canal NALCN est importante pour le phénotype invasif des cellules.

Toutes ces données associées montrent que la perte de la protéine ou la présence d'une protéine non fonctionnelle de NALCN réduit fortement le phénotype agressif de ces cellules. A contrario, la surexpression de NALCN semble induire une augmentation de l'entrée sodique dans ces cellules qui s'accompagne d'une augmentation du phénotype agressif. Ceci semble confirmer les résultats préliminaires obtenus sur une implication de cette protéine canal dans le phénotype agressif des cellules cancéreuses prostatiques *in vitro*.

NALCN est responsable du phénotype invasif des cellules *in Vivo*

Puisque les résultats *in vitro* montrent une implication dans le phénotype invasif des cellules cancéreuses prostatiques, nous avons donc initié des expérimentations *in vivo* afin de confirmer l'effet biologique sur un système complexe. Les résultats obtenus lors de l'utilisation d'une lignée shNALCN montrent une relation entre l'expression de NALCN et la dégradation osseuse observée chez des souris. Dans ces expérimentations, les lignées shCTRL et shNALCN sont injectées directement dans le tibia des souris, et la dégradation osseuse est quantifiée. À la suite de l'obtention de la lignée surexprimant NALCN, nous avons décidé une autre expérimentation *in vivo* par l'injection intracardiaque des différentes lignées cellulaires sur des groupes de souris. Nous avons décidé de faire ces expérimentations avec à la fois la lignée +hNALCN, mais également avec la lignée shNALCN, de ce fait la lignée contrôle

commune était donc la souche parentale PC-3-luc. Cette expérimentation initialement prévue sur 12 semaines à la suite de l'injection a finalement été stoppée après 6 semaines seulement. En effet, les souris injectées avec la lignée +hNALCN présentaient des tumeurs et des dégradations osseuses trop importantes (Figure 41A). Les résultats démontrent que la lignée +hNALCN induit un développement de métastases beaucoup plus important que la lignée contrôle aussi bien par le nombre de métastases que par le volume de ces métastases (Figure 41B). De plus, l'ostéolyse induite par les métastases prostatiques de la lignée +hNALCN est extrêmement importante pouvant aller jusqu'à l'apparition de fracture des os touchés d'où l'arrêt prématuré de cette expérimentation.

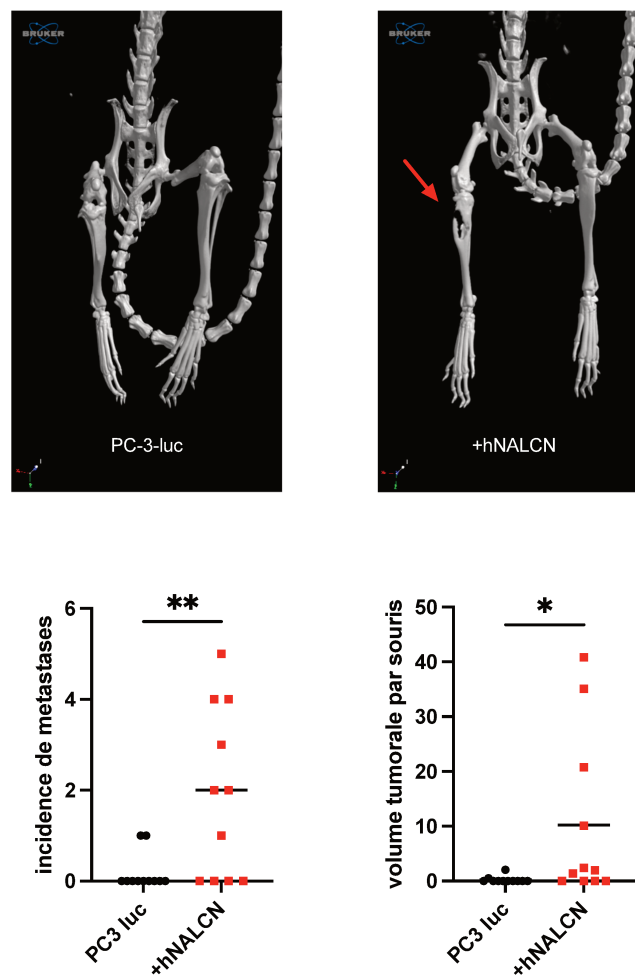


Figure 41 : Développement de métastase induite par NALCN in vivo

(A) reconstruction 3D du squelette de souris, 6 semaines après l'inoculation des cellules surexprimant NALCN et la lignée contrôle PC-3-Luc. (B) le nombre de métastases se développant par souris est significativement augmenté lors de l'inoculation par la lignée surexprimant NALCN. (C) Le volume tumoral total est significativement augmenté chez les souris ayant reçu la lignée surexprimant NALCN.

Ceci confirme *in vivo* le rôle de NALCN dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses prostatiques. L'expression de la protéine NALCN participe au contrôle de ce phénotype invasif de ces cellules cancéreuses prostatiques notamment par son implication dans le développement des métastases. Il reste cependant la question de la voie de signalisation modulée par l'activité du canal NALCN responsable de cette augmentation du phénotype agressif qui jusqu'à présent était associé à la signalisation calcique et ses oscillations.

Rôle de NALCN dans le maintien des oscillations calciques

Les données préliminaires montraient un lien entre le calcium et le sodium et suggéraient un contrôle des oscillations calciques intracellulaire par NALCN. Ces oscillations existent par la présence de protéines qui vont capter le calcium cytosolique pour le stocker ou le rejeter en dehors de la cellule. Ceci va créer des mouvements de calcium dans le temps et l'espace qui est à l'origine de l'apparition d'oscillations. Parmi les protéines impliquées, nous retrouvons la pompe SERCA (sur la membrane du RE), mais également la présence d'échangeur à la membrane plasmique comme NCX ou encore dans les membranes mitochondriales comme NCLX. L'échangeur NCX à la membrane plasmique permet l'extrusion de calcium en échange de l'entrée de sodium dans son mode d'activité principale. En revanche, il peut être dans son mode « reverse » dans le cas d'une concentration sodique intracellulaire importante. Dans son mode « reverse », il va être à l'origine d'une entrée calcique en faisant sortir du sodium. Lors de l'entrée sodique induite par NALCN, la concentration sodique intracellulaire étant nettement supérieure à la normale, cela pourrait activer le mode « reverse » de cet échangeur. Nous avons pu mettre en évidence l'implication de cet échangeur par l'utilisation d'un inhibiteur de son mode « reverse » le KB-R. En effet, l'utilisation de cet inhibiteur induit un arrêt des oscillations observées dans les cellules cancéreuses prostatiques à la fois en imagerie et en patch-clamp à la suite d'une stimulation par le SVF (Figure 42).

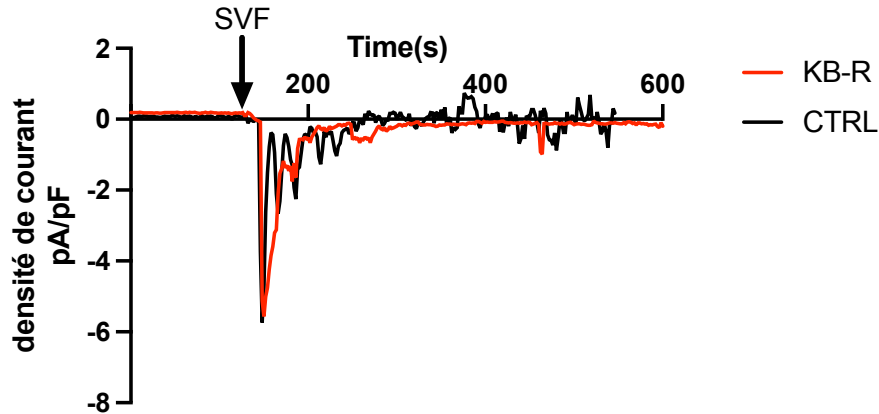


Figure 42 : Implication de NCX dans le maintien des oscillations sodiques induite par le courant NALCN. Lors de l'utilisation du bloqueur du mode « reverse » de NCX sur les cellules de type PC-3 cela inhibe les oscillations sodiques observées à la suite de la stimulation par le SVF.

L'échangeur membranaire mitochondriale NCLX, a été testé par une approche siRNA (Figure 43A) qui montre une diminution de l'expression ARN de 50% ce qui se traduit par une diminution protéique de l'ordre de 40%. Cette diminution protéique est suffisante pour mettre en évidence que cette protéine est également essentielle dans le maintien des oscillations calciques (cf article). L'absence de NCLX induit une augmentation des ROS qui sont alors responsables d'une inhibition du phénomène SOCE qui de ce fait réduit également l'invasion cellulaire. Ces ROS peuvent être induits artificiellement par l'utilisation de H₂O₂ ou d'antimycine A (inhibiteur du complexe 3 de la chaîne respiratoire de la mitochondrie) qui montrent une très forte diminution de l'invasion cellulaire en chambre de Boyden (Figure 43B). NCX et NCLX participent au maintien de oscillations calciques par la régulation de l'homéostasie mitochondriale pour NCLX et l'extrusion de calcium ou l'entrée de calcium en mode « reverse » de NCX à la membrane plasmique. L'activité de ces deux échangeurs est permise grâce au sodium cytosolique.

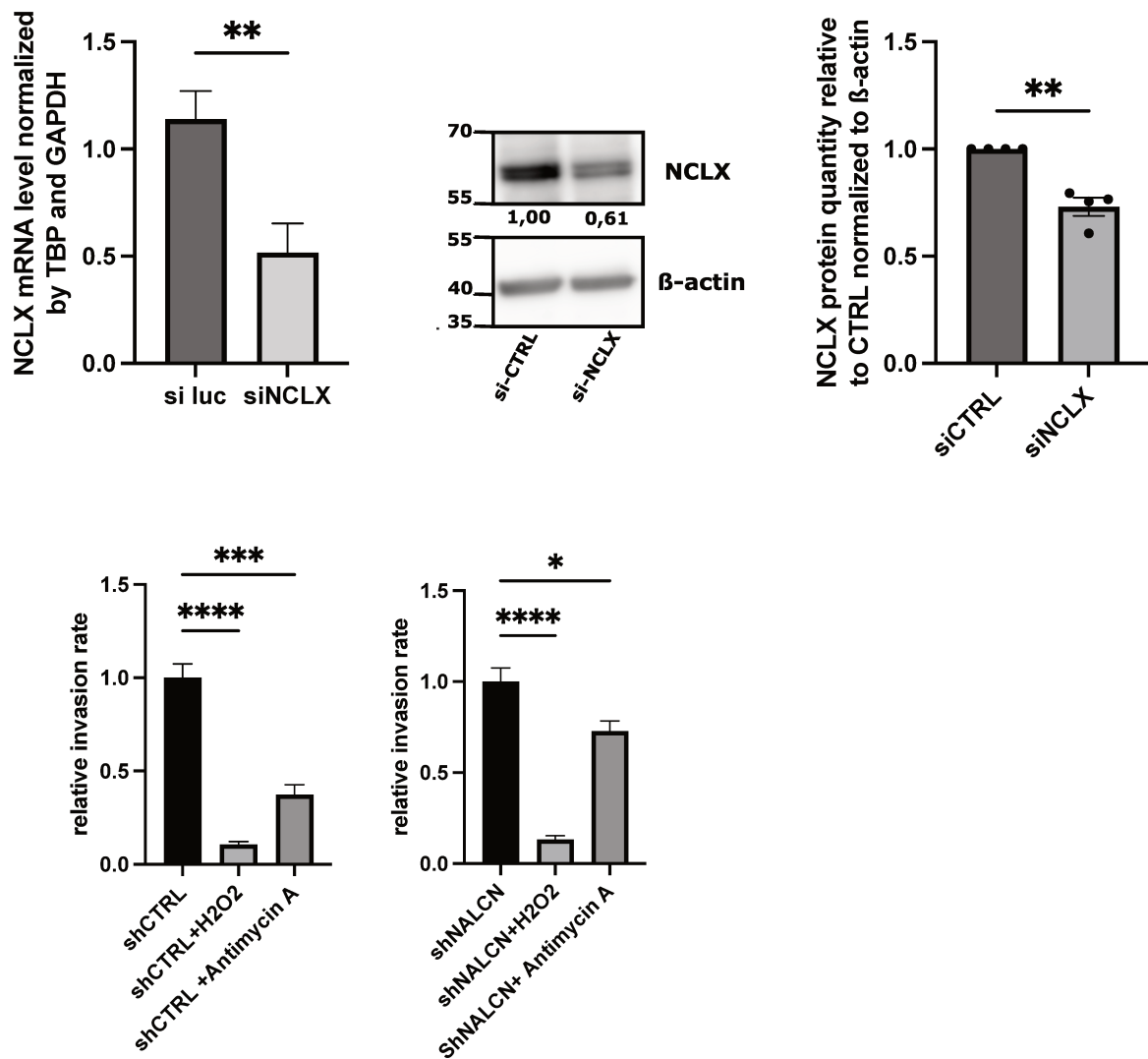


Figure 43 : inhibition de l'échangeur NCLX par siRNA et effet des ROS sur l'invasion cellulaire (A) qPCR montrant l'inhibition de l'ARNm de NCLX d'environ 50% après 48h et Immunodétection montrant une inhibition protéique d'environ 40%. (B) L'induction de ROS artificiellement par H2O2 et antimycine A (Bloqueur du complexe 3 de la chaîne respiratoire mitochondriale) dans les cellules PC-3-shCTRL et shNALCN, conduit à une diminution de l'invasion de presque 90% par H2O2 et d'environ 50% par antimycine A.

La régulation des oscillations calciques par ces protéines permet ainsi la régulation de la sécrétion de MMPs (voir Annexe 4) qui sont nécessaires à l'invasion cellulaire et le développement de métastases. L'absence de NALCN induit une diminution de l'apport sodique nécessaire à la fonction de ces protéines impliquées dans le maintien des oscillations calciques qui favorisent l'invasion. Cependant, NALCN est un canal de fuite sodique, qui induit donc une entrée constante de sodium intracellulaire. Or, l'utilisation du SVF semble induire une activation de ce canal NALCN.

La translocation de NALCN à la membrane plasmique régule son activité

L'activation de ce canal par le SVF ou par le SOCE reste une question intrigante étant donné la fonction de fuite du canal NALCN. Pour d'autres canaux, il a été démontré que leurs activités étaient régulées par leurs présences ou non à la membrane plasmique, tel que dans le cas du canal calcique TRPV6 (Raphaël *et al*, 2014). Ceci expliquerait « l'activation » de ce canal à la suite d'une stimulation par le SVF. En effet, cette stimulation induirait l'activation du SOCE qui sera alors responsable d'une entrée calcique importante qui permettrait la translocation de NALCN à la membrane plasmique, ce qui lui conférerait une activité.

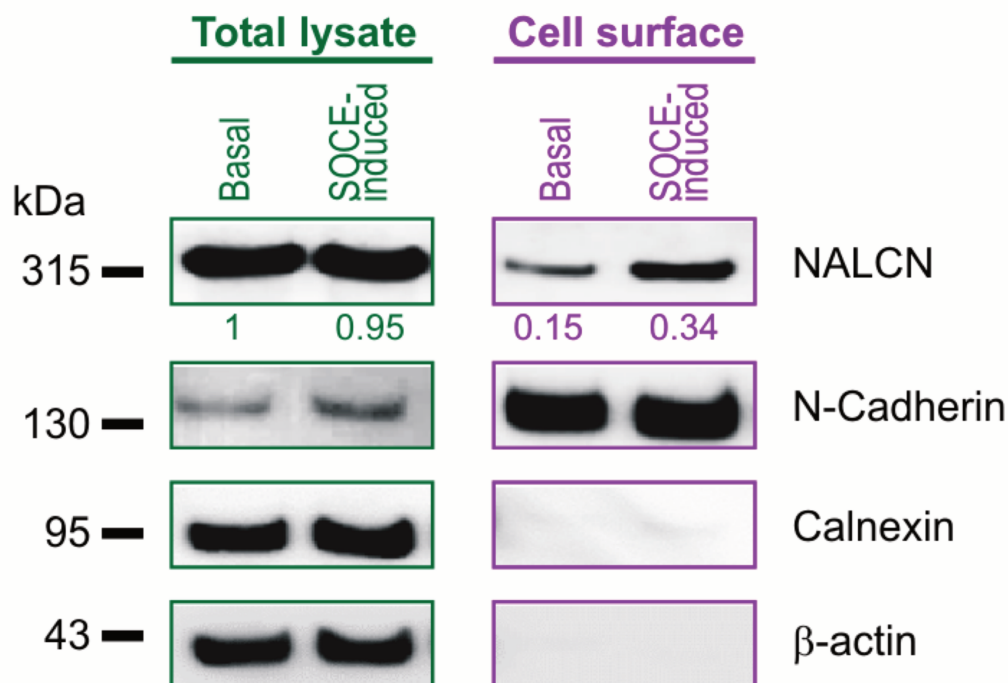


Figure 44 : translocation du canal NALCN à la membrane plasmique à la suite de l'activation du SOCE
 Biotinylation et immunodetection montrant la translocation de NALCN à la membrane plasmique à la suite de l'induction du SOCE dans les cellules de type PC-3. Afin de tester cette théorie, des expérimentations de biotinylation ont été réalisées à la suite de l'activation forcée du SOCE par la TG (Figure 44). Les résultats mettent en évidence un enrichissement à la surface membranaire de NALCN à la suite de l'activation du SOCE. L'entrée calcique induite par le SOCE est donc responsable de la translocation de NALCN à la membrane plasmique, ce qui a pour conséquence son « activation » par le contrôle de sa présence ou non à la membrane plasmique.

Rôle de NALCN dans l'invasion du cancer de la prostate

Ces résultats associés avec ceux précédemment obtenus et le travail d'autres membres du laboratoire montrent que NALCN contrôle le phénotype agressif des cellules cancéreuses prostatiques et également le développement des métastases.

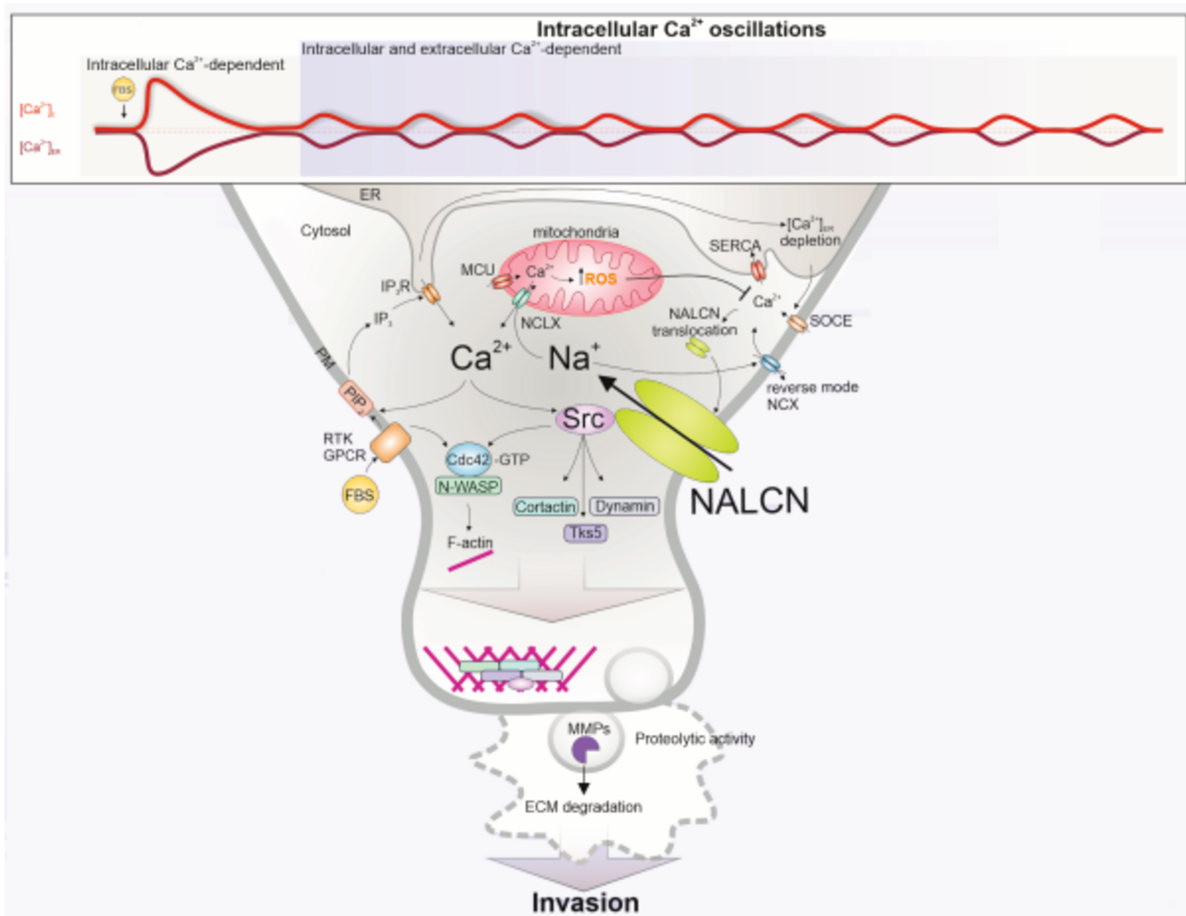


Figure 45 : Mécanisme de régulation de l'invasion par NALCN

Abréviations: PM – plasma membrane, ER – endoplasmic reticulum, NALCN – Na⁺ leak channel non-selective, RM-NCX – reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCLX – mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, IP3R – inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, SERCA –sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, MCU – mitochondrial Ca²⁺ uniporter, RTK –receptor tyrosine kinases, GPCR –G-protein coupled receptors, Src –proto-oncogene SRC tyrosine kinase, N-WASP – neural Wiskott-Aldrich syndrome protein, ECM – extracellular matrix, MMPs – matrix metalloproteinases, GTP – guanosine-5'-triphosphate, ROS – reactive oxygen species, [Ca²⁺]_c – cytosolic Ca²⁺ concentration, [Ca²⁺]_{ER} – Ca²⁺ concentration in ER, [Ca²⁺]_{mito} – Ca²⁺ concentration in mitochondria, [Na⁺]_c – cytosolic Na⁺ concentration, [ROS]_{mito} – ROS concentration in mitochondria.

En bref : (i) la libération de Ca²⁺ médiée par IP3R causée par l'activation de RTK/GPCR induite par le SVF provoque le déstockage du Ca²⁺ du RE et induit le SOCE ; l'élévation de [Ca²⁺]_c dans les microdomaines sous la membrane plasmique facilite la translocation de NALCN vers la membrane plasmique qui génère l'influx de Na⁺ favorisant le RM-NCX et l'influx supplémentaire de Ca²⁺ ; cela déclenche l'absorption de Ca²⁺ médiée par SERCA dans le RE et l'absorption de Ca²⁺ médiée par MCU dans les mitochondries ; ce dernier facilite la production de ROS, connus pour inhiber les éléments SERCA, RM-NCX et SOCE, et s'oppose au NCLX échangeant le Na⁺, délivré par le NALCN, contre le Ca²⁺ mitochondrial ; ces rétroactions positives et négatives donnent lieu à des oscillations [Ca²⁺]_c entretenant l'activité SRC, connue comme composant essentiel du canalosome NALCN ; la forme active de SRC phosphoryle les protéines en aval (cortactine, dynamine et Tks5) en les recrutant dans les régions de polymérisation de l'actine et en donnant lieu à des « invadopodia puncta ». (ii) L'activation de RTK/GPCR est liée à l'activation de la GTPase de la famille Rho, Cdc42, conduisant à sa liaison avec N-WASP et à la nucléation ultérieure de l'actine. (iii) La maturation des invadopodes est facilitée par la sécrétion dépendante du Ca²⁺ de MMPs dégradant l'ECM.

Ce canal par sa réexpression dans ces cellules cancéreuses prostatiques participe à la régulation de l'homéostasie sodique par l'entrée de sodium intracellulaire. Cette entrée sodique intracellulaire participe également à la régulation de l'homéostasie calcique en maintenant les oscillations calciques induites à la suite du SOCE. En effet, l'afflux entrant de sodium permet alors le fonctionnement de pompes et échangeurs de calcium et de sodium présent dans les cellules. L'activation de ces pompes permet des modifications spatiotemporelles de ces ions qui sont à l'origine d'oscillations. Ces oscillations calciques sont notamment nécessaires dans la sécrétion de MMPs qui participe à la dégradation de la matrice extracellulaire, mécanisme essentiel pour l'invasion cellulaire (Figure 45). Cette invasion cellulaire est à l'origine de métastases dans différents organes avec tout de même un fort tropisme envers les os.

Ces résultats sont à l'origine d'un article (ci-après) publié chez EMBO Journal, qui porte sur le rôle de NALCN dans le développement des métastases des cellules cancéreuses prostatiques.

Article

SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESSTHE
EMBO
JOURNAL

NALCN-mediated sodium influx confers metastatic prostate cancer cell invasiveness

Antoine Folcher^{1,†} , Dmitri Gordienko^{1,†} , Oksana Iamshanova^{1,†} , Alexandre Bokhobza¹ , George Shapovalov¹, Dheeraj Kannancheri-Puthooru¹, Pascal Mariot¹, Laurent Allart¹, Emilie Desruelles¹, Corentin Spriet², Raquel Diez³, Thibault Oullier⁴, Séverine Marionneau-Lambot⁴, Lucie Brisson⁵ , Sandra Geraci⁶, Hathaichanok Impheng⁷, V'yacheslav Lehen'kyi¹ , Aurélien Hastrate¹, Adriana Mihalache⁸, Pierre Gosset⁸, Stéphanie Chadet⁹ , Stéphanie Retif¹⁰, Maryline Laube¹⁰, Julien Sobilo¹⁰ , Stéphanie Lerondel¹⁰, Giulia Villari^{11,12} , Guido Serini^{11,12} , Alessandra Fiorio Pla¹³, Sébastien Roger⁹ , Gaëlle Fromont-Hankard^{5,14}, Mustafa Djamgoz^{15,16} , Philippe Clezardin⁶, Arnaud Monteil¹⁷ & Natalia Prevarskaya^{1,*}

Abstract

There is growing evidence that ion channels are critically involved in cancer cell invasiveness and metastasis. However, the molecular mechanisms of ion signaling promoting cancer behavior are poorly understood and the complexity of the underlying remodeling during metastasis remains to be explored. Here, using a variety of *in vitro* and *in vivo* techniques, we show that metastatic prostate cancer cells acquire a specific Na⁺/Ca²⁺ signature required for persistent invasion. We identify the Na⁺ leak channel, NALCN, which is overexpressed in metastatic prostate cancer, as a major initiator and regulator of Ca²⁺ oscillations required for invadopodia formation. Indeed, NALCN-mediated Na⁺ influx into cancer cells maintains intracellular Ca²⁺ oscillations via a specific chain of ion transport proteins including plasmalemmal and mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchangers, SERCA and store-operated channels. This signaling cascade promotes activity of the NALCN-localized proto-oncogene Src kinase, actin remodeling and secretion of

proteolytic enzymes, thus increasing cancer cell invasive potential and metastatic lesions *in vivo*. Overall, our findings provide new insights into an ion signaling pathway specific for metastatic cells where NALCN acts as persistent invasion controller.

Keywords calcium oscillations; invasion; oncochannelopathy; Sodium leak channel; vesicle secretion

Subject Categories Cancer; Cell Adhesion, Polarity & Cytoskeleton; Signal Transduction

DOI 10.15252/embj.2022112198 | Received 23 July 2022 | Revised 9 May 2023 | Accepted 10 May 2023

The EMBO Journal (2023) e112198

Introduction

Prostate cancer (PCa) is the most common noncutaneous human malignancy and the second most lethal tumor among men, with its

- 1 Inserm U1003, Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, GIS ONCO Lille, University of Lille, Lille, France
 - 2 TISBio, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), CNRS, UMR 8576, Université de Lille, Lille, France
 - 3 Cell Physiology Research Group, Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres, Spain
 - 4 Cancéropôle du Grand Ouest, Plateforme In Vivo, Nantes, France
 - 5 Inserm UMR1069, Nutrition Croissance et Cancer, University of Tours, Tours, France
 - 6 Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm UMR 1033 LYOS, Lyon, France
 - 7 Department of Physiology, Faculty of Medical science, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
 - 8 Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Groupement des Hôpitaux de l'Université Catholique de Lille, Lille, France
 - 9 EA4245 Transplantation, Immunology, Inflammation, University of Tours, Tours, France
 - 10 PHENOMIN-TAAM, CNRS UPS44, Centre d'Imagerie du Petit Animal (CIPA), 3B rue de la Férollerie, Orléans, France
 - 11 Department of Oncology, University of Torino School of Medicine, Candiolo, Italy
 - 12 Candiolo Cancer Institute – Fondazione del Piemonte per l'Oncologia (FPO), Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS), Candiolo, Italy
 - 13 Department of Life Science and Systems Biology, University of Torino, Torino, Italy
 - 14 Department of Pathology, CHRU de Tours, Tours, France
 - 15 Department of Life Sciences, Imperial College London, London, UK
 - 16 Biotechnology Research Centre, Cyprus International University, Mersin, Türkiye
 - 17 LabEx "Ion Channel Science and Therapeutics", IGF, CNRS, INSERM, University of Montpellier, Montpellier, France
- *Corresponding author. Tel: +33 614890452; E-mail: natalia.prevarskaya@univ-lille.fr
- [†]These authors contributed equally to this work

highest incidence in industrialized countries. Understanding the processes facilitating the progression of PCa to aggressive metastatic phenotypes and developing new therapeutic targets are necessary to improve both the survival rate and the everyday life of the patients. In most cases of PCa, metastasis but not the primary tumor *per se* is the main cause of mortality, with the bone metastases being the most likely and highly incurable complication.

To effectively escape the tumor, enter the circulation and establish secondary growth in distant organs cancer cells must develop an enhanced invasiveness. The invasion capacity gained by tumor cells is the hallmark of malignancy. To become invasive, tumor cells need to acquire traits enabling enhanced migration and proteolysis of extracellular matrix (ECM). There is increasing evidence indicating that development of invasive tumor phenotype involves altered ionic homeostasis driven by aberrant ion channel expression/function, referred to as “oncochannelopathies” (Prevarskaya *et al*, 2018). It is now well-established that, on the one hand, Ca^{2+} signaling plays a crucial role in cancer development (Monteith *et al*, 2017), while, on the other hand, elevated tissue Na^+ concentration is a highly specific *in vivo* indicator of malignant lesions in human cancer patients (Haneder *et al*, 2015; Zaric *et al*, 2016). This pinpoints the mechanisms coupling the alteration in Na^+ homeostasis to intracellular Ca^{2+} events upon cancer progression as one of the central subjects in the field of oncochannelopathies.

Over the years, several studies have revealed some striking similarities in the behavior between neuronal and metastatic cancer cells. Indeed, gene products traditionally known for their role in normal neuronal migration, axonal growth and embryonic development, were also pinpointed in metastasis, where they contribute to the aggressive cancer phenotype (Biankin *et al*, 2012; Shah *et al*, 2018). Interestingly, ion channels responsible for generation of action potential in the electrically excitable cells were also reported in metastatic cells (Djamgoz *et al*, 2019). An intriguing player in metastatic cancer cells seems to be the Na^+ leak channel, NALCN, first reported in neurons (Lu *et al*, 2007). Its expression was then reported to be altered in some types of cancer (reviewed in Cochet-Bissuel *et al*, 2014) with, as yet, unknown consequences for cancer cells behavior. NALCN baseline activity in neurons produces about 10 mV depolarizing shift in their resting membrane potential (V_r) (Lu *et al*, 2007). Importantly, NALCN is part of a channelosome, a multi-protein complex whose members are involved in channel folding, stabilization, cellular localization, and activation (Cochet-Bissuel *et al*, 2014), thereby providing great degree of versatility for the regulation of its function not only in neurons, but also in cancer cells.

Another important question is how transmembrane Na^+ fluxes can promote cancer cell invasiveness. Indeed, it is mainly dysregulated intracellular Ca^{2+} signaling, with the specific spatial and temporal signatures adopted by cancer cells, which is currently acknowledged to drive the progression of certain cancer hallmarks, including invasion and metastasizing (Prevarskaya *et al*, 2011, 2018). Given the existence of several tightly linked $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -dependent molecular pathways that participate in the maintenance of the intracellular Ca^{2+} and Na^+ homeostasis (Verkhatsky *et al*, 2018), we hypothesized that in metastatic cancer cells, NALCN could provide signaling input encouraging the cell invasion via intracellular Ca^{2+} events.

Thus, in the present work, we have undertaken a thorough investigation of the neuronal-type NALCN in prostate cancer cells in

the context of its significance for prostate carcinogenesis. Our findings identify NALCN as a major mechanism responsible for Na^+ influx that governs Ca^{2+} oscillatory signaling, involving changes of Ca^{2+} concentration in cytoplasm ($[\text{Ca}^{2+}]_c$), endoplasmic reticulum ($[\text{Ca}^{2+}]_{ER}$) and mitochondria ($[\text{Ca}^{2+}]_{mito}$), ROS production and initiation of invadopodia formation (referred hereafter as invadopodogenesis) in strongly metastatic prostate cancer cells. Importantly, formation of dynamin puncta, reporting invadopodial precursor assembly, occurred at sites of the $[\text{Ca}^{2+}]_c$ wave initiation enriched with NALCN. The NALCN-governed oscillatory Ca^{2+} events facilitate secretion of proteolytic enzymes (matrix metalloproteinases, MMPs) and promote invadopodogenesis via Src kinase activation and actin remodeling (also encouraged by N-WASP—Cdc42 coupling). Modulation of NALCN bioavailability strongly affects *in vivo* prostate cancer progression and bone metastasis formation.

Overall, our study uncovers malignant assignment of NALCN and demonstrates its role as the central element of critical $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ signaling axis promoting metastatic progression. Our data suggest that NALCN gene must be included in the panel of screened genes for early diagnosis of metastatic prostate cancer.

Results

NALCN promotes metastasis-associated cancer cell behavior

Initial immunohistochemical analysis of human prostate tissue arrays detected NALCN upregulation during cancer progression, whereas NALCN was not detected in noncancerous prostate glands (Fig 1A). In clinically localized prostate cancer, NALCN expression was significantly higher within the ISUP group (Gleason score that reflects loss of differentiation) (Fig 1B). NALCN expression was also significantly higher in pT3 tumors (with extraprostatic extension) as compared to pT2 tumors (limited to the prostate gland) (Fig 1B). In human prostate cancer, NALCN immunostaining was observed in 57% of clinically localized hormone-naïve cases, 6% (3/48) of castration-resistant prostate cancer (CRPC) and 62% (13/21) of metastases. The expression of NALCN was strongly correlated with the expression of Src-kinase (Fig 1C). Similar results were obtained for NALCN expression in other cancers: positive staining in bone metastases from breast (11/19) and colon (5/8) cancers, without any detectable expression in corresponding normal tissues (0/5) (Fig 1D). These data suggest that NALCN expression has clinical relevance and that NALCN may contribute to malignancy in several carcinomas.

Screening of various metastatic prostate cancer cell lines revealed simultaneous expression of NALCN with all members of the NALCN channelosome—UNC-79, UNC-80, and NLF-1—only in PC-3 and PC-3 M cell lines, with little or no expression in LNCaP, LNCaP C4-2, and DU-145 cell lines (Fig EV1A). Furthermore, Na^+ influx (assessed with ratiometric Na^+ dye SFBI) in PC-3 and PC-3 M cells, expressing all the components necessary for the assembly of functional NALCN channelosome, was found to be significantly greater than in the cancer cell lines lacking this feature (Fig EV1B). Na^+ influx following step-wise increase of extracellular Na^+ concentration ($[\text{Na}^+]_o$ switch) was augmented following transient NALCN overexpression in C4-2 cells (Fig EV1C) and was suppressed by transient NALCN silencing with siRNA (siNALCN) in PC-3 cells (Fig EV1D).

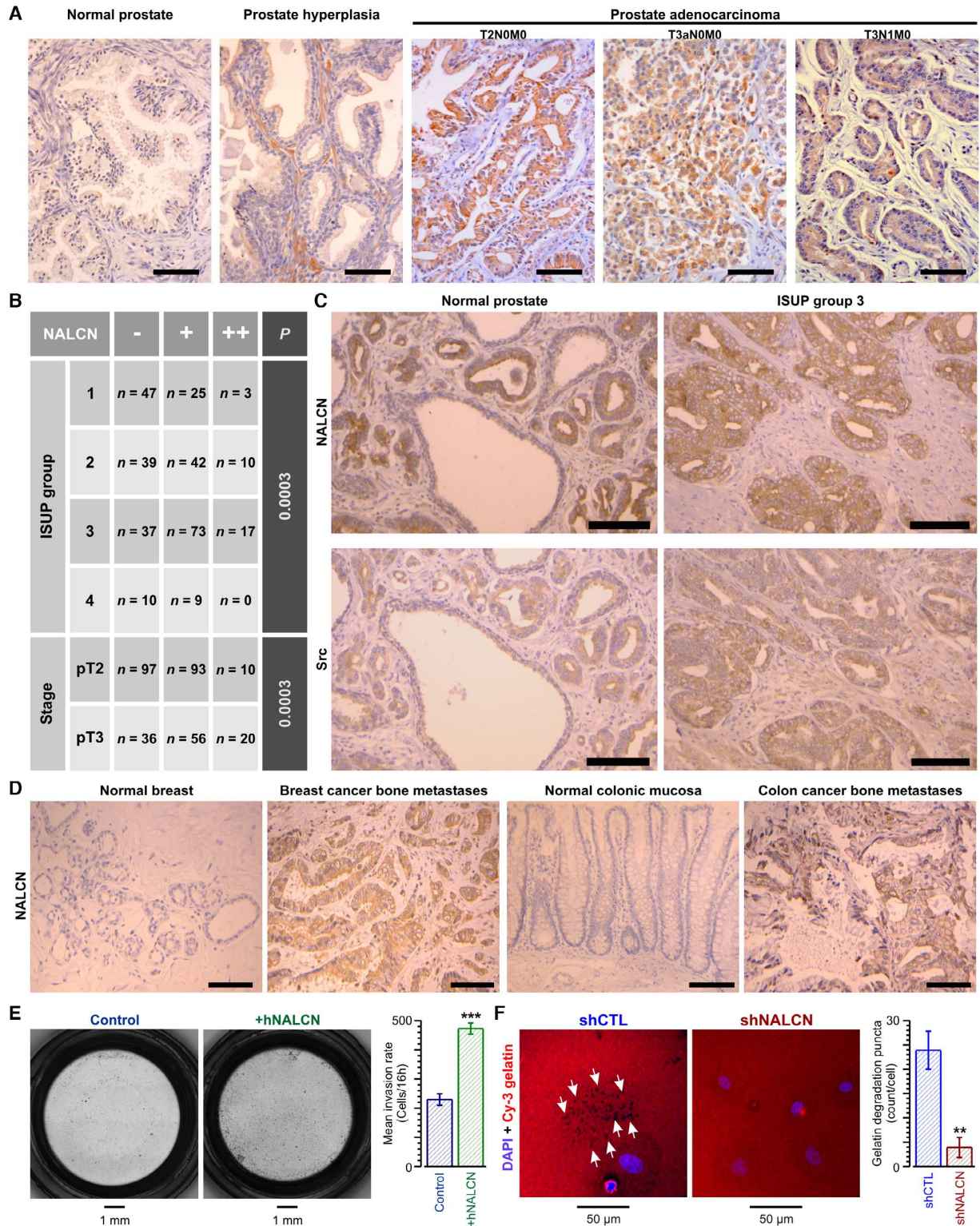


Figure 1.

Figure 1. NALCN promotes prostate cancer progression augmenting invasiveness of the cancer cells.

A Immunohistochemical positive staining for NALCN in human prostate adenocarcinoma tissues, but not in normal or hyperplastic prostate tissues (tissue microarray: PR484, US Biomax, Inc). T2NOMO—tumor invaded submucosa without any regional or distant metastases (stage I); T3aNOMO—tumor had broken through the capsule of the prostate gland and invaded through muscularis propria (stage III); T3N1MO – tumor invaded through muscularis propria with 1 to 3 regional lymph node metastases (stage IV).

B NALCN expression in hormone naïve clinically localized cancer ($n = 338$).

C Immunohistochemistry: significant correlation ($P < 0.0001$) between positive staining of NALCN and Src in clinically localized prostate cancer, but not in non-cancerous prostate.

D Immunohistochemistry: positive staining of NALCN in bone metastases produced by breast and colon cancers, but not in corresponding normal tissues.

E Invasion assay: Photos of Boyden chambers (left) show preparations used for count of control PC-3 cells (Control) and PC-3 cells overexpressing NALCN (+hNALCN). Bar diagram plot (right): NALCN overexpression causes significant increase of the number of invading cells counted within 16-h incubation.

F NALCN knockdown suppresses invadopodia formation reported by Cy3-fluorescent gelatin degradation (arrows). Confocal images (left) of Cy3 (red) and DAPI (blue; nuclei) fluorescence in control (shCTL) and shNALCN 48 h after plating the cells on gelatin. Bar diagram plot: NALCN suppression causes significant decrease of the number of gelatin degradation puncta counted within 48-h incubation.

Data information: The images: scale bar is 100 μm . Bar diagram plots show the count of cell (E) or degradation puncta per cell (F) mean \pm SEM for $N = 3$ (E), $N = 5$ (F) biological replicates per condition. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, unpaired two-tailed Student's t -test. Source data are available online for this figure.

Importantly, modulation of NALCN bioavailability affects prostate cancer cell invasion rate (Figs 1E and EV1E) but not their proliferation rate (Fig EV1F).

Assessment of the NALCN recruitment to invadopodogenesis with cyanine-3 (Cy3)-fluorescent gelatinase assay revealed that NALCN silencing significantly reduced the number of the gelatin degradation puncta accumulated over time as a result of the invadopodium formation (Fig 1F).

Previously, pro-invasive role of Na^+ influx through the *de novo* expressed Na_v channels in breast cancer cells was attributed to facilitated H^+ extrusion via Na^+/H^+ exchanger type 1 (NHE-1), leading to acidification of the pericellular microenvironment and activation of ECM-degrading cysteine cathepsins at invadopodia sites (Gillet *et al*, 2009; Brisson *et al*, 2013). Surprisingly, in our experiments, knockdown of Na^+ -conducting NALCN (NALCN-KD) had no effect on either intracellular pH or H^+ extrusion from the PC-3 cells (Appendix Fig S1A). This argued against the possibility that metastasis-promoting significance of NALCN-mediated Na^+ influx in prostate cancer cells is somehow linked to pH changes.

Immunocytochemical analysis revealed strong colocalization of NALCN with Src kinase, a key signaling component of the invasion pathway, and with invadopodial proteins (cortactin, dynamin, matrix metalloproteinase MT1-MMP and adaptor protein Tks5) (for

review, see Murphy & Courtneidge, 2011) within specific morphological structures referred to as “invadopodia puncta and rosettes” (Figs 2A and EV1G). Furthermore, 3D confocal imaging on PC-3 cells placed on gelatin and co-expressing NALCN-GFP and Tks5 revealed co-localization of NALCN with Tks5 in newly formed invadopodia (Appendix Fig S1B). Although previous studies have reported that Src kinase is recruited to NALCN channelosome (Lu *et al*, 2009), no evidence of Src kinase regulation by NALCN was presented. Here, we found that NALCN-KD markedly suppressed Src kinase activity in metastatic PC-3 cells without significant effect on Src expression (Appendix Fig S1C and D).

Fetal bovine serum (FBS) contains mixture of various growth factors, including epidermal growth factor (EGF), and mediates its effects via activation of surface receptor tyrosine kinases (RTKs) or G-protein-coupled receptors (GPCRs). Fetal bovine serum can be used to induce pro-invasive behavior of prostate cancer cells cultured under starving conditions. Indeed, both FBS and EGF were reported as potent pro-invasive stimuli (Sun *et al*, 2014). It was previously demonstrated that stimulation of starved melanoma cells with fetal bovine serum induces Ca^{2+} oscillations and facilitates invasion. However, the casual link between the two processes remained unknown. We found that in PC-3 cells, the FBS – induced $[\text{Ca}^{2+}]_c$ response is associated with: (i) deviation of $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$

Figure 2. Spatial distribution of NALCN and its signaling input in PC-3 cells.

A Co-localisation of NALCN with invadopodia markers – Dynamin, Src and Tks: confocal images (left), 2D intensity histograms (middle) and statistical analysis (right). Scale bar: 5 μm .

B NALCN silencing suppresses invadopodial precursor assembly. Left: near-cell-bottom confocal images captured before and 3 min after stimulation with 10% fetal bovine serum (FBS). Arrows: F-actin-enriched regions reported by LifeAct-mCherry. Middle: corresponding traces of relative changes in mCherry fluorescence. Right: mean rates of F-actin formation.

C Top: temporal profiles of self-normalized fluorescence intensity ($\Delta F/F_0$) of fluo-4 (green), averaged within outlined region (inset: left, green outline), and mCherry (red), averaged within 14 circles (inset: right, red outlines). Middle: galleries show confocal images of fluo-4 and mCherry fluorescence captured during two periods of interests, POIs (blue bars): for POI1 - every image, for POI2 - every 100th image. Bottom left: confocal images of Dynamin2-mCherry fluorescence captured before and 3 min after stimulation with 10% FBS. Bottom middle and right: plots relate the dynamics of $[\text{Ca}^{2+}]_c$ changes (Fluo-4) to formation of dynamin puncta (Dynamin2-mCherry) at two regions of interests (ROIs) (insets); the galleries (below) show every 40th image (after 90° rotation) during the POIs (plots: blue bars).

D Top: the overlay of NALCN-GFP and Cal-590 images is related to the gallery of self-normalized rainbow-coded Cal-590 images showing $[\text{Ca}^{2+}]_c$ response to 10% FBS. Bottom: 3 rainbow-coded Cal-590 images are superimposed on gray-coded NALCN-GFP image and rotated by 90°. Arrows: NALCN-enriched structure.

Data information: The colocalization intensity (A) was measured using Pearson's correlation coefficient with Fiji ImageJ software. Bar diagram plots show mean \pm SEM: (A) Pearson's correlation coefficient as a measure of co-localization with NALCN of Dynamin ($n = 4$), Src ($n = 14$) and Tks ($n = 4$), and (B) Mean rates of F-actin formation estimated as signal mass ($\int (\Delta F/F_0)$) of mCherry fluorescence per second in cells transfected with siCTL ($n = 93$) and with siNALCN ($n = 140$), $n =$ number of cell $***P < 0.001$, unpaired two-tailed Student's t -test. Source data are available online for this figure.

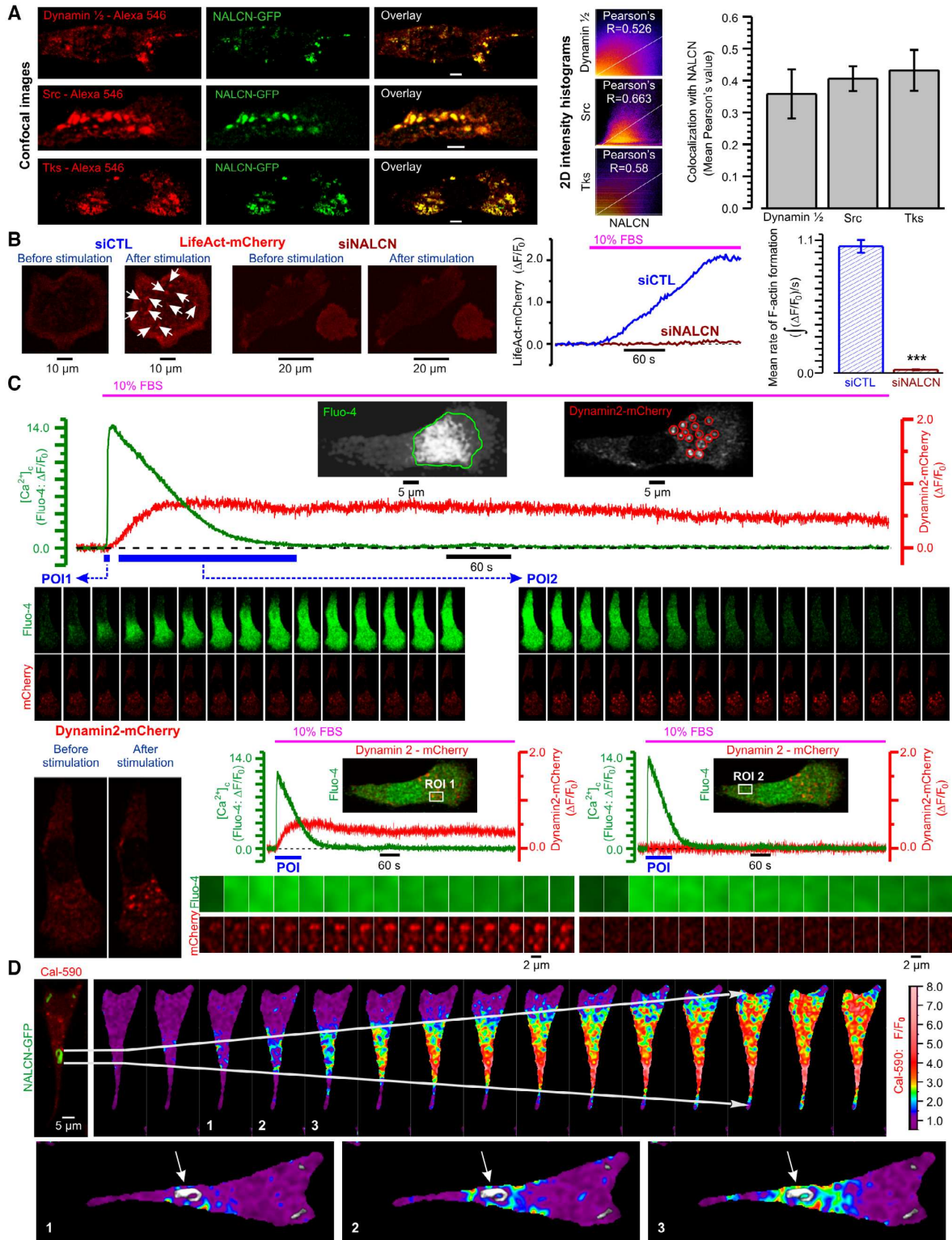


Figure 2.

(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) from equilibrium (Fig EV2A) and (ii) facilitated interaction between N-WASP (neuronal Wiskott–Aldrich syndrome protein) and Cdc42 (cell division cycle 42 protein) (Fig EV2B), and induces invadopodial precursor assembly detectable as (i) F-actin enriched regions (Fig EV2C) and (ii) dynamin puncta (Fig EV2D). The role of PIP₂, N-WASP, and Cdc42, respectively, in invadopodia function has been previously highlighted by numerous studies (for review see Murphy & Courtneidge, 2011). Importantly, the invadopodial precursor assembly was strongly suppressed by NALCN-KD (Fig 2B). To assess further our hypothesis that in invasive cells a specific Ca²⁺-Na⁺ signaling axis is recruited to invadopodogenesis, we related spatiotemporal profiles of the FBS-induced [Ca²⁺]_c responses to subcellular structural features and their dynamic changes. We found that in PC-3 cells, formation of dynamin puncta, reporting invadopodial precursor assembly, occurred at sites of the [Ca²⁺]_c wave initiation (Fig 2C) that, in turn, coincided with NALCN-enriched rosettes (Fig 2D).

NALCN drives Ca²⁺ oscillations

Long-term (up to 2 h) monitoring of the PC-3 cell responses to stimulation with either EGF alone (Appendix Fig S1E) or FBS (Fig 3A) revealed that an initial [Ca²⁺]_c transient was followed by [Ca²⁺]_c oscillations. These were accompanied by reciprocal changes of Ca²⁺ concentration in [Ca²⁺]_{ER} (Fig 3A). The initial [Ca²⁺]_c transient, but not the subsequent [Ca²⁺]_c oscillations, persisted in Ca²⁺-free solution supplemented with 0.5 mM EGTA, while both were abolished following Ca²⁺ store depletion with 50 μM cyclopiazonic acid (CPA), even when the cells were bathed in Ca²⁺-containing solution (Fig 3B). We concluded, therefore, that generation of these [Ca²⁺]_c oscillations involves both Ca²⁺ entry and Ca²⁺ recycling by the endoplasmic reticulum (ER).

To assess the role of NALCN in the [Ca²⁺]_c oscillations, we compared spatiotemporal patterns of the FBS-induced [Ca²⁺]_c response in serum-starved control and NALCN-KD PC-3 cells (Fig 3C and D; Appendix Fig S1F). This revealed that the FBS-induced [Ca²⁺]_c oscillations (both frequency and signal temporal density) were significantly attenuated in NALCN-KD cells (Fig 3E). Interestingly that “pacemaker phase” observed in [Ca²⁺]_c oscillations (i.e., the phase of slow [Ca²⁺]_c rise preceding the regenerative response) appeared to be NALCN-dependent as well (Fig 3C and D). Attenuation of the

FBS-induced [Ca²⁺]_c oscillations following reduction of [Na⁺]_o (Fig 3F) further confirmed that genesis of these [Ca²⁺]_c oscillations relies on continuous Na⁺ influx. The direct demonstration of this influx was achieved by perforate-patch recording of the whole-cell current activated in PC-3 cells at holding potential of −80 mV in response to FBS application (Fig 3G). This oscillating inward current was virtually completely abolished following NALCN-KD or reduction of [Na⁺]_o. These findings were substantiated by a reversal strategy: NALCN overexpression (Fig EV3A) significantly increased FBS-induced Na⁺ influx (Fig EV3B), the whole-cell inward current (Fig EV3C) and the [Ca²⁺]_c oscillations (Fig EV3D–F).

Coupling between NALCN-mediated Na⁺ influx and [Ca²⁺]_c events

Oscillations generally require positive feedback between the contributing elements. We, therefore, assessed (i) modulation of NALCN-mediated Na⁺ influx by extracellular ([Ca²⁺]_o) and intracellular ([Ca²⁺]_i) Ca²⁺ concentrations as well as (ii) coupling between Na⁺ influx and rise of [Ca²⁺]_c.

To unravel the net effect of [Ca²⁺]_c elevation on NALCN-mediated Na⁺ influx, we assessed the Na⁺ influx induced by switching [Na⁺]_o from 0 to 130 mM (Fig 4A–C) and by store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) (Fig 4E–H). The two were then compared (Fig 4I, top). We have found that the [Na⁺]_o switch induced a significant Na⁺ influx (Fig 4A–C) which: (i) was dramatically suppressed by NALCN-KD (Fig 4A); (ii) was not modulated by [Ca²⁺]_o, at least within the range of 0–4 mM (Fig 4B), in contrast to what was reported for neurons (Lu *et al*, 2010); and (iii) was not affected by Ca²⁺ store depletion (Fig 4C). Furthermore, [Ca²⁺]_c elevation brought about by acute inhibition of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) with thapsigargin (TG) failed to induce Na⁺ influx when the cells were bathed in Ca²⁺-free external solution supplemented with 0.5 mM EGTA, i.e., when SOCE was prevented (Fig 4D). Moreover, we have found that: (i) SOCE activation triggers Na⁺ influx even at constant physiological [Na⁺]_o (Fig 4E, F and H), (ii) NALCN-KD significantly suppresses not only this Na⁺ influx but also SOCE (Fig 4E); and (iii) inhibition of the reverse-mode of plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger (RM-NCX) KB-R7943 curtails [Ca²⁺]_c transient caused by SOCE at [Na⁺]_o = 130 mM (Fig 4F), does not affect it at [Na⁺]_o = 0 mM (Fig 4G) and attenuates [Ca²⁺]_c transient triggered by Na⁺

Figure 3. NALCN regulates Ca²⁺ oscillations in PC-3 cells.

- A FBS-induced transient [Ca²⁺]_c elevations (Fluo-4, top left) are associated with transient decreases of Ca²⁺ concentration in endoplasmic reticulum ([Ca²⁺]_{ER}) (Mag-Fluo-4, bottom left). Corresponding galleries (right) show every 100th image during the highlighted POIs (I and II, respectively). Visualization of the ER with pDsRed2-ER confirms the ER origin of Mag-Fluo-4 signal (inset bottom left: confocal images of cell fragment).
- B Contribution of Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release to FBS-induced [Ca²⁺]_c response (Fura-2) illustrated by sample traces (left to right): control, nominally Ca²⁺-free or EGTA-supplemented solutions, and Ca²⁺-containing solution but depleted Ca²⁺ stores.
- C, D [Ca²⁺]_c oscillations reported by Fluo-4 fluorescence in FBS-exposed PC-3 cells pre-treated with siCTL (C) or siNALCN (D) for 72 h. Top: sample traces from 8 different cells. Middle: POIs (top: gray background) are presented on enlarged plots to emphasize that NALCN suppression abolishes “pacemaker events” observed in control (fitted red curves). Bottom: the galleries show every 3rd image during the POIs (middle: orange background). Scale bars: 10 μm.
- E Statistical analysis confirms contribution of NALCN to genesis of the Ca²⁺ oscillations.
- F FBS-induced [Ca²⁺]_c response (Fura-2) is attenuated following reduction of extracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_o) to 19.5 mM (substitution with NMDG).
- G FBS-induced inward current (perforated patch, V_h = −80 mV) is suppressed following pretreatment with shNALCN or reduction of [Na⁺]_o to 13 mM (substitution with NMDG).

Data information: Data show mean ± SEM. The histograms (E) compare the oscillation frequency (top) and signal temporal density (bottom) distributions for siCTL (n = 98) and siNALCN (n = 107). Insets: corresponding mean ± SEM. The bar diagram plots show mean signal temporal densities (F, n = 20–23) and mean current densities (G, n = 4–6) during initial transient (cyan) and oscillations (orange). n = number of cell. ***P < 0.001, unpaired two-tailed Student's t-test. Source data are available online for this figure.

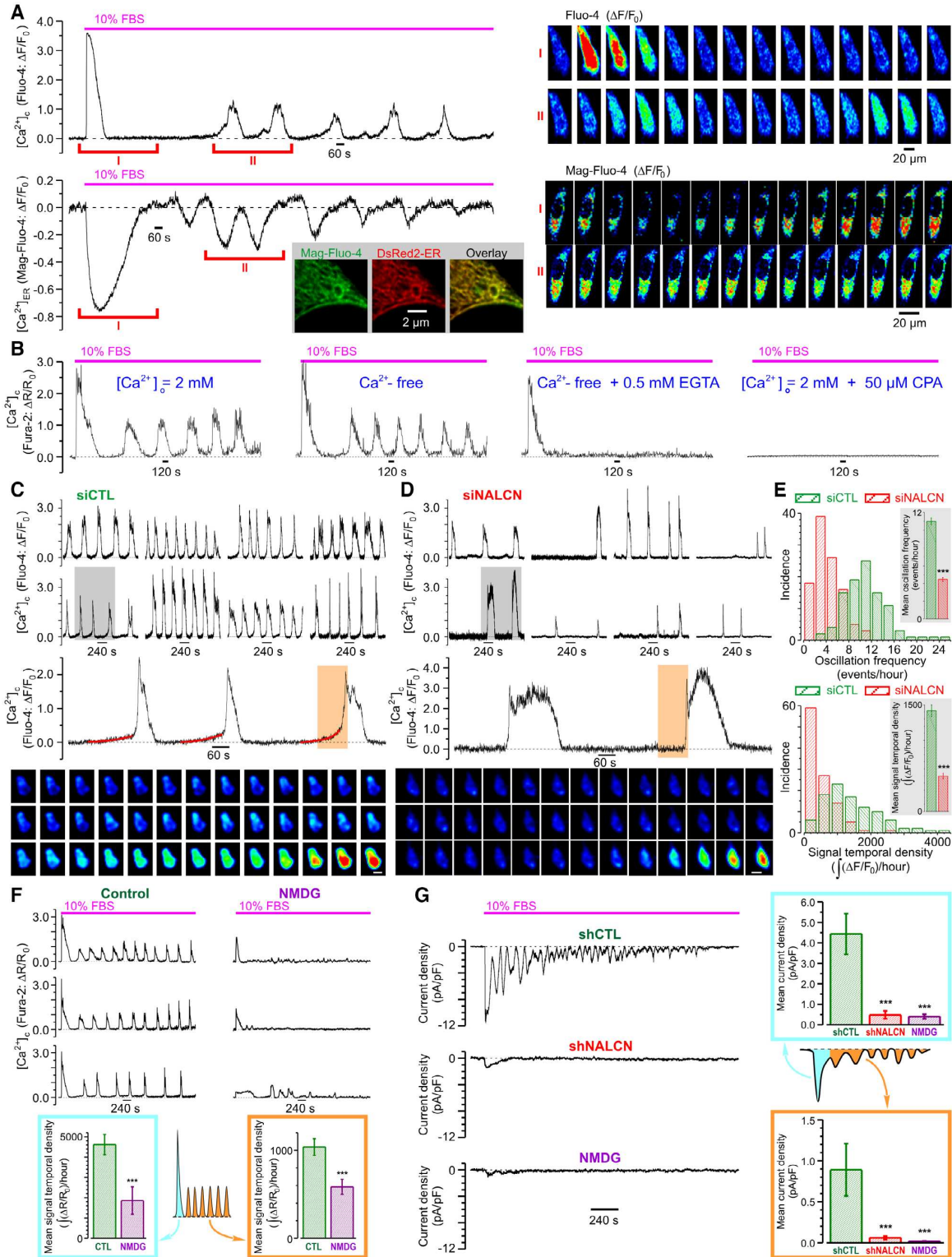


Figure 3.

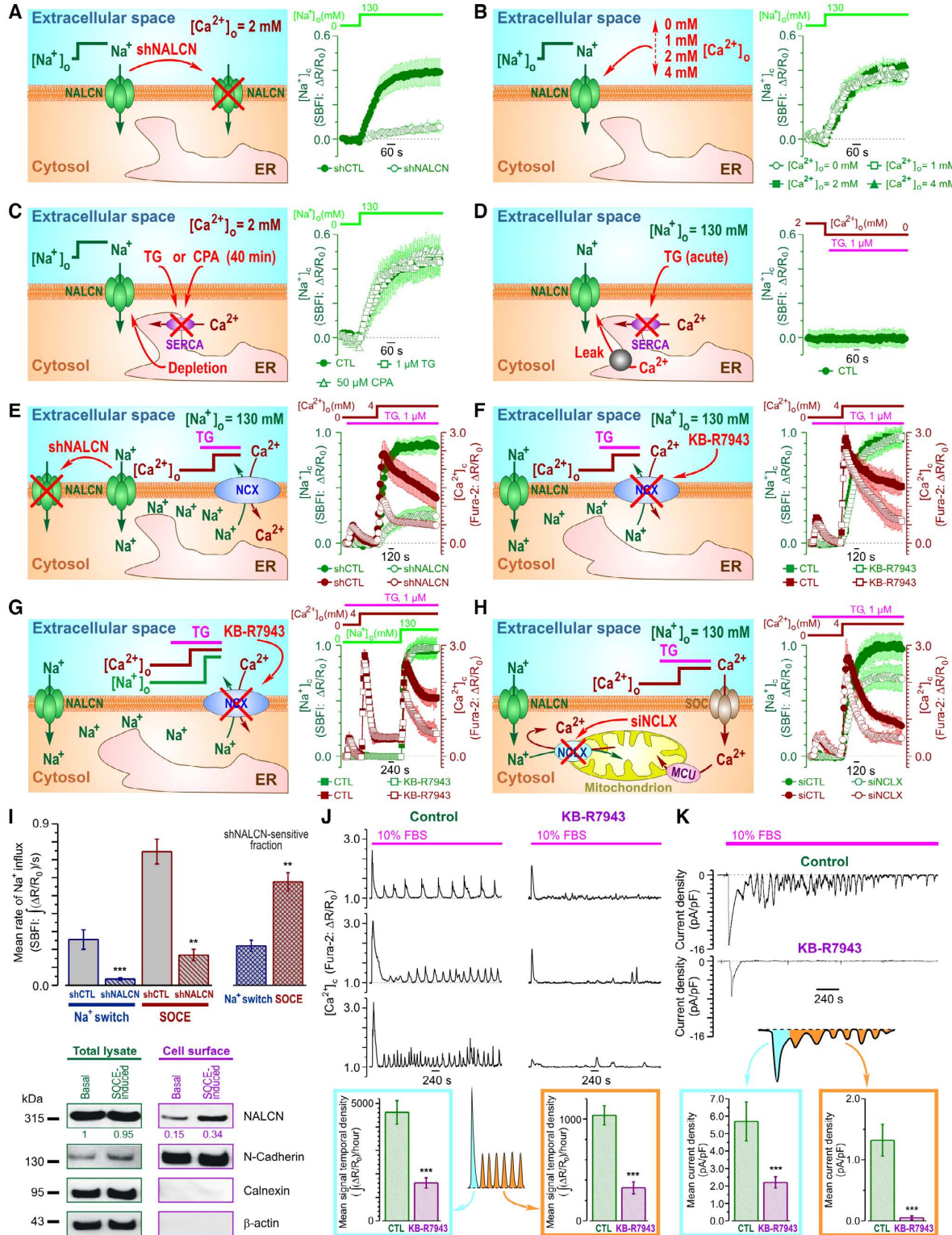


Figure 4.

Figure 4. Interplay between SOCE, NALCN, NCX and NCLX in PC-3 cells.

A–D Cytosolic Na⁺ concentration ([Na⁺]_c) changes reported by ratiometric Na⁺ indicator SBFI following (A–C) switch of extracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_o) from 0 to 130 mM or (D) application of 1 μM thapsigargin (TG). The effects of: (A) NALCN knockdown, (B) extracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_o) and (C) Ca²⁺ store depletion.

E–H Store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)-induced changes of [Na⁺]_c (SBFI) and [Ca²⁺]_c (Fura-2). The effects of: NALCN knockdown (E), the reverse-mode plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger (RM-NCX) inhibitor KB-R7943 (1 μM) either at [Na⁺]_o = 130 mM (F) or upon [Na⁺]_o switch from 0 to 130 mM following SOCE activation (G), and knockdown of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, siNCLX (H).

I SOCE augments NALCN-mediated Na⁺ influx (top) by addressing NALCN to plasma membrane (bottom).

J, K The effect of KB-R7943 (1 μM) on FBS-induced [Ca²⁺]_c responses (Fura-2, ΔR/R_o) and inward current (perforated patch, V_h = –80 mV), respectively.

Data information: Data show mean ± SEM. The cartoons (A–H) highlight experimental design and the plots show mean ± SEM traces (n = 45–501) of SBFI (olive) and Fura-2 (wine) fluorescence with the axes (ΔR/R_o) presented in corresponding color. Plots (I, top) compare mean rates of Na⁺ influx induced by [Na⁺]_o-switch (n = 283–360) and SOCE (n = 180–216), and their shNALCN-sensitive fractions. Immunoblotting (I, bottom) compares NALCN expression in total cell lysates and biotinylated fractions before and after SOCE induction. Numbers show (in corresponding color) mean values (n = 3) of NALCN protein levels (band intensity) normalized to N-Cadherin, Calnexin and β-actin. The bar diagram plots show mean signal temporal densities (J, n = 20) and mean current densities (K, n = 6–8) during initial transient (cyan) and oscillations (orange). n = number of cell. **P < 0.01, ***P < 0.001, unpaired two-tailed Student's t-test.

Source data are available online for this figure.

readmission following SOCE activation (Fig 4G). Comparison of the effects of NALCN-KD on Na⁺ influx caused by the [Na⁺]_o switch (Fig 4A) with that triggered by SOCE (Fig 4E) revealed that SOCE significantly augmented NALCN-mediated Na⁺ influx (Fig 4I, top). In addition, the cell-surface biotinylation assay reported that SOCE facilitates accumulation of NALCN protein in the plasma membrane (PM) (Fig 4I, bottom). Taking into account our previous demonstration that in prostate cancer cells the key event of SOCE activation is the interaction between the ER Ca²⁺ sensor STIM1 and highly selective Ca²⁺ channel protein ORAI1 resulting in accumulation of ORAI1 in the PM and Ca²⁺ influx (Dubois et al, 2014), inhibition of both SOCE and SOCE-induced Na⁺ influx by silencing of either ORAI1 or STIM1 (Fig EV4A) confirms further functional interplay between SOCE and NALCN.

The above results indicate that Ca²⁺ influx during SOCE (Fig 4E–I), but not Ca²⁺ release from the ER (Fig 4D) or Ca²⁺ store depletion *per se* (Fig 4C), enhances NALCN-mediated Na⁺ influx by promoting translocation of NALCN protein to the PM (Fig 4I, bottom). In turn, the rise in cytosolic Na⁺ concentration ([Na⁺]_c) facilitates Ca²⁺ influx either via reverse mode of plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger, RM-NCX (Figs 4F and G, and EV4B), and/or by relieving SOCE inactivation. The latter may involve mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCLX), which was shown previously to affect SOCE via modulation of reactive oxygen species (ROS) production (Ben-Kasus Nissim et al, 2017). Consistent with this, we have found that NCLX silencing indeed suppressed SOCE (Figs 4H and EV4C; Appendix Fig S1G).

Thus, in view of the obtained results the following sequence of events in PC-3 cells can be proposed: NALCN-mediated Na⁺ influx → NCLX-mediated Ca²⁺ extrusion from mitochondria → decrease of ROS production → relief of SOCE inactivation. At the same time, attenuation of the FBS-induced [Ca²⁺]_c events (both the initial transient and oscillations) by the RM-NCX inhibitor KB-R7943 (Fig 4J), suggests that NALCN-mediated Na⁺ influx facilitates RM-NCX-mediated Ca²⁺ entry, while inhibition of FBS-induced inward current by this compound (Fig 4K) indicates that this Ca²⁺ entry encourages NALCN-mediated Na⁺ influx. This positive feedback between NALCN and RM-NCX is, most likely, the mechanism sustaining the [Ca²⁺]_c oscillations. The modulation of the feedback via the ER Ca²⁺ recycling is also tuned by SOCE and RM-NCX. We also verified that in contrast to LNCaP and C4-2 cells (both lacking NALCN), the Na⁺

influx, attributed to the NALCN-mediated current in PC-3 cells is tetrodotoxin (TTX) – resistant (Fig EV4D–G). This pharmacological profile—sensitivity to Gd³⁺ but not to TTX—is similar to neuronal NALCN (Lu et al, 2007).

NALCN – NCLX Functional coupling recruits mitochondria to regulation of [Ca²⁺]_c oscillations

The tight functional coupling between SOCE and NALCN (Figs 4 and EV4A), the dependence of [Ca²⁺]_c oscillations on NALCN-mediated Na⁺ influx (Fig 3D–F) and the involvement of NCLX in SOCE regulation (Figs 4H and EV4C) via ROS-mediated oxidation of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel protein Orail (Ben-Kasus Nissim et al, 2017), suggest that, apart from RM-NCX (Fig 4J), the NALCN-mediated Na⁺ influx may also regulate [Ca²⁺]_c oscillations via NCLX. Indeed, NCLX would exchange mitochondrial Ca²⁺ to Na⁺ delivered via NALCN, and hence oppose Ca²⁺ uptake by the mitochondrial Ca²⁺ uniporter (MCU) and subsequent ROS production.

Consistent with this, we observed that the FBS-induced [Ca²⁺]_c oscillations were associated with oscillations of (i) [Ca²⁺]_{mito} (Fig 5A) and (ii) mitochondrial superoxide (O₂[•]) production (Fig 5B). Also, application of H₂O₂ (endogenous product of O₂[•]) suppressed the [Ca²⁺]_c oscillations (Fig 5C).

In support of the above hypothesis, we have also found that NCLX silencing (siNCLX, Appendix Fig S1G) dramatically attenuated the FBS-induced [Ca²⁺]_c oscillations (Fig 5D). Interestingly, the initial [Ca²⁺]_c transient caused by the FBS application had significantly longer duration in the cells pre-treated with siNCLX, likely due to suppression of SERCA by enhanced ROS production by mitochondria lacking NCLX (Qin et al, 2014). Thus, interplay between Ca²⁺ and Na⁺ signals not only would affect mitochondrial Ca²⁺ shuttling and mitochondrial redox status (Ben-Kasus Nissim et al, 2017), but also serve to maintain persistent [Ca²⁺]_c oscillations required for Src activation (Sun et al, 2014).

NALCN regulates secretion of ECM-degrading enzymes in Ca²⁺-dependent manner

In cancer cells, secretion of ECM-degrading enzymes is the principal mechanism facilitating extracellular proteolysis and invasion

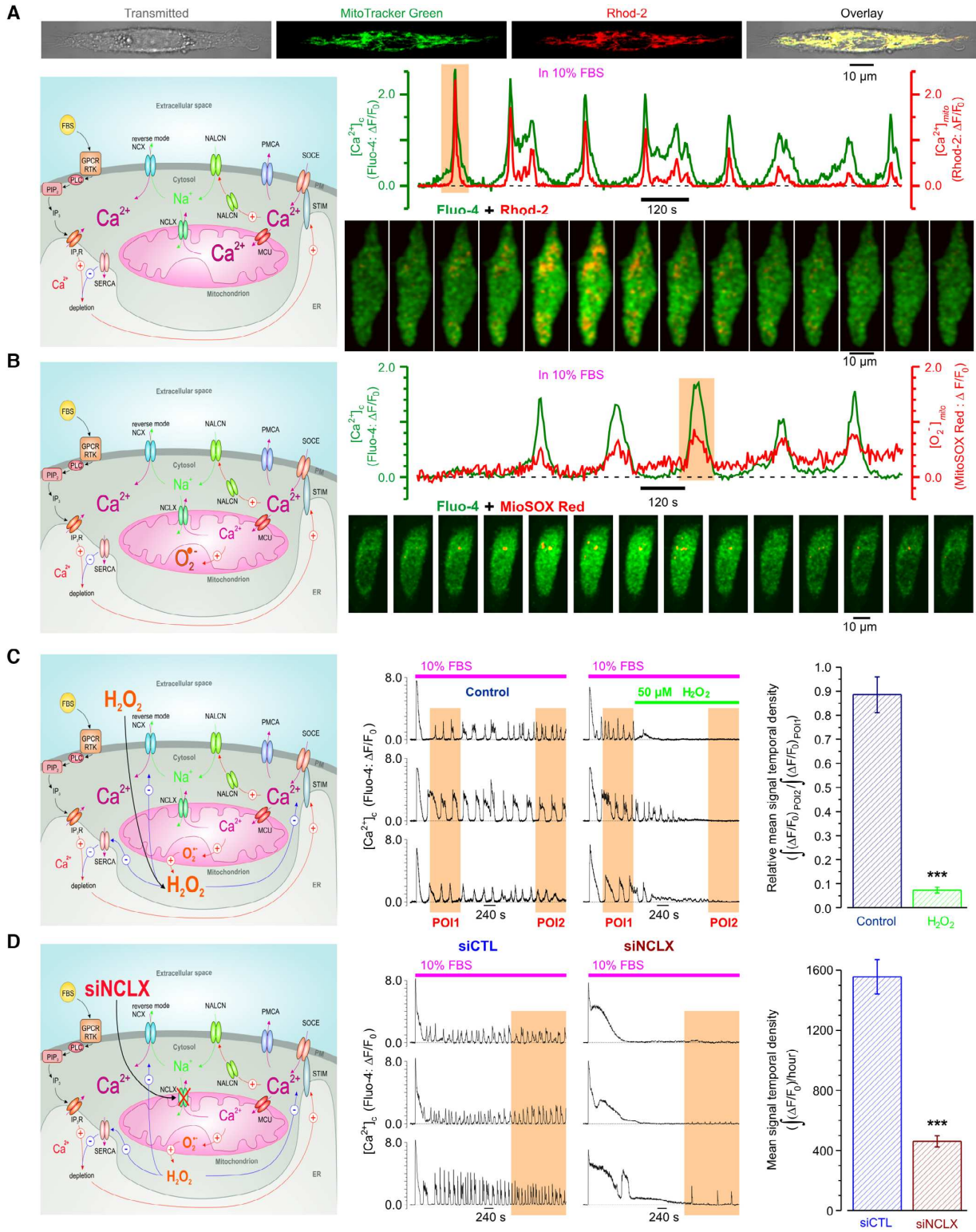


Figure 5.

Figure 5. NALCN and recruitment of mitochondria to $[Ca^{2+}]_c$ oscillations in PC-3 cells.

- A Top: visualization of mitochondria with MitoTracker Green confirms mitochondrial origin of Rhod-2 signal. Middle: FBS-induced $[Ca^{2+}]_c$ oscillations (Fluo-4) are associated with $[Ca^{2+}]_{mito}$ oscillations (Rhod-2). Bottom: every 2nd image from the highlighted (orange background) period.
- B Top: FBS-induced $[Ca^{2+}]_c$ oscillations (Fluo-4) are associated with oscillations in O_2^- production by mitochondria (MitoSOX Red). Bottom: every 3rd image from the highlighted (orange background) period.
- C O_2^- metabolite, H_2O_2 , suppresses FBS-induced $[Ca^{2+}]_c$ oscillations (Fluo-4).
- D Suppression of NCLX with siNCLX attenuates $[Ca^{2+}]_c$ oscillations (Fluo-4).

Data information: In (C), mean signal temporal density during POI2 was normalized to that during POI1 in control ($n = 58$) and in 50 μM of H_2O_2 ($n = 74$), and compared. In (D), mean signal temporal densities during highlighted periods were compared in control ($n = 18$) and following 48 h pretreatment with siNCLX ($n = 17$). Bar diagram plots: mean \pm SEM $n =$ number of cell, $***P < 0.001$, unpaired two-tailed Student's t -test. Cartoons (left) highlight experimental design and assessed signaling pathways. Note that Na^+ delivered to the cytosol by NALCN, on the one hand, activates RM-NCX, while on the other hand, is exchanged by NCLX to Ca^{2+} thus restricting elevation of $[Ca^{2+}]_{mito}$ and, hence, production of superoxide (O_2^-) and H_2O_2 , which is known to inhibit SERCA, RM-NCX and SOCE elements. Source data are available online for this figure.

(Friedl & Wolf, 2008). To assess a role of NALCN in regulation of secretion in aggressive prostate cancer cells, we have analyzed the effect of NALCN bioavailability on the rate of FBS-induced secretion visualized by dynamic 3D confocal imaging of FM1-43 fluorescent reporter pre-accumulated in the secretory vesicles of starved PC-3 cells (Fig 6A). We have found that presence of NALCN proved to be critical for controlling both the rate of vesicle secretion by PC-3 cells (Fig 6B, D and E) and the activity of ECM-degrading enzymes such as MMP-9 (Appendix Fig S1H). Furthermore, by comparison of the effect of Ca^{2+} chelators with different dynamic properties on the rate of this secretion, we have demonstrated that this process is not only Ca^{2+} -dependent, but is, in fact, regulated by $[Ca^{2+}]_c$ in microdomains, since both fast and slow Ca^{2+} chelators decreased the rate of secretion to different extents (Fig 6C–E).

NALCN promotes prostate cancer aggressiveness *In vivo*

Finally, we have analyzed the role of NALCN in cancer progression *in vivo* by using several mice models. Since phosphatase and tensin homolog (PTEN) is one of the most commonly deleted/mutated tumor suppressor genes in human prostate cancer, we utilized the PTEN-knockout mouse with conditional gene inactivation (floxed allele; L2) as our first *in vivo* model (Parisotto et al, 2018). Following prolonged treatment with tamoxifen, PTEN^{-/-} mice produced prostate adenocarcinoma, whereas PTEN^{-/-}p53^{-/-} developed more aggressive and invasive phenotype of prostate cancer. *Ex vivo* analyses performed on these prostate tumors revealed that NALCN was markedly upregulated in PTEN^{-/-}p53^{-/-} tumors (i.e., during progression of adenocarcinoma to aggressive phenotype characterized by high invasiveness of cancer cells), compared with the PTEN^{-/-} tumors (i.e., during initial tumorigenesis) (Fig 7A).

It is well known that prostate cancer frequently metastasizes to bone (in fact, the PC-3 cell line was originally derived from the bone metastases of a prostate cancer patient). Therefore, in our second *in vivo* model, we have compared the effect of the direct injection into the tibia of nude mice of the two types of PC-3 cells: (i) the control PC-3 cells expressing NALCN (shCTL: PC-3 Luc-shCTL) and (ii) NALCN depleted cells (shCTL: PC-3 Luc-shNALCN). The X-ray imaging revealed that the destruction of the bone tissue following the injection of the cells with NALCN-KD was significantly reduced in comparison to that induced by the injection of the control PC-3 cells (Fig 7B and C), while bioluminescence imaging showed that this effect was associated with attenuated metastatic spread of the injected PC-3 cells (Fig 7D).

In agreement with the above, performed on nude mice the intracardiac injection of PC-3 cells (our third *in vivo* model) revealed that permanent overexpression of NALCN in the injected cells significantly promotes the destruction of the bone tissue: in control group (PC-3 Luc) only 18% of mice (2/11) developed a single osteolytic lesion located in fibula in both cases, while in the group, injected with NALCN-overexpressing cells (+hNALCN), 64% of mice (7/11) developed multiple osteolytic lesions of larger volumes (Fig 7E) and various locations (fibula, tibia, hip, humeral, skull, and jaw bones).

Taking together, the results of our *in vivo* experiments demonstrate that the extent of PC-3-derived bone metastasis depends on bioavailability of NALCN in the prostate cancer cells (Fig 7B–E) and that its expression in these cells increases with prostate cancer aggressiveness (Fig 7A).

Discussion

Present study was undertaken to assess pro-invasive potential of neuronal-type Na^+ leak channel, NALCN, in prostate carcinogenesis

Figure 6. NALCN regulates vesicular secretion in Ca^{2+} -dependent manner.

- A 3D distribution of FM1-43-labeled secretory vesicles in PC-3 cell. Left: overlay of transmitted and x-y confocal images of FM1-43 fluorescence. Middle: confocal z-sections. Right: corresponding reconstructed 3D image.
- B, C The galleries of 3D images (every 25th image) compare FBS-induced degradation of FM1-43-labeled secretory vesicles in PC-3 cells: (B) pre-treated with either siCTL or siNALCN, and (C) in untreated (Control) PC-3 cells with those loaded with slow (EGTA-AM) or fast (BAPTA-AM) Ca^{2+} chelators, as indicated.
- D Corresponding traces of relative changes in total z-stack fluorescence, as indicated.
- E Plot: mean rates of secretion calculated as signal mass (cyan, left) per second.

Data information: Scale bar (A–C): 5 μm . Data (E): mean \pm SEM for siCTL ($n = 35$), siNALCN ($n = 40$), Control ($n = 45$), EGTA-AM ($n = 35$) and BAPTA-AM ($n = 62$). $n =$ number of cell, $***P < 0.001$; and n.s., not significant, unpaired two-tailed Student's t -test. Source data are available online for this figure.

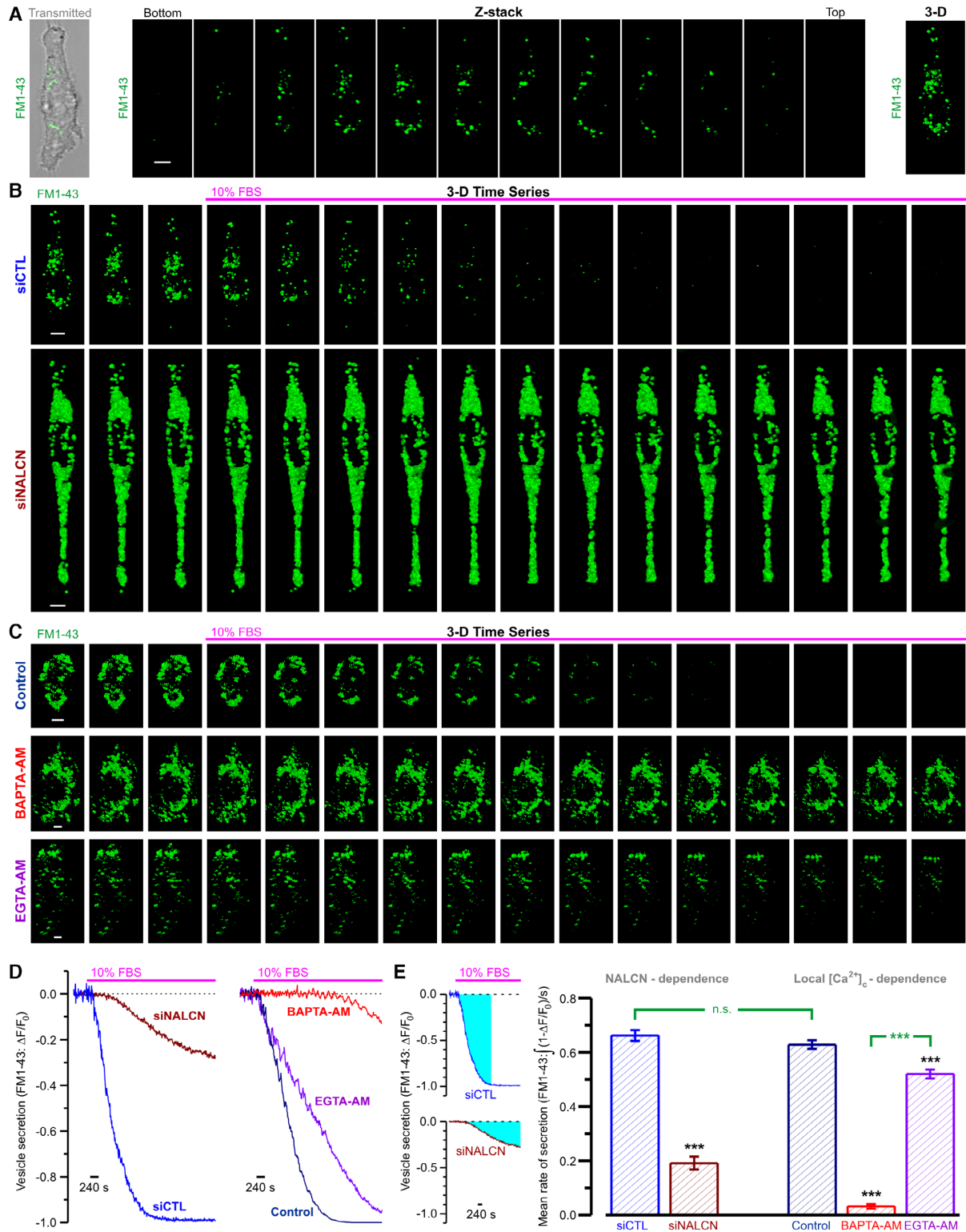


Figure 6.

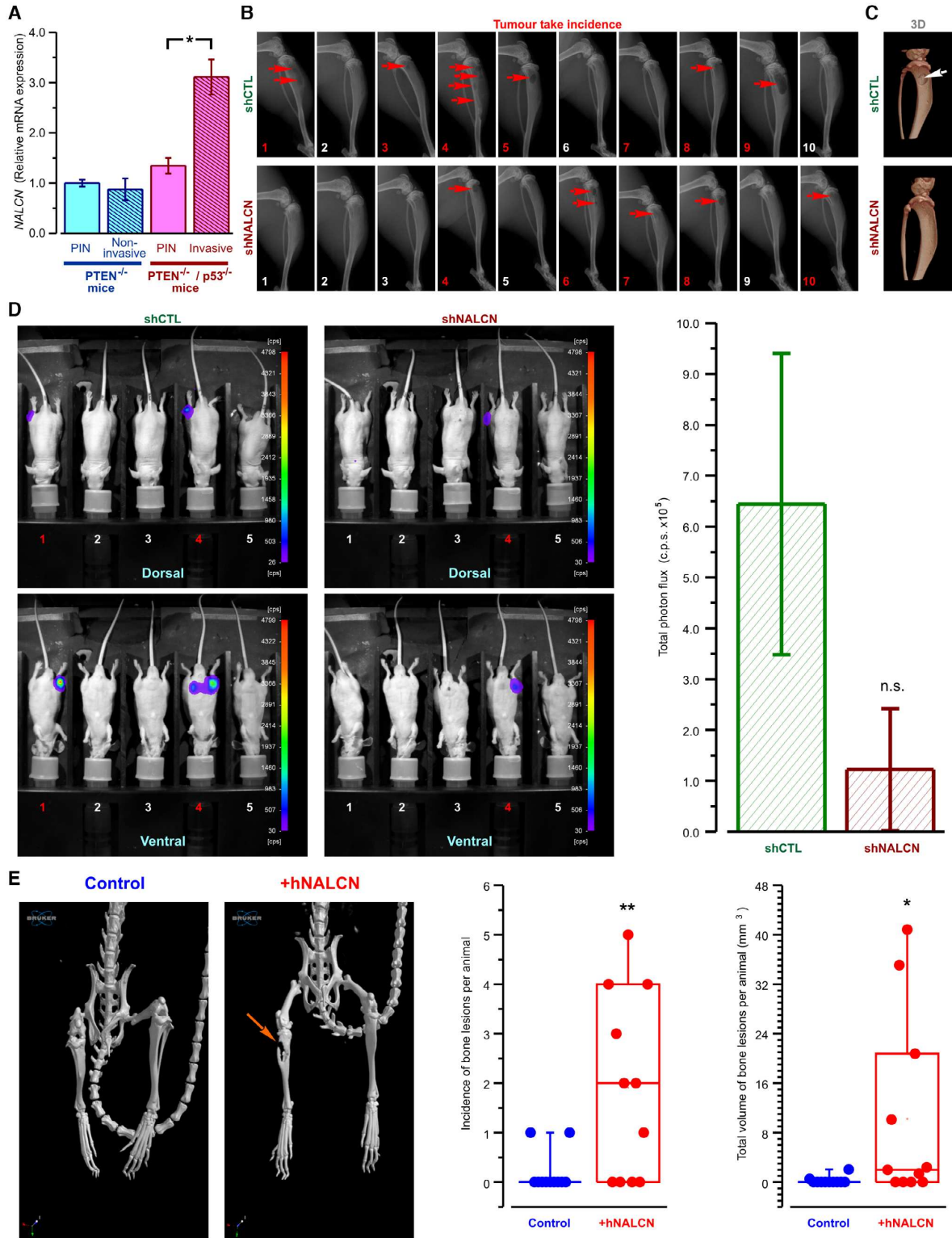


Figure 7.

Figure 7. In vivo and ex vivo analysis of the effect of NALCN bioavailability on metastatic spread.

A NALCN mRNA level was not different between prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) and non-invasive prostate adenocarcinoma of $PTEN^{0/pe-/-}$ mice. In contrast, invasive adenocarcinoma of $PTEN/p53^{0/pe-/-}$ mice exhibited significant upregulation of NALCN mRNA relative to corresponding PIN.

B X-ray images: osteolysis (arrow) 31 days after intra-tibial injection of control (shCTL: PC-3 Luc-shCTL) or NALCN depleted cells (shNALCN: PC-3 Luc-shNALCN).

C X-ray 3D images: osteolysis (arrow) 31 days after intra-tibial injection of PC-3-Luc-shCTL or PC-3-Luc-shNALCN cells.

D Left: Dorsal (top) and ventral (bottom) images of bioluminescence from mice 31 days after intra-tibial injection of control (shCTL: PC-3 Luc-shCTL) or NALCN depleted cells (shCTL: PC-3 Luc-shNALCN). Right: statistical comparison of total photon fluxes between the two groups of 10 mice (c.p.s., count of photons per second \pm SD).

E Left: x-ray 3D images obtained from mice 8 weeks after intracardiac injections with control (PC-3 Luc) and cells stably overexpressing NALCN (+hNALCN). Right: box plots compare the incidence and total volume of bone lesions between the two groups of 11 mice: central band shows the mean, the boxes show lower and upper quartiles and whiskers show maximum data values.

Data information: (A) Data from $PTEN^{0/pe-/-}$ mice were normalized to control $PTEN^{0/pe+/+}$ mice, whereas data from $PTEN/p53^{0/pe-/-}$ mice - to control $PTEN/p53^{0/pe+/+}$ mice. RT-qPCR data are normalized to GAPDH and TBP and presented as mean \pm SEM ($N = 5$). Red numbers and/or arrows in the images (B–E) depict tumor take incidence/bone lesions. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and n.s., not significant, two-tailed Mann–Whitney U test. Source data are available online for this figure.

using complex multidisciplinary approach involving: (i) prostate cancer-derived cell lines for elucidating mechanistic aspects of NALCN involvement in cellular signaling promoting invasive behavior, (ii) *in vitro* animal models for determining metastatic impact of NALCN on tumor xenografts and (iii) primary human prostate cancer biopsy tissues for correlating NALCN expression with clinical tumor scoring and staging. In this study we report on four major findings of the utmost importance for understanding the genesis of the prostate cancer invasiveness: (i) NALCN is overexpressed in highly metastatic prostate cancer cell lines and primary human prostate cancer metastasis; (ii) NALCN-mediated Na^+ entry in metastatic prostate cancer cell lines governs intracellular Ca^{2+} oscillations and promotes invadopodia formation and secretion of ECM-degrading proteolytic enzymes; (iii) activation of Na^+ entry via NALCN engages signaling pathway involving increased mitochondrial Ca^{2+} extrusion via NCLX, decreased mitochondrial ROS production, relief of SOCE inactivation by ROS, augmentation of plasma membrane SOCE and enhancement of Src kinase activity; and (iv) in the *in vivo* mice models NALCN expression determines metastatic potential of xenograft tumors and formation of bone metastasis.

NALCN channel was first discovered in neurons where its activity provides for constitutively depolarizing influx of Na^+ which decreases the cell resting membrane potential (V_r) by about 10 mV (Lu et al, 2007). Subsequently, NALCN gene expression was detected in several types of human cancers (reviewed in Cochet-Bissuel et al, 2014). Recently, it has been shown that the deletion of *Nalcn* from gastric adenocarcinomas in mice increased the number of circulating tumor cells and distant metastasis in mice (Rahrmann et al, 2022). The authors also identified a number of nonsynonymous mutations and, using HOLE analysis (Jackson et al, 2001) and predicted that most of them in gastric and colorectal cancers as loss-of-function. Although this theoretical analysis provides an important background for further investigations, only functional studies of the mutated channel activity may deliver the information about significance of the selected mutations and unravel the molecular mechanisms linking loss of NALCN function to cell dissemination. It is now well established that oncochannelopathies could involve the same channel for distinct functions in different types of cancers and in a context dependent manner (for review see Prevarskaya et al, 2018). For example, one of the recent studies provides evidence that SOCE, in contrast to that reported previously (Sun et al, 2014), may also extinguish invasive behavior by specific molecular mechanism dependent on cholesterol

biosynthesis, and that the suppression of this mechanism promotes invasion and metastasis (Gross et al, 2022). Further studies are needed to understand the role of NALCN alterations in different types of human cancers.

In view of the fact that cancer cells' channelosome is known to undergo essential modification characterized by acquisition of ion channel types inherent to excitability (Prevarskaya et al, 2018), expression of neuronal-type channel, NALCN, in nonexcitable cancer cells, *per se*, is not surprising. Understanding of the promotion of particular cancer hallmark(s) by specific newly expressed channel(s) and of underlying intracellular signaling pathways is the problem of much greater practical significance.

Among the ion channels inherent in excitability, the voltage-gated Na^+ channels of Na_v1 family are specifically linked to cancer cells invasion and metastasis (Roger et al, 2007; House et al, 2010). It is believed that small steady-state "window current" through these channels is the major contributor to the cancer cells depolarized V_r and increased $[Na^+]_c$ (Roger et al, 2003; Gillet et al, 2009; Campbell et al, 2013), both of which are considered to be of importance in mediation of pro-invasive Na_v1 channel action. For instance, depolarization of the V_r due to $Na_v1.5$ activity in colon cancer cells was implicated in the transcriptional induction of invasion-related genes through protein kinase A (PKA), Rap1B, MEK, ERK1/2 signaling pathway (House et al, 2010, 2015), whereas in breast cells, the same feature was linked to modulation of F-actin polymerization and invadopodia formation (Brisson et al, 2013). Furthermore, in breast cancer cells, $Na_v1.5$ -mediated Na^+ entry was shown to underlie intra- and extracellular pH changes via Na^+/H^+ exchanger type 1 (NHE1) which, in turn, favored higher activity of secreted ECM-digesting proteases, cathepsins, thus, facilitating breast cancer cells invasiveness (Brisson et al, 2013).

With identification of NALCN in cancer cells, an essential part of depolarized V_r and enhanced Na^+ influx in these cells could be ascribed to activity of this channel. Our results, however, show that in highly metastatic prostate cancer cells, it is rather coupling of NALCN-mediated Na^+ influx to intracellular oscillatory Ca^{2+} signaling that promotes invasive behavior of the cells via formation of invadopodia and secretion of ECM-degrading proteolytic enzymes.

A number of Na^+ -permeable channels were suggested to influence $[Ca^{2+}]_c$ events in different cell models (Verkhatsky et al, 2018). In cancer cells, functional coupling of Na_v channels activity to intracellular Ca^{2+} signaling was predicted in human colon cancer (House et al, 2010). Later, it was shown that spontaneous

$[Ca^{2+}]_c$ oscillations in strongly metastatic human prostate and breast cancer cells were inhibited by Na_v channel blockers (Rizaner *et al*, 2016). However, the molecular mechanisms coupling Na^+ influx to $[Ca^{2+}]_c$ oscillations as well as their role in metastatic cell behavior remained largely unknown. The importance of Ca^{2+} signaling in invasion and invadosome function is currently emerging. Yet, the identification of the specific roles of ion channels at different steps of complex adhesive and degradative functions of invadosomes remains challenging. For example, it has been recently shown that TRPV4 calcium channel colocalizes with $\beta 1$ -integrins at the invadosome periphery and regulates coupling between actin-adhesive and degradative processes (Vellino *et al*, 2021).

In prostate cancer cells we have unraveled a novel, previously not anticipated pathway composed of several feedback elements through which NALCN-mediated Na^+ influx governs the oscillatory pattern of intracellular Ca^{2+} signaling, which, in turn, drives the invasive behavior (Appendix Fig S2). Importantly, we have found that this pathway involves mitochondrial Ca^{2+} handling, NCLX and ROS production which were recently referred to as important determinants of cancer growth and metastasis (Sun *et al*, 2014; Verkhratsky *et al*, 2018). It has been shown that on the one hand, SOCE is accompanied by a rise in cytosolic Na^+ concentration that, in turn, activates mitochondrial NCLX exchanging cytosolic Na^+ to mitochondrial Ca^{2+} ; on the other hand, SOCE activates a mitochondrial redox transient which is dependent on NCLX and is required for preventing Orail inactivation (Ben-Kasus Nissim *et al*, 2017). Interestingly, the loss of NCLX has been reported as driver of metastasis in colon cancer, suggesting the mechanisms of the mitochondrial Ca^{2+} handling as therapeutic targets in metastatic colorectal cancer (Pathak *et al*, 2020). This pathway (Appendix Fig S2), that could be initiated by the EGF-mediated stimulation of RTK/GPCR, involves initial Ca^{2+} store depletion via derivation of Ca^{2+} -mobilizing second messenger, IP_3 , with ensuing activation of transmembrane SOCE. The resulting elevation of $[Ca^{2+}]_c$ facilitates NALCN translocation to PM channelosome to enable NALCN-mediated Na^+ entry and increase of $[Na^+]_c$ which, in turn, promotes additional Ca^{2+} influx via RM-NCX. Significant rise of $[Ca^{2+}]_c$ triggers Ca^{2+} uptake back into the ER via SERCA pump and MCU-mediated Ca^{2+} uptake into mitochondria. The latter facilitates production of ROS, which is known to inhibit SERCA (Patel & Brackenbury, 2015), RM-NCX (Liu & O'Rourke, 2013) and SOCE elements (Bogeski *et al*, 2012), and whose action is opposed by NCLX exchanging NALCN-delivered Na^+ to mitochondrial Ca^{2+} . This positive and/or negative feedbacks underlie generation of $[Ca^{2+}]_c$ oscillations maintaining the activity of Src, which is an essential component of NALCN channelosome. Active Src, in turn, phosphorylates downstream proteins (cortactin, dynamin and Tks5) recruiting them to actin polymerization regions and giving rise to invadopodia formation. RTK/GPCR activation is also linked to activation of the Rho family GTPase, Cdc42, leading to its binding with N-WASP and subsequent actin nucleation (Beatty & Condeelis, 2014). In addition, invadopodia maturation is facilitated by Ca^{2+} -dependent secretion of ECM-degrading MMPs.

The validity of this NALCN-dependent pathway was confirmed in the *in vivo* experimentation on mice xenograft tumors wherein xenografts produced by NALCN-KD cells were characterized by significant downsizing of skeletal metastases and reduction in bone tissue destruction.

Conclusion

In this study, we identified for the first time that the expression of NALCN is upregulated in human prostate carcinoma samples compared with normal tissues. We have found that NALCN is functional and promotes invasiveness and metastatic potential of prostate cancer cells by controlling the Na^+/Ca^{2+} signature. Specifically, we demonstrated a novel NALCN-mediated mechanism of cancer cell aggressiveness where long-term intracellular Ca^{2+} oscillations play a central role. These oscillations are controlled mainly by SOCE, NCX, NCLX, SERCA and ROS, and are necessary for Src kinase activation, invadopodia formation and Ca^{2+} -dependent vesicular secretion of ECM degrading enzymes. Furthermore, our results obtained in several mice models suggest that NALCN expression promotes the metastatic impact of prostate cancer *in vivo*.

In overall conclusion, our study identifies a novel ionic checkpoint during the metastatic transformation and pinpoint NALCN as a key player governing this process in prostate cancer.

Materials and Methods

Cell culture

LNCAp, DU 145 and PC-3 were from the American Type Culture Collection (ATCC®). C4-2 and PC-3M were kindly provided by Dr Florence Cabon (Cancer Research Centre of Toulouse, France) and by Dr Scott Fraser and Prof. Mustafa Djamgoz (Imperial College London, UK), respectively. In accordance with their origin/tumorigenic potential these cancer cell lines are classified as: LNCAp—lymph node/weakly metastatic (Horszewicz *et al*, 1980); C4-2—chimeric tumor induced by co-inoculating castrated mouse with LNCAp-derived subline and bone fibroblasts/weakly metastatic (Wu *et al*, 1994); DU 145 – brain/moderately metastatic (Stone *et al*, 1978); PC-3—bone/highly metastatic (Kaighn *et al*, 1979); and PC-3M—liver metastases induced by inoculating mouse with PC-3/highly metastatic (Kozlowski *et al*, 1984). Cells were cultured at 37°C in RPMI 1640 medium (Gibco™, Thermo Fischer Scientific) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco™) and 2 mM L-Glutamine (Gibco™).

Cell transfection

Cells were transfected with 2 μ g of corresponding construct or 50 nM of siRNA and 0.2 μ g of pmax GFP using either Nucleofector (Amaxa), or X-tremeGene HP DNA Transfection Reagent (Roche), or HiPerFect Transfection Reagent (QIAGEN).

Cloning procedures

The human NALCN cDNA was previously described (Swayne *et al*, 2009) and the mCherry cDNA was obtained from the pAAV-EF1a-mCherry plasmid (Addgene #114470). The human NALCN cDNA and the mCherry cDNAs were subcloned in the pLV-EF1a-IRES-Blast (Addgene #85133) using standard molecular biology techniques.

Lentiviral transduction

Lentiviruses were made at the Vectorology facility of Montpellier (<https://www.biocampus.cnrs.fr/index.php/en/>). Briefly, replication-deficient

lentiviruses were produced and titrated as described by co-transfection of the resulting constructs in HEK-293 T cells with the HIV-1 packaging plasmid psPAX2 (Addgene #12260) and the plasmid pMD2.G (Addgene #12259) that encodes the vesicular stomatitis virus glycoprotein envelope. Viruses were harvested and then concentrated. Titters were calculated as described (Naldini *et al.*, 1996). Once PC-3 cells that were seeded in 35 mm Petri dishes reached the confluence of 80–90%, they were transduced with 120.4 µg p24 of the lentiviral suspension.

Establishment of stable cell lines

48 h after transfection/transduction PC-3 cells were cultured with antibiotics (700 µg/ml G418; 2 µg/ml puromycin; 5 µg/ml blasticidin S). The establishment of stable cell lines was confirmed by RT-qPCR and immunoblotting analysis. In order to verify the luciferase activity 150 µg/ml of D-luciferin was used.

Chemicals

Chemicals were purchased from Invitrogen Life Technologies and Sigma-Aldrich Chemicals unless stated otherwise.

RNA purification and reverse transcription polymerase chain reaction

Organ tissues and cells were preserved in RNAlater™ (Sigma). Cellular RNA was purified with the NucleoSpin RNA Plus Kit (Macherey-Nagel). Organ tissues were homogenized with Precellys® Tissue Homogenizer and purified with TRIzol™ Reagent (Invitrogen). The cDNA from was obtained with the RNA reverse transcription (Applied Biosystems) following the DNase treatment (Ambion). Conventional RT-PCR was performed by using AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems) on C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad), whereas quantitative (RT-qPCR) - with SsoFast™ EvaGreen® (Bio-Rad) on CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System.

Immunoblotting

The cells were lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors, sonicated for 10 s and centrifuged at 13,000g for 10 min in order to eliminate nuclei. The concentration of protein lysate was measured with Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific). 1xSample Reducing Agent and 1xLDS Sample Buffer (Bolt™, Thermo Fisher Scientific) were added to 50 µg of protein lysate and heated at 95°C for 5 min. Proteins were resolved due to 3–8% Tris-acetate SDS-PAGE and transferred onto methanol-activated PVDF membrane with Pierce G2 Fast Blotter (Thermo Fisher Scientific). Afterwards, the blots were blocked with 5% milk TBS-T buffer (15 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.05% Tween20®, pH 7.4) for 1 h, and then incubated with antibodies. For HRP-conjugated secondary antibodies blots were developed using SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific) Images were captured with Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences).

Proliferation assay

Cells were plated into 96-well plates (10³ cells/well) and left overnight at standard growth conditions. At each desired time point,

cells were fixed with 50% Trichloroacetic acid at 4°C for 1 h. After removing fixative solution, cells were stained with 0.4% Sulforhodamine B (Santa Cruz) in 1% acetic acid. The dye taken up by cells was then dissolved in 10 mM Tris-base, pH 10.5. The absorbance was measured at 560 nm with TriStar² Multimodal Reader LB942 (Berthold Technologies).

Transwell® migration and invasion assay

Cells (75 × 10³/passage) were plated into upper compartment of 8 µm pore Transwell® inserts (Falcon™) in a serum-free media, whereas lower compartment was filled with standard growth media, as a chemoattractant. For invasion assay inserts were pre-coated with 1.25 mg/ml Matrigel™ Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson). After 16 h at 37°C, 5% CO₂ cells were fixed in ice-cold 100% methanol and stained with 1% crystal-violet in 25% methanol. Inserts were then washed and the upper area of the filter was rubbed dry to eliminate the non-migrated cells. The data acquisition was made using an inverted microscope DMIRE2 (Leica) at ×5 magnification. The results of the cell count from five randomly selected fields were averaged. At least two inserts for each condition were analyzed.

Electrophysiological recordings

Whole-cell transmembrane ion currents were recorded in perforated patch configuration at room temperature. The patch pipette solution supplemented with 100 µg/ml gramicidin was composed of (in mM): 150 KCl, 1 MgCl₂ and 10 HEPES; pH adjusted to 7.3 with KOH. The cells were bathed in solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 5 glucose and 10 HEPES; pH adjusted to 7.3 NaOH. Patch pipettes were made from borosilicate glass (WPI) and had free tip resistance 2–4 MΩ. The currents were recorded using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices), and analyzed offline using pClamp (Molecular Devices) and MicroCal Origin (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, USA).

Calcium and sodium imaging

The following solutions were used (in mM): (i) the Hank's balanced salt solution (HBSS) – NaCl 150, KCl 5, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, D-Glucose 10, HEPES 10; pH 7.4 with NaOH; (ii) Na⁺-free solution – choline chloride 150, MgCl₂ 1, KCl 5, CaCl₂ 2, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 with KOH; (iii) Ca²⁺-free solution – EGTA-NMDG 5, NaCl 150, MgCl₂ 3, KCl 5, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 with NaOH; (iv) high Ca²⁺ solution – NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 8, D-Glucose 5.6, HEPES 10; pH 7.4 with NaOH.

Cytosolic Ca²⁺ and Na⁺ concentrations were measured using Fura-2-acetoxymethyl ester (AM) (Interchim) and SBFI-AM (Interchim), correspondingly, as previously described (Iamshanova *et al.*, 2016). Briefly, the dyes were dissolved in DMSO containing 0.02% Pluronic® F127 and diluted in HBSS to the final concentrations: 1 and 7 µM, respectively. The fluorescence was excited with a xenon lamp (300 W) light using an illumination DG4 system (Sutter) equipped with excitation filter pair 340/26 nm and 387/11 nm (wavelength/bandwidth). The fluorescence was acquired with objective 20x using Superfluor Nikon Eclipse Ti-series inverted microscope equipped with the emission filter 510/84 nm and

coupled to an EMCCD camera Rolera EM-C2 (Qimaging), and processed using the Metafluor 7.7.5.0 software (Molecular Devices).

Confocal microscopy

Confocal imaging was performed with LSM 510 META confocal workstation using a Plan-Neofluar 40×1.3 NA or Plan-Apochromat 63×1.4 NA objectives (Carl Zeiss, Germany). The illumination intensity was attenuated to 0.5–6% (depending on the laser line) with an acousto-optical tunable filter (Zeiss, Oberkochen, Germany). To optimize signal quality, the pinhole was set to provide a confocal optical section 0.6–2.5 μm, depending on experimental protocol. To avoid any bleed-through of the fluorescence signal in multistaining experiments, fluorochromes with well separated excitation and emission spectra were used and imaging was performed using the frame-by-frame or line-by-line multitrack mode of the confocal scanner. The photomultiplier gain and offset in each optical channel were set individually to achieve similar signal intensity at each channel and remove sub-signal noise from the images. The adequacy of the imaging protocol applied to the multi-labeled cells was confirmed by control experiments with monolabeling.

Fluo-4, Mag-Fluo-4, GFP and FM1-43 were excited by 488 nm line of 500 mW Argon ion laser (Laser-Fertigung, Hamburg, Germany) and the fluorescence was captured at wavelengths 505–530 nm or above 505 nm. Alexa Fluor 546, mCherry, Cal-590TM, DsRed2 were excited by the 543 nm line of 5 mW Helium/Neon ion laser and the fluorescence was captured at wavelengths above 560 nm. CellMaskTM Plsama Membrane Stain was excited by 633 nm line of 15 mW Helium/Neon ion laser and the fluorescence was captured at wavelengths above 650 nm. The MitoSOXTM was excited by 514 nm line of a 500 mW Argon ion laser and the fluorescence was captured at wavelengths above 560 nm. DAPI was excited by 405 nm blue diode laser and the fluorescence was captured at 470–500 nm. Image processing was carried out using LSM 5 software (Zeiss, Oberkochen, Germany) and with custom routines written in IDL (Research Systems, Inc., Boulder, CO, USA). Statistical analysis was performed using MicroCal Origin (MicroCal Software Inc., Northampton, MA, USA).

Biotinylation

Protein extraction from cell surface fraction was performed with EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific).

Src-family kinase activity assay

After extraction of proteins (see above) without proteinase and phosphatase inhibitors, the Src activity was evaluated with ProFluor[®] Src-Family Kinase Assay (Promega).

Zymography

Zymography was performed using 1% gelatin 10% SDS-PAGE. The cells were grown in FBS-free media overnight. The condition media was centrifuged and the protein samples were extracted (see above) without addition of reducing agents and boiling. The zymograms were developed with 0.5% Coomassie G-250 in 30% ethanol and 10% acetic acid.

Tissue biopsies

Normal prostate tissues ($n = 58$) were obtained from patients without prostate cancer (PCa) underwent cystoprostatectomy for bladder carcinoma.

Hormone naïve clinically localized cancer samples (HNCLC; $n = 338$) were obtained from patients treated with radical prostatectomy for localized PCa.

Forty-eight cases of castration resistant prostate cancers (CRPC) were selected from patients treated with exclusive androgen deprivation therapy (ADT). Tissues were collected by transurethral resection, performed due to lower urinary tract symptoms associated with local tumor progression.

Twenty-one cases of metastatic prostate cancer were selected from patients with tissues available for analysis: either lymph nodes ($n = 14$) or bone ($n = 7$). Among these, five patients (all with bone metastasis) had been previously treated by hormone deprivation but revealed castration resistance.

Study approval

Written informed consents were obtained from patients in accordance with the requirements of the medical ethic committee (DC-2014–2045).

Prostate adenocarcinoma tissue microarray (PR484) was obtained from US Biomax, Inc.

Immuno-histochemical analysis

Slides were deparaffinized, rehydrated, and heated in citrate buffer with pH 6 for antigenic retrieval. After blocking for endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide, the slides were incubated with the primary antibodies. Immunohistochemistry was performed using the streptavidin-biotin-peroxydase method with diaminobenzidine as the chromogen (Kit LSAB, Dakocytomation, Glostrup, Denmark). Slides were finally counterstained with hematoxylin. In control experiments, corresponding primary antibodies were omitted from the staining protocol.

In vivo xenografts

Intra-tibial injections

SCID male mice, 6 weeks of age, were housed in barrier conditions under isolated laminar flow hoods. Mice bearing tumor xenografts were closely monitored for established signs of distress and discomfort. Intra-osseous tumor xenograft experiments were performed as previously described (Fradet *et al*, 2013): two PC-3 Luc cell lines (shCTRL 10 mice, shNALCN 10 mice) were suspended as 6×10^5 in 15 μL PBS and injected in the bone marrow cavity. Mice were sacrificed after 31 days. Radiographs (LifeRay HM Plus, Ferrania) of animals were taken at that time after inoculation using X-ray (MX-20; Faxitron X-ray Corporation). Hind limbs were collected for histology and histomorphometrics analysis. The bone lesion surface, that includes lytic and osteoblastic regions, was measured using the computerized image analysis system MorphoExpert (Exploranova). The extent of bone lesions for each animal was expressed in mm². Tibiae were scanned using microcomputed tomography (Skyscan1174, Skyscan) with an 8.1 μm voxel size and an X-ray tube (50 kV; 80 μA) with 0.5 μm aluminum filter. Three-dimensional

reconstructions and rendering were performed using the manufacturer's suite (Respectively, NRecon&CTVox, and Skyscan). Bone Volume/Tissue Volume (%BV/TV) includes residual trabecular and remaining cortical bone.

Intracardiac injections

5–6-week-old male NMRI Nude Mice (Charles River Laboratories) were injected into the heart with PC-3 Luc (11 mice) and cells stably overexpressing NALCN (11 mice) suspended in 100 μ l PBS. Computed tomography scans were performed on a fast microtomograph Bruker 1278 using an image pixel size of 51.4 μ m. The source voltage was 59 kV (753 μ A) with a 1 mm aluminum filter. A whole body acquisition consisted in two 360° scans with one projection acquired each 0.5°. Reconstructions were achieved with NRecon software (1.7.1.6, Bruker, Germany) and images were analyzed with CTvox software (3.3.0 r1403, Bruker, Germany) and DataViewer software (1.5.6.2, Bruker, Germany) to visualize respectively, the 3D skeleton volume and the transversal slices of scan areas. During the exam, mice were anesthetized with a mixture consisting of air/isoflurane 2% (Iso-Vet, Piramal Healthcare).

PTEN null mice models

PTEN null mice models used in this study were previously described (Parisotto *et al.*, 2018). In brief, gene ablation was induced by intraperitoneal injections of Tamoxifen (1 mg/mouse) daily for 5 days to 8-week-old mice in order to generate mutant PTEN^{(i)pe-/-} and PTEN/p53^{(i)pe-/-} mice (pe – prostate epithelium, (i) – induced). After Tamoxifen treatment 8-week-old mice developed prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) in both groups, whereas 72-week-old PTEN^{(i)pe-/-} mice developed noninvasive adenocarcinoma and 18-week-old PTEN/p53^{(i)pe-/-} mice developed invasive adenocarcinoma. Respective control mice (PTEN^{pe+/+} and PTEN/p53^{pe+/+}) were subjected to corresponding Tamoxifen administration and sacrificed at the given age.

Study approval

The project was approved by the French national ethical committee (APAFIS #2837-2015112314119496v2).

PTEN null mice were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Emory University (Atlanta, GA), which is accredited by the American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care.

Mice for intratibial and intracardiac injections were purchased from Charles River and handled according to the French Ministerial Decree No.87–848 of 19 October 1987.

Experimental protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Université Lyon-1 (France) (CEEA-55 Comité d'Éthique en Expérimentation Animale DR2014–32) and at CNRS Orléans (CECCOn°3) and received the number 19911 for authorization from the Ministerial Services.

Statistics

In vitro data were analyzed using two-tailed Student's *t*-test to assess the differences between groups. Pairwise comparisons were tested using a non-parametric two-tailed Mann–Whitney *U* test.

Immunohistochemical comparison between tissue biopsies groups was performed using the χ^2 test for categorical data and

non-parametric Mann–Whitney *U* test and Kruskal–Wallis tests for continuous data.

In vivo data for mice studies were compared using non-parametric two-tailed Mann–Whitney *U* test.

In all cases, *P*-values < 0.05 were considered significant. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), StatView, version 5.0, (Abacus Concepts, Berkeley, CA) and OriginPro 2015 Beta3 software (1991–2014 OriginLab Corporation). The figures were created using CorelDRAW 11.633 software (2002 Corel Corporation).

Data availability

We declare that the material of the present manuscript has been neither published nor submitted for publication elsewhere, in part or in whole. All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

Expanded View for this article is available [online](#).

Acknowledgments

We thank F. Cabon (Cancer Research Centre of Toulouse, France) and S. Fraser (Imperial College London, United Kingdom) for C4-2 and PC-3M cell lines, accordingly. We thank E. Dewailly (Inserm U1003, University of Lille, France) for help with reagents and cellular biology methods. We thank C. Slomianny, E. Richard and A.-S. Lacoste of the BICeL- Campus Scientific City Facility for access to instruments and technical advices. We are indebted to the Research Federation FRABio (University of Lille, CNRS, FR 3688, FRABio, Biochimie Structurale et Fonctionnelle des Assemblages Biomoléculaires) for providing the scientific and technical environment conducive to achieving this work. We thank Dr. C. Lemmers (Vectorology facility, PVM, Biocampus Montpellier, CNRS UMS3426) for lentivirus production. We thank C. Lagadec and R.-A. Toillon for help with their flow-cytometry facility (Inserm U908, University of Lille, France). We thank Daniel Metzger (Inserm U1258, University of Strasbourg, France) and Emmanuelle Germain (Inserm U1003, University of Lille, France) for providing us with cDNA from PTEN null mice model. We also thank Pr. Stephan Reshkin (University of Bari) and Pr. Philippe Chavrier (Curie Institute, Paris) for helpful discussions. O. I. was funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer, France (R22016EE) and Laboratory of Excellence in Ion Channel Science and Therapeutics. H. I. is co-funded by both Naresuan University (Thailand) and the French Embassy in Thailand. G.S was funded by AIRC (IG-2018/ID 21315). The research in the authors' laboratory is supported by INSERM, la Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée), Institute for Cancer Research (grant 2014–166); Le Ministère de l'Éducation Nationale, the Region Nord/Pas-de-Calais, la Fondation de Recherche Médicale, and l'Association pour la Recherche sur le Cancer.

Author contributions

Antoine Folcher: Formal analysis; investigation; methodology; writing – review and editing. **Dmitri Gordienko:** Conceptualization; data curation; formal analysis; investigation; writing – original draft; writing – review and editing. **Oksana Iamshanova:** Data curation; formal analysis; investigation; writing – original draft. **Alexandre Bokhobza:** Investigation. **George Shapovalov:** Investigation. **Dheeraj Kannancheri-Puthooru:** Investigation. **Pascal Mariot:** Investigation. **Laurent Allart:** Investigation. **Emilie Desruelles:** Investigation. **Corentin Spriet:** Investigation. **Raquel Díez:** Investigation. **Thibault Oullier:** Resources; investigation. **Séverine Marionneau-Lambot:** Resources; investigation. **Lucie Brisson:**

Investigation. **Sandra Geraci:** Investigation. **Hathaichanok Impheng:** Investigation. **V'yacheslav Lehen'kyi:** Investigation. **Aurelien Haustrate:** Investigation. **Adriana Mihalache:** Data curation; investigation. **Pierre Gosset:** Data curation; investigation. **stephanie chadet:** Resources; investigation. **Stéphanie Lerondel:** Resources; investigation. **Stéphanie Retif:** Resources; investigation. **Julien Sobilo:** Resources; investigation. **Maryline Laube:** Resources; investigation. **Giulia Villari:** Investigation. **Guido Serini:** Investigation. **Alessandra Fiorio Pla:** Investigation. **Sébastien Roger:** Investigation. **Gaëlle Fromont:** Data curation; investigation. **Mustafa Djamgoz:** Investigation. **Philippe Clézardin:** Investigation. **Arnaud Monteil:** Investigation. **Natalia Prevarskaya:** Conceptualization; data curation; supervision; validation; visualization; writing – original draft; writing – review and editing.

Disclosure and competing interests statement

We declare that the authors do not have any competing interests related to this manuscript. All authors have approved the manuscript for submission to EMBO Journal.

References

- Beatty BT, Condeelis J (2014) Digging a little deeper: the stages of invadopodium formation and maturation. *Eur J Cell Biol* 93: 438–444
- Ben-Kasus Nissim T, Zhang X, Elazar A, Roy S, Stolwijk JA, Zhou Y, Motiani RK, Gueguinou M, Hempel N, Hershinkel M et al (2017) Mitochondria control store-operated Ca^{2+} entry through Na^{+} and redox signals. *EMBO J* 36: 797–815
- Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, Gingras M, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Wu J, Chang DK et al (2012) Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491: 399–405
- Bogeski I, Kilch T, Niemeyer BA (2012) ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J Physiol* 590: 4193–4200
- Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, Rubino R, Besson P, Labbal F, Chevalier S et al (2013) $NaV1.5$ Na^{+} channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* 126: 4835–4842
- Campbell TM, Main MJ, Fitzgerald EM (2013) Functional expression of the voltage-gated Na^{+} -channel $Nav1.7$ is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell lung cancer cells. *J Cell Sci* 126: 4939–4949
- Cochet-Bissuel M, Lory P, Monteil A (2014) The sodium leak channel, NALCN, in health and disease. *Front Cell Neurosci* 8: 1–17
- Djamgoz MBA, Fraser SP, Brackenbury WJ (2019) *In vivo* evidence for voltage-gated Sodium Channel expression in carcinomas and potentiation of metastasis. *Cancers* 11: 1675
- Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmir B, Lepage G, Slomianny C, Borowiec A, Bidaux G, Benahmed M et al (2014) Remodeling of channel-forming ORAI proteins determines an oncogenic switch in prostate cancer. *Cancer Cell* 26: 19–32
- Fradet A, Sorel H, Depalle B, Serre CM, Farlay D, Turtoi A, Bellahcene A, Follet H, Castronovo V, Clézardin P et al (2013) A new murine model of osteoblastic/osteolytic lesions from human androgen-resistant prostate cancer. *PLoS One* 8: e75092
- Friedl P, Wolf K (2008) Tube travel: the role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 68: 7247–7249
- Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bognoux P, Lalmanach G, Le Guennec JY (2009) Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* 284: 8680–8691
- Gross S, Hooper R, Tomar D, Armstead AP, Shanas N, Mallu P, Joshi H, Ray S, Chong PL-G, Astsurov I et al (2022) Suppression of $Ca(2+)$ signaling enhances melanoma progression. *EMBO J* 41: e110046
- Haneder S, Giordano FA, Konstantin S, Brehmer S, Buesing KA, Schmiedek P, Schad LR, Wenz F, Schoenberg SO, Ong MM (2015) ^{23}Na -MRI of recurrent glioblastoma multiforme after intraoperative radiotherapy: technical note. *Neuroradiology* 57: 321–326
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajzman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK et al (1980) The LNCaP cell line - a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37: 115–132
- House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG et al (2010) Voltage-gated Na^{+} channel $SCN5A$ is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 70: 6957–6967
- House CD, Wang B-D, Ceniccola K, Williams R, Simaan M, Olender J, Patel V, Baptista-Hon DT, Annunziata CM, Silvio Gutkind J et al (2015) Voltage-gated Na^{+} channel activity increases colon cancer transcriptional activity and invasion via persistent MAPK signaling. *Sci Rep* 5: 11541
- Iamshanova O, Mariot P, Lehen'kyi V, Prevarskaya N (2016) Comparison of fluorescence probes for intracellular sodium imaging in prostate cancer cell lines. *Eur Biophys J* 45: 765–777
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA (2001) Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15: 3243–3248
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979) Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16–23
- Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, Xu ZL, Kaighn ME, Hart IR (1984) Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res* 44: 3522–3529
- Liu T, O'Rourke B (2013) Regulation of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger by pyridine nucleotide redox potential in ventricular myocytes. *J Biol Chem* 288: 31984–31992
- Lu B, Su Y, Das S, Liu J, Xia J, Ren D (2007) The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for Normal respiratory rhythm. *Cell* 129: 371–383
- Lu B, Su Y, Das S, Wang H, Wang Y, Liu J, Ren D (2009) Peptide neurotransmitters activate a cation channel complex of NALCN and UNC-80. *Nat Rev Cancer* 457: 741–744
- Lu B, Zhang Q, Wang H, Wang Y, Nakayama M, Ren D (2010) Extracellular calcium controls background current and neuronal excitability via an UNC79-UNC80-NALCN Cation Channel complex. *Neuron* 68: 488–499
- Monteith GR, Prevarskaya N, Roberts-Thomson SJ (2017) The calcium-cancer signalling nexus. *Nat Rev Cancer* 17: 367–380
- Murphy DA, Courtneidge SA (2011) The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 413–426
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11382–11388
- Parisotto M, Grelet E, El Bizri R, Dai Y, Terzic J, Eckert D, Gargowitsch L, Bornert JM, Metzger D (2018) PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence *in vivo*. *J Exp Med* 215: 1749–1763

- Patel F, Brackenbury WJ (2015) Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer. *Int J Dev Biol* 59: 357–366
- Pathak T, Gueguinou M, Walter V, Delierneux C, Johnson MT, Zhang X, Xin P, Yoast RE, Emrich SM, Yochum GS et al (2020) Dichotomous role of the human mitochondrial Na⁺/Ca²⁺/Li⁺ exchanger NCLX in colorectal cancer growth and metastasis. *Elife* 9: e59686
- Prevorskaya N, Skryma R, Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 11: 609–618
- Prevorskaya N, Skryma R, Shuba Y (2018) Ion channels in cancer: are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev* 98: 559–621
- Qin F, Siwik DA, Pimentel DR, Morgan RJ, Biolo A, Tu VH, James Kang Y, Cohen RA, Colucci WS (2014) Cytosolic H₂O₂ mediates hypertrophy, apoptosis, and decreased SERCA activity in mice with chronic hemodynamic overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 306: 1453–1463
- Rahrmann EP, Shorthouse D, Jassim A, Hu LP, Ortiz M, Mahler-Araujo B, Vogel P, Paez-Ribes M, Fatemi A, Hannon GJ et al (2022) The NALCN channel regulates metastasis and nonmalignant cell dissemination. *Nat Genet* 54: 1827–1838
- Rizaner N, Onkal R, Fraser SP, Pristerá A, Okuse K, Djamgoz MBA (2016) Intracellular calcium oscillations in strongly metastatic human breast and prostate cancer cells: control by voltage-gated sodium channel activity. *Eur Biophys J* 45: 735–748
- Roger S, Besson P, Le Guennec J-Y (2003) Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616: 107–111
- Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal P-I, Lochmann S, Lei M, Bougnoux P, Gruel Y, Le Guennec J-Y (2007) Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 774–786
- Shah K, Patel S, Mirza S, Rawal RM (2018) Unravelling the link between embryogenesis and cancer metastasis. *Gene* 642: 447–452
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21: 274–281
- Sun J, Lu F, He H, Shen J, Messina J, Mathew R, Wang D, Sarnaik AA, Chang W, Kim M et al (2014) STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol* 207: 535–548
- Swayne LA, Mezghrani A, Varrault A, Chemin J, Bertrand G, Dalle S, Bourinet E, Lory P, Miller RJ, Nargeot J et al (2009) The NALCN ion channel is activated by M3 muscarinic receptors in a pancreatic β -cell line. *EMBO Rep* 10: 873–880
- Vellino S, Oddou C, Rivier P, Boyault C, Hiriart-Bryant E, Kraut A, Martin R, Coute Y, Knölker HJ, Valverde MA et al (2021) Cross-talk between the calcium channel TRPV4 and reactive oxygen species interlocks adhesive and degradative functions of invadosomes. *J Cell Biol* 220: e201910079
- Verkhatsky A, Khananshvil D, Trebak M, Sekler I, Perocchi F (2018) Crosslink between calcium and sodium signalling. *Exp Physiol* 103: 157–169
- Wu H, Hsieh J, Gleave M, Brown N, Pathak S, Chung W (1994) Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer* 57: 406–412
- Zaric O, Pinker K, Zbyn S, Strasser B, Robinson S, Minarikova L, Gruber S, Farr A, Singer C, Helbich TH et al (2016) Quantitative sodium MR imaging at 7 T: initial results and comparison with diffusion-weighted imaging in patients with breast tumors. *Radiology* 280: 39–48



License: This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

Expanded View Figures

Figure EV1. NALCN in human prostate cancer cells: expression, function, localization and role in metastatic hallmarks.

- A RT-qPCR for NALCN channelosome genes in human prostate cancer (PCa) cell lines, as indicated. Inset (top left) shows conventional PCR for the same cell lines (left to right) for NALCN, and 2 housekeeping gene GAPDH and TBP.
- B Inset: elevation of intracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_i) in SBFI-loaded cells from 5 different human prostate cancer cell lines upon gradually increasing 5-min steps of extracellular Na⁺ concentration ([Na⁺]_o): from 1.7 to 3.5, 7, 14, 27.5, 55 and 110 mM. The bar diagram plot: recalculated mean rates of Na⁺ influx.
- C, D [Na⁺]_o switch – induced Na⁺ influx in weakly (C) and strongly (D) metastatic prostate cancer cells. Note that Na⁺ influx was augmented by transient NALCN overexpression (+NALCN) in C4-2 cells (C) and was suppressed by transient NALCN silencing with siRNA (siNALCN) in PC-3 cells (D). Left: mean traces of self-normalized SBFI fluorescence reflect the dynamics of Na⁺ influx caused by [Na⁺]_o switch from 0 to 130 mM. Right: corresponding mean rates of Na⁺ influx calculated as SBFI signal mass per second.
- E Effect of NALCN bioavailability on PC-3 cell invasion reported by Transwell[®] Matrigel invasion assay. Transient transfection (72-h incubation) with either siRNA targeting firefly luciferase (siCTL); or empty vector pcDNA3.1 (Vector only), or siRNA-1 (siNALCN), or pcDNA3.1-NALCN-HA (+NALCN). Stable downregulation was achieved with shNALCN.
- F Effect of NALCN bioavailability on cell proliferation rate reported by sulforhodamine B assay.
- G Co-localisation of NALCN with invadopodia markers - cortactin and MT1-MMP: confocal images (left), 2D intensity histograms (middle) and statistical analysis (right).

Data information: RT-qPCR data (A) are normalized to *GAPDH* and *TBP*. Data show mean ± SEM: *N* = 5 (A), *n* = 40–60 (B), *n* = 27–62 (C), *n* = 203–241 (D), *N* = 4 (E), *N* = 3 (F), *n* = 17 MT1-MMP and *n* = 7 cortactin (G). *N* = biological replicate, *n* = number of cell ****P* < 0.001, two-tailed Student's *t*-test (C, D). **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and n.s., not significant, two-tailed Mann–Whitney *U* test (E, F).

Source data are available online for this figure.

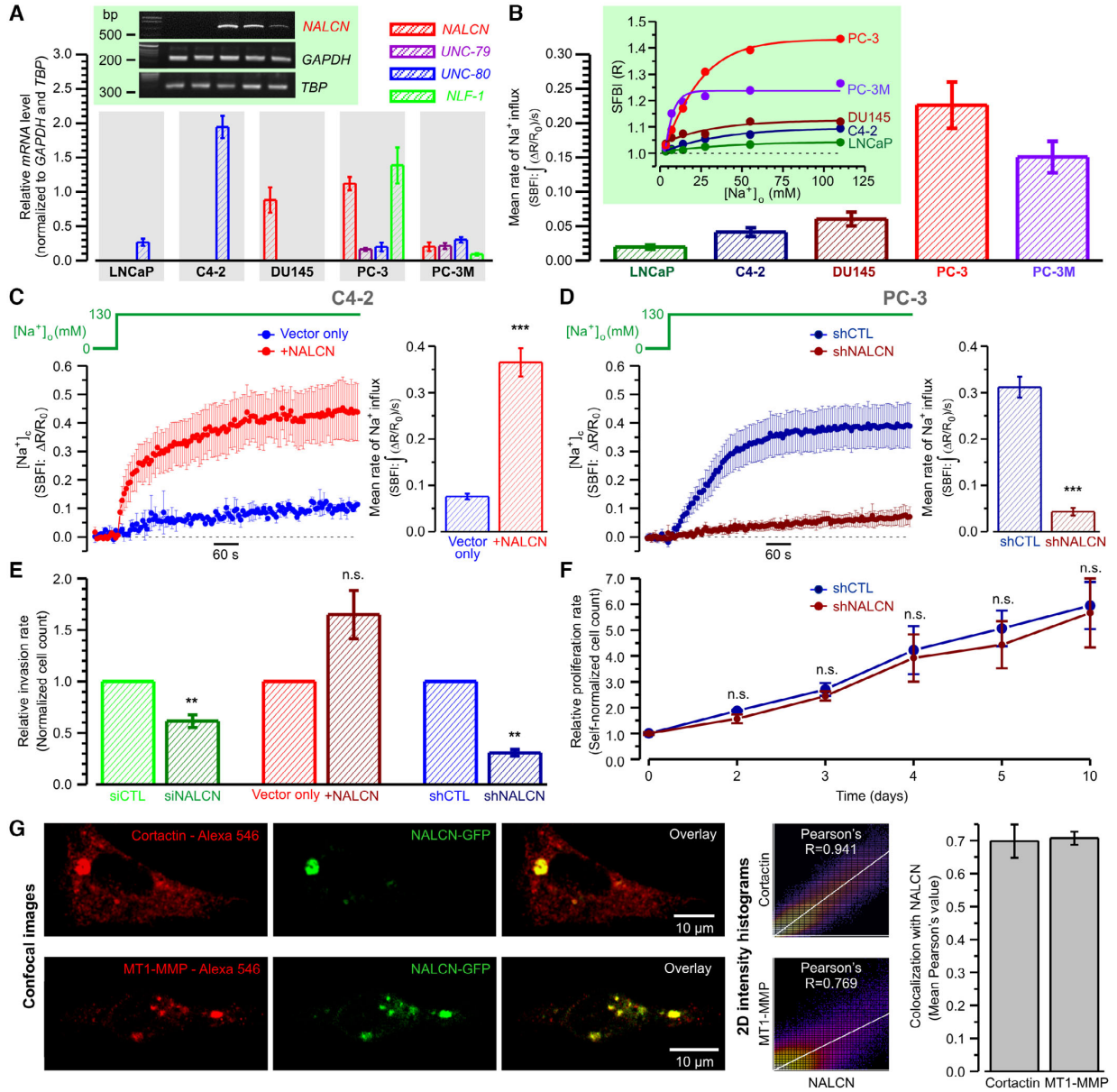


Figure EV1.

Figure EV2. FBS-induced $[Ca^{2+}]_c$ response in PC-3 cells is associated with changes in PI(4,5)P₂, N-WASP/Cdc42, dynamin and Actin consistent with initiation of invadopodia formation.

- A Left: confocal images of PH-PLC₂₁ - GFP fluorescence captured before and 1 min after stimulation with 10% FBS, and their rainbow-coded 3D shaded-surface plots. Right: corresponding traces of relative ($R = F_{\text{plasmalemma}}/F_{\text{cytosol}}$) changes in GFP fluorescence (green), reflecting translocation PH-PLC₂₁ from the plasma membrane to cytosol caused by PI(4,5)P₂ degradation, and in Cal-590 fluorescence (red) reflecting $[Ca^{2+}]_c$ dynamics.
- B Left: near cell bottom confocal (< 0.8 μm) images of wGBD - RFP fluorescence before and 2 min after stimulation with 10% FBS. Note puncta formation (arrows) reflecting spots where Cdc42 is activated to bind N-WASP. Right: corresponding traces of relative changes in RFP fluorescence (red), reflecting the dynamics of Cdc42 activation, and in Fluo-4 fluorescence (green) reflecting $[Ca^{2+}]_c$ dynamics.
- C Left: near cell bottom confocal (< 0.8 μm) images of PC-3 cell transfected with F-actin marker LifeAct - mCherry were captured before and 3 min after stimulation with 10% FBS. Note F-actin-enriched structures (arrows) induced by stimulation with FBS. Right: corresponding traces of relative changes in mCherry fluorescence (red), reflecting F-actin dynamics, and in Fluo-4 fluorescence (green) reflecting $[Ca^{2+}]_c$ dynamics.
- D Left: near cell bottom confocal (< 0.8 μm) images of PC-3 cell transfected with Dynamin 2 - mCherry were captured before and 2 min after stimulation with 10% FBS. Note dynamin puncta (arrows) induced by stimulation with FBS. Right: corresponding traces of relative changes in mCherry fluorescence (red) reflecting the dynamics of the dynamin puncta formation and in Fluo-4 fluorescence (green) reflecting $[Ca^{2+}]_c$ dynamics.

Data information: The galleries below the plots show images (A) or enlarged boxed regions of the images (B–D) captured during the periods highlighted on the plots by gray background: every 3rd image (A–C), every 35th image (D).

Source data are available online for this figure.

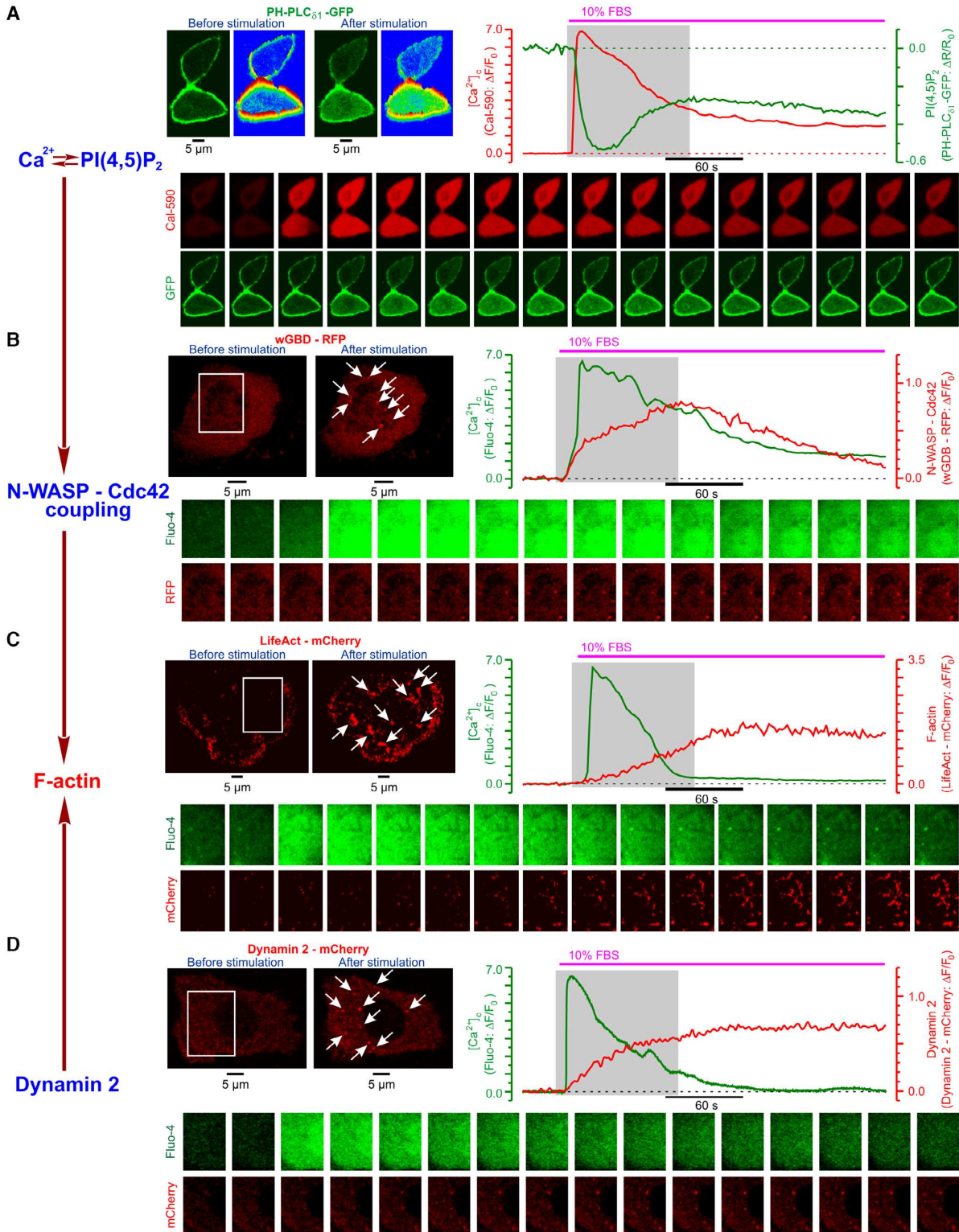


Figure EV2.

Figure EV3. Elevated Na⁺ influx in PC-3 cells overexpressing NALCN promotes FBS-induced [Ca²⁺]_i oscillations.

- A *NALCN* mRNA levels in PC-3 cells permanently overexpressing either luciferase (Vector only: PC-3 Luc) or *NALCN* (+h*NALCN*).
- B Left: mean traces of self-normalized SBFI fluorescence reflect the dynamics of Na⁺ influx caused by [Na⁺]_o switch from 0 to 130 mM in PC-3 Luc and +h*NALCN* cells (*n* = 141–287). Right: corresponding mean rates of Na⁺ influx calculated as SBFI signal mass per second.
- C Left: representative traces of the FBS-induced whole-cell current recorded in PC-3 cells using perforated patch-clamp technique. Note that overexpression of *NALCN* augments inward Na⁺ current. Right: the bar diagram plots compare mean current densities (*n* = 4–6) during initial transient (cyan) and oscillations (orange).
- D, E Representative traces of FBS-induced [Ca²⁺]_i responses reported by confocal time-series imaging of fluo-4 fluorescence. Note that overexpression of *NALCN* facilitates [Ca²⁺]_i oscillations in non-starved (D) and pre-starved (E) PC-3 cells.
- F Mean Fluo-4 signal temporal densities during highlighted periods were compared between PC-3 Luc and +h*NALCN* in non-starved (*n* = 259 and 254, respectively) and pre-starved (*n* = 360 and 317, respectively) cells.

Data information: Data show mean ± SEM RT-qPCR data (A) are normalized to *GAPDH* and *TBP* (*N* = 3). *N* = biological replicate, *n* = number of cell **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; two-tailed Mann–Whitney *U* test (A) or two-tailed Student's *t*-test (B,C and F). Source data are available online for this figure.

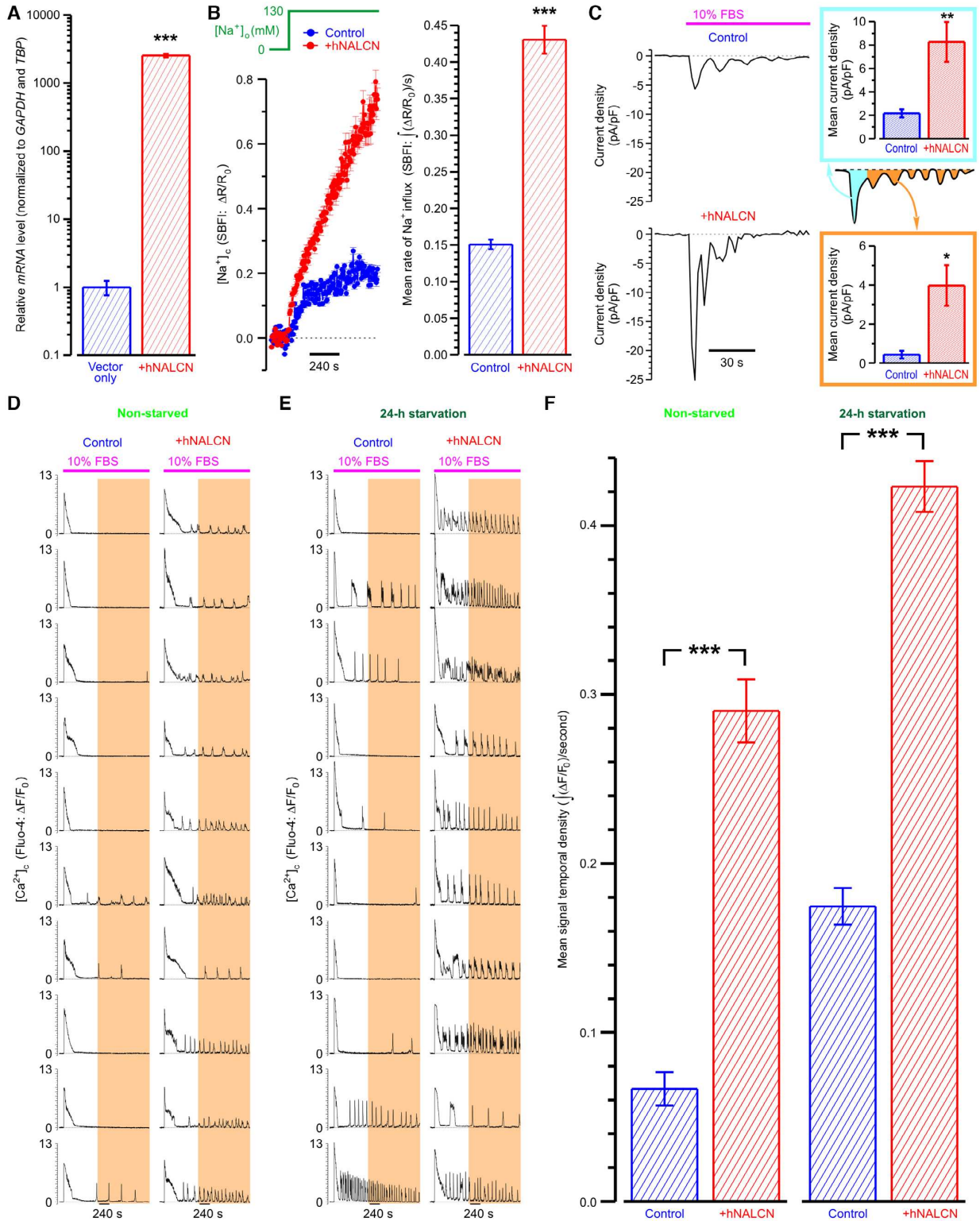


Figure EV3.

Figure EV4. Na⁺/Ca²⁺ signaling cascade in weakly and strongly metastatic prostate cancer cells recruit NALCN to different extents.

- A The effect of silencing of STIM1 or ORAI1 on SOCE-linked changes in [Ca²⁺]_c (Fura-2) and [Na⁺]_c (SBFI) in PC-3 cells.
- B The effect of pharmacological inhibition of the reverse-mode plasmalemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger (RM-NCX) on SOCE-linked changes in [Ca²⁺]_c (Fura-2) and [Na⁺]_c (SBFI) in PC-3 cells.
- C The effect of silencing (plot left: RT-qPCR) of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCLX) on SOCE-linked changes in [Ca²⁺]_c (Fura-2) and [Na⁺]_c (SBFI) in PC-3 cells.
- D–G Difference between weakly (D, E) and strongly (F, G) metastatic prostate cancer cells in pharmacological profile of [Na⁺]_o switch – induced Na⁺ influx (D, F) and FBS – induced inward current (E, G). Note that in strongly metastatic PC-3 cells both [Na⁺]_o switch – induced Na⁺ influx and FBS – induced inward current were significantly bigger than in weakly metastatic C4-2 cells. Also note that in PC-3 cells both responses were Gd³⁺-sensitive but tetrodotoxin (TTX)-resistant, while in C4-2 cells both responses were virtually completely abolished by 10 μM of either TTX or Gd³⁺.

Data information: Data show mean ± SEM of temporal profiles of the responses and corresponding estimated mean rates of Na⁺ and Ca²⁺ influx, as indicated, except for left panels (E, F) presenting individual whole-cell current traces (perforated patch, V_h = –80 mV); n = 109–182 (A), n = 132–501 (B, C), n = 702–772 (D), n = 4–5 (E, G), n = 1,117–1,571 (F). RT-qPCR (C) data are normalized to *GAPDH* and *TBP* in 3 biological replicates. n = number of cell *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and n.s., non-significant; two-tailed Student's t-test (A–D, F) or two-tailed Mann–Whitney U test (E, G).

Source data are available online for this figure.

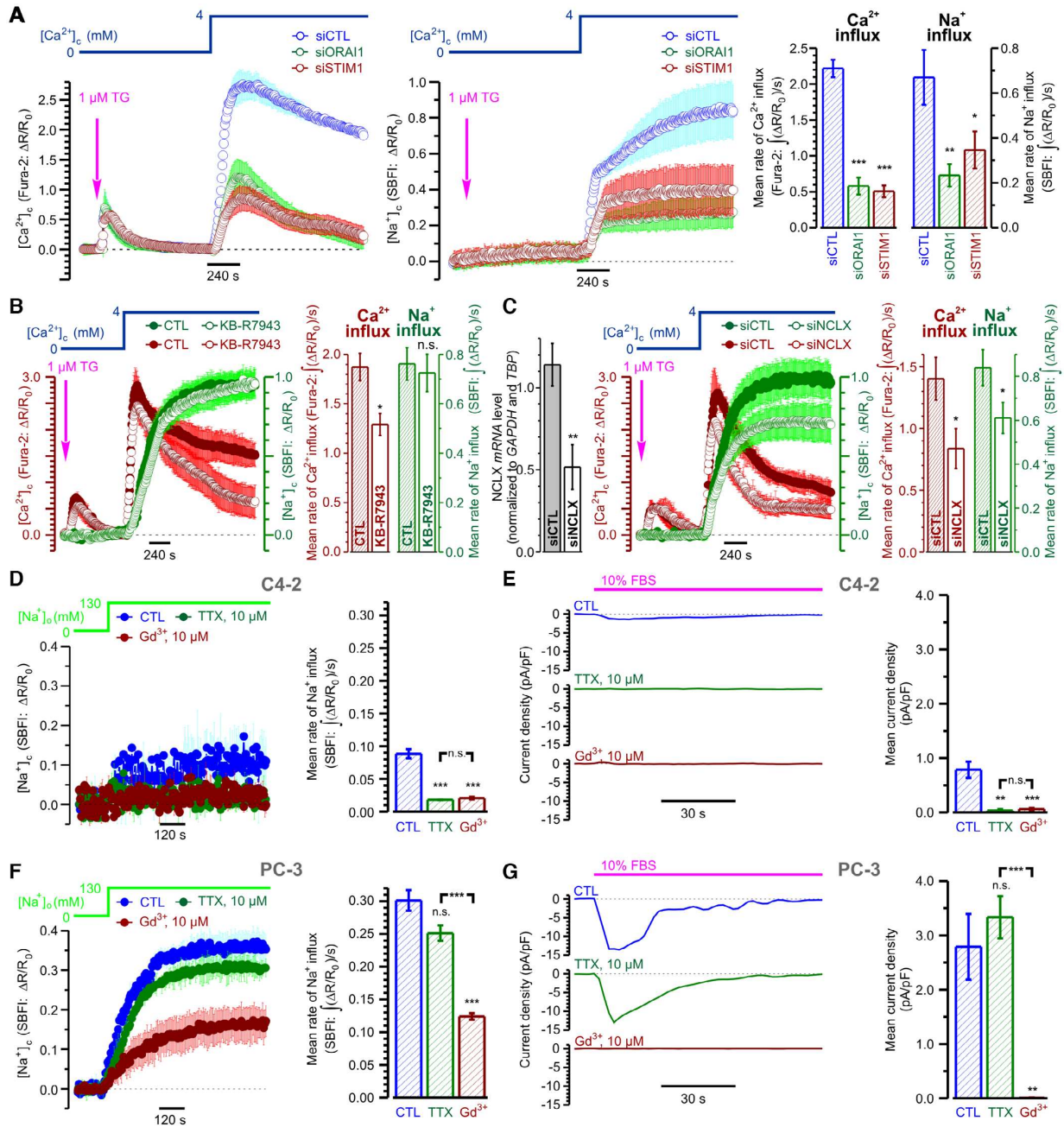
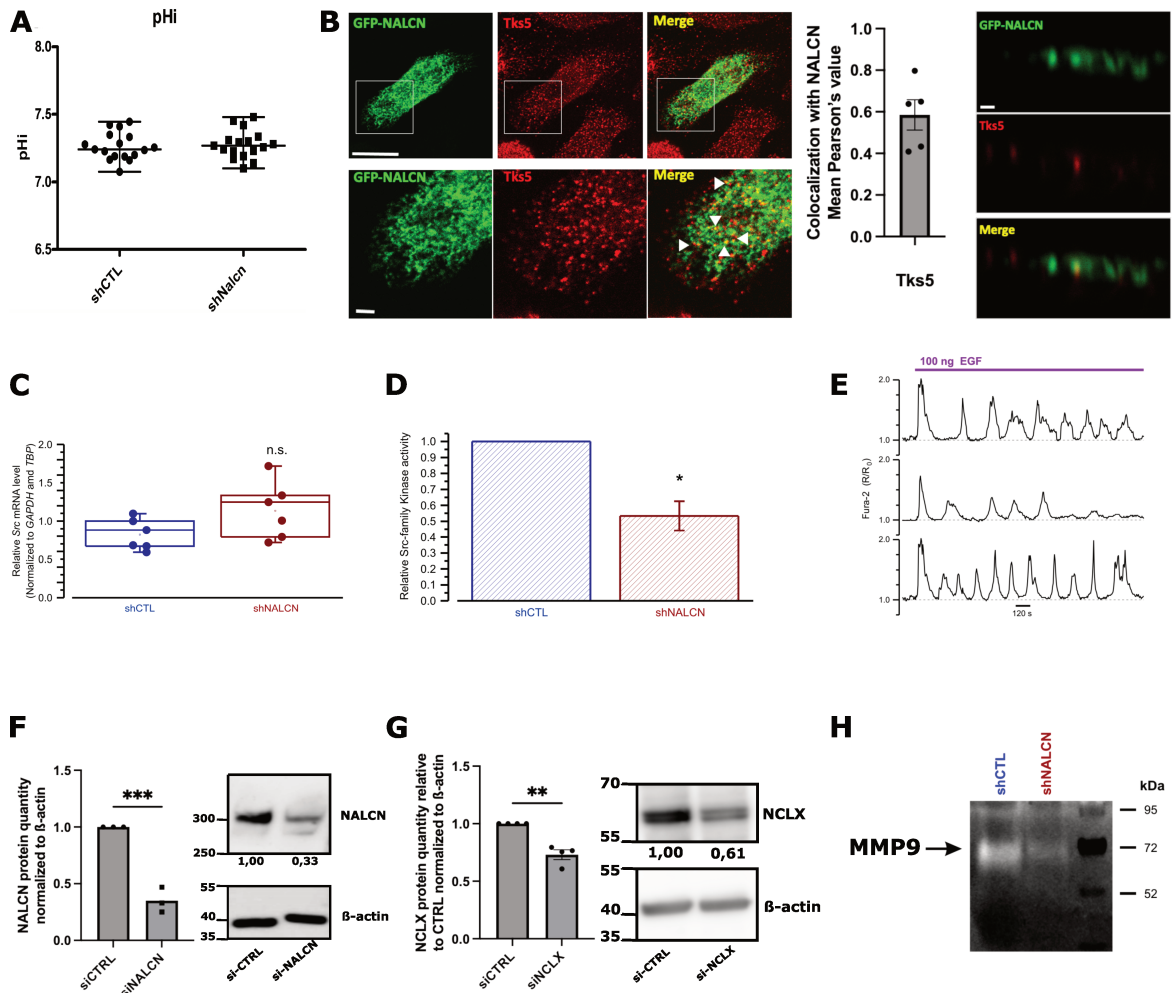


Figure EV4.

Table of content

Appendix Figure S1: NALCN expression effect on prostate cancer cell mechanism 1
Appendix Figure S2: schematic representation of signaling pathway employed by NALCN to
promote cancer cell invasiveness.....2



Appendix Figure S1 : NALCN expression effect on prostate cancer cell mechanism

A Intracellular pH was not affected by NALCN knockdown.

B (Left) Confocal microscopy images of PC3 cells plated on gelatin and transfected with NALCN GFP, treated with 10% FBS in RPM1 overnight, and stained for endogenous Tks5 (in red) to visualize invadosomes. Scale bar, 15 μ m. Lower inset panels highlight the colocalization of NALCN and Tks5. Scale bar, 1 μ m. (Middle) quantification of colocalization. (Right) Confocal microscopy XZ section of PC3 cells plated on gelatin and transfected with NALCN GFP treated with 10% RPM1 overnight and stained for endogenous Tks5 (in red) to visualize invadosomes. Scale bar, 1 μ m.

C Effect of NALCN bioavailability on Src mRNA expression reported by RT-qPCR.

D Effect of NALCN bioavailability on Src kinase activity reported by ProFluor® Src-Family kinase assay.

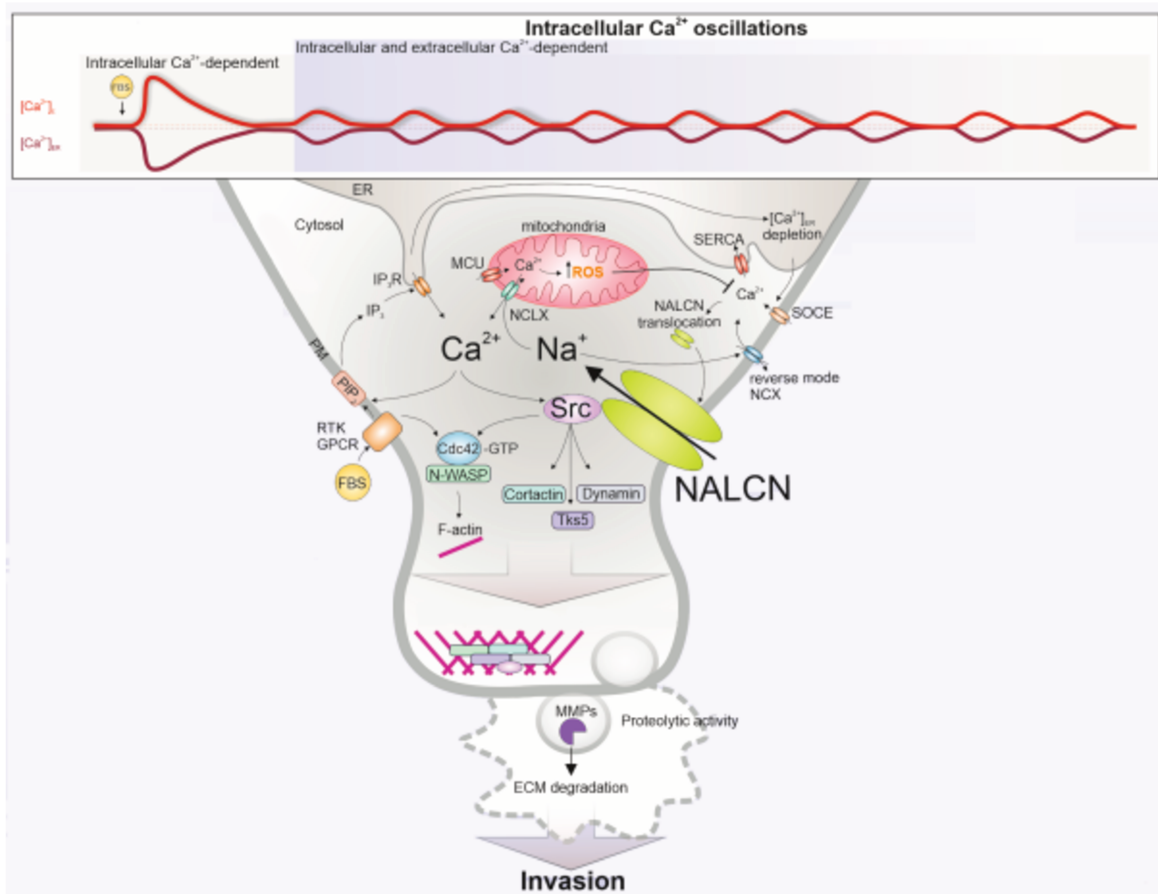
E Sample traces of epithelial growth factor (EGF)-induced $[Ca^{2+}]_c$ responses (Fura-2)

F Representative immunoblot with band intensities calculated for NALCN protein level and quantification of protein level expression in siCTRL and siNALCN.

G Representative immunoblot with band intensities calculated for NCLX protein level and quantification of protein level expression in siCTRL and siNCLX.

H Zymography compares gelatinase activity (72 kDa) in shCTL and shNALCN.

Data Information : RT-qPCR data (C) are normalized to GAPDH and TBP. Data are presented as mean \pm S.E.M n=4 (C), n=3 (F), n=4 (E) biological replicates. **P<0.01, two-tailed paired Student's t-test (F and G)



Appendix Figure S2: Schematic Representation of Signaling Pathways Employed by NALCN to Promote Cancer Cell Invasiveness.

Abbreviations: PM – plasma membrane, ER – endoplasmic reticulum, NALCN – Na⁺ leak channel non-selective, RM-NCX – reverse mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger, NCLX – mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, IP₃R – inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, SERCA –sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, MCU – mitochondrial Ca²⁺ uniporter, RTK – receptor tyrosine kinases, GPCR – G-protein coupled receptors, Src – proto-oncogene Src tyrosine kinase, N-WASP – neural Wiskott-Aldrich syndrome protein, ECM – extracellular matrix, MMPs – matrix metalloproteinases, GTP – guanosine-5'-triphosphate, ROS – reactive oxygen species, [Ca²⁺]_i – cytosolic Ca²⁺ concentration, [Ca²⁺]_{ER} – Ca²⁺ concentration in ER, [Ca²⁺]_{mito} – Ca²⁺ concentration in mitochondria, [Na⁺]_c – cytosolic Na⁺ concentration, [ROS]_{mito} – ROS concentration in mitochondria.

Briefly: (i) IP₃R-mediated Ca²⁺ release caused by FBS-induced activation of RTK/GPCR causes the ER Ca²⁺ depletion and SOCE; elevation of [Ca²⁺]_i in sub-PM microdomains facilitates NALCN translocation to PM and Na⁺ influx promoting RM-NCX and additional Ca²⁺ influx; this triggers SERCA-mediated Ca²⁺ uptake into the ER and MCU-mediated Ca²⁺ uptake into mitochondria; the latter facilitates production of ROS, known to inhibit SERCA, RM-NCX and SOCE elements, and is opposed by NCLX exchanging Na⁺, delivered by NALCN, to mitochondrial Ca²⁺; these positive and negative feedbacks give rise to [Ca²⁺]_i oscillations maintaining the activity Src, known as essential component of NALCN channelosome; active Src phosphorylates downstream proteins (cortactin, dynamin and Tks5) recruiting them to actin polymerization regions and giving rise to “invadopodia puncta”. (ii) RTK/GPCR activation is linked to activation of the Rho family GTPase, Cdc42, leading to its binding with N-WASP and subsequent actin nucleation. (iii) Invadopodia maturation is facilitated by Ca²⁺-dependent secretion of MMPs degrading ECM.

Discussion et perspective première partie

Le canalosome NALCN est donc exprimé dans les stades tardifs du cancer de la prostate et dans les lignées cellulaires les plus agressives. L'activité de ce canalosome participe à la régulation de l'invasion cellulaire en lien avec l'homéostasie calcique et plus particulièrement les oscillations calciques. En effet, les oscillations calciques qui sont nécessaires à la formation des invadopodes (structures primordiales dans le processus d'invasion) sont soutenues et exacerbées en présence du canalosome NALCN. L'inhibition dans ces cellules de ce canalosome induit également une inhibition de ces oscillations, ce qui réduit drastiquement la capacité invasive de ces cellules. Dans notre modèle d'étude, la stimulation de ces cellules par le SVF induit l'activation du processus SOCE qui est à l'origine d'une entrée calcique importante. L'activation du phénomène SOCE est également à l'origine d'une entrée de sodium qui est induite par le canalosome NALCN puisque l'inhibition de ce canalosome inhibe cette entrée sodique. L'entrée brusque de calcium induite lors du SOCE permet le stockage du calcium dans le RE, notamment par le biais de la pompe SERCA afin de renouveler le stock calcique. Mais ce calcium qui est en grande quantité dans le cytosol est également repris par d'autres organites tels que les mitochondries, qui vont être à l'origine de la génération d'espèce réactive à l'oxygène. L'entrée de sodium de façon quasi simultanée à l'entrée de calcium participe alors au contrôle de l'activité mitochondriale en permettant l'activité de l'échangeur NCLX. De plus cette entrée importante de sodium permet alors l'activation du mode « reverse » de l'échangeur NCX qui va à son tour favoriser une entrée de calcium dans la cellule. Cette entrée de calcium par le mode « reverse » de NCX est en grande partie responsable de la génération des oscillations calciques à l'origine de la formation des invadopodes et de la sécrétion des MMPs nécessaires à l'invasion. L'activité du canalosome NALCN permet ici le maintien des oscillations calciques nécessaire pour l'invasion. L'équipe de Rahrman à récemment mit en avant que la diminution de l'expression de NALCN dans les cellules cancéreuses circulantes est à l'origine d'une augmentation des métastases (Rahrman *et al*, 2022). Leur modèle d'étude porte sur l'utilisation de cellules circulantes qui vont alors adhérer aux vaisseaux pour s'extraire et permettre le développement de métastases. Notre modèle se base sur la tumeur primaire et l'échappement de cette tumeur pour permettre les métastases, mais avant que ces cellules ne soient dans la circulation sanguine. Il est envisageable que pour la sécrétion de MMPs nécessaire à l'invasion tissulaire pour atteindre les vaisseaux sanguins, le canalosome NALCN soit nécessaire. En revanche, une fois les cellules dans la circulation sanguine, il n'est peut-être plus nécessaire d'exprimer ce canalosome. En effet une fois dans la circulation l'expression de ce canalosome permettant l'invasion en

favorisant la sécrétion de MMPs ne semble pas être le but premier de ces cellules. Une réorganisation de l'expression du génome en faveur de l'expression de gène de résistance à l'anoikis entre autres pourrait expliquer la différence d'expression de NALCN dans nos modèles. Notre modèle montre l'évolution d'expression de ce canalosome sur la tumeur primaire aux différents stades, et son rôle important dans le processus d'invasion. Il serait intéressant de suivre l'évolution de ce canalosome lorsque ces cellules se retrouvent dans la circulation sanguine. Nous pourrions envisager un système microfluidique permettant de mimer la circulation sanguine afin de suivre l'expression du canalosome NALCN dans ces cellules.

Des perspectives thérapeutiques peuvent être envisagées puisque NALCN participe par son activité au contrôle de l'invasion cellulaire. Potentiellement diminuer l'activité de ce canal pourrait alors induire une diminution de l'invasion ; c'est ce qui a été initié par la production d'un anticorps visant le pore de NALCN en première perspective. Nous avons également pu mettre en évidence que le canal NALCN subit une translocation à la membrane plasmique qui permet la régulation de son activité. Une deuxième perspective serait de définir les acteurs responsables de la translocation de ce canal, et quelques résultats préliminaires sont présentés ci-après. De plus, nous savons qu'il existe une réexpression de ce canal dans les cellules cancéreuses prostatiques, de ce fait une troisième perspective serait de comprendre le mécanisme de régulation de l'expression de NALCN dans ces cellules cancéreuses prostatiques. Et enfin, est-ce que l'expression de NALCN est présente dans d'autres pathologies cancéreuses et ces résultats peuvent-ils s'appliquer dans d'autres cancers.

1. Modulation de l'activité du canal NALCN

Avec l'aide d'une société spécialisée dans le développement d'anticorps, nous avons défini un épitope d'intérêt. Cet épitope outre extracellulaire se trouve sur une partie du pore de la protéine ce qui théoriquement permet avec l'encombrement stérique de l'anticorps d'inhiber l'activité de ce canal. L'anticorps a été développé chez des lapins, puis purifié après leurs exsanguinations. Malheureusement, la théorie et la pratique sont deux choses distinctes, et les résultats sur l'entrée sodique induite par le canal NALCN lors de l'utilisation de cet anticorps purifié sont décevants (Figure 46). En effet, aucune différence significative sur l'entrée de sodium n'a pu être mise en évidence lors de l'utilisation de cet anticorps.

La non-efficacité de cet anticorps sur l'activité de canal aurait pu être associée à une mortalité des cellules traitées par celui-ci. Pour répondre à cette question, des tests de viabilités cellulaires réalisés par MTS n'ont montré aucun effet de la présence de cet anticorps dans le milieu de culture. De même, les tests sur l'invasion cellulaire réalisés en chambre de Boyden

ne montrent aucun effet quant à l'invasion. Ceci semblait attendu puisque cet anticorps ne semble pas avoir d'activité sur la fonction de canal et que la fonction du canal NALCN a été associée à l'invasion cellulaire.

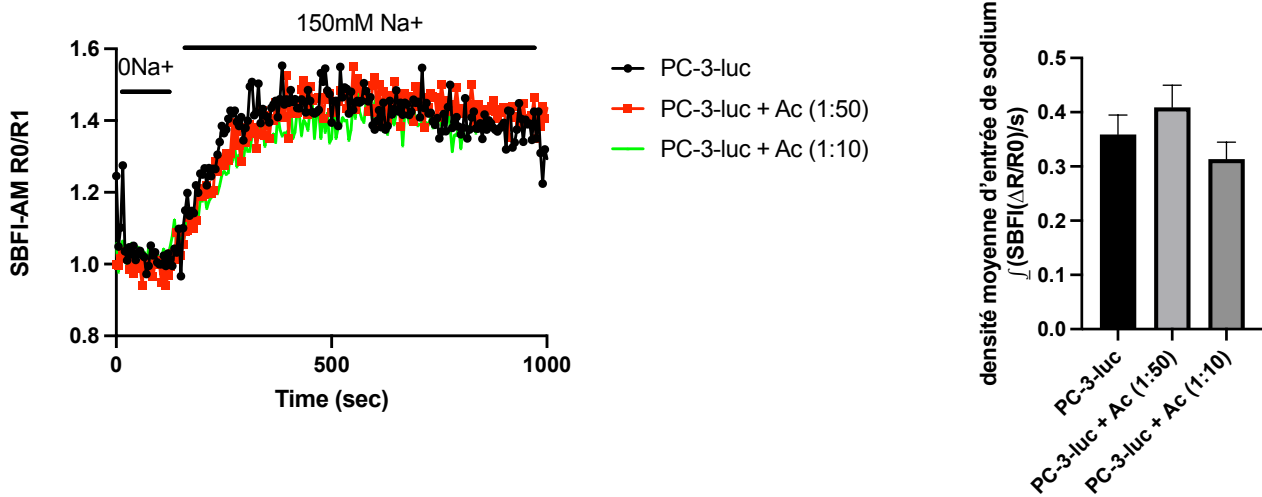


Figure 46 : Tests de l'anticorps généré sur la fonction du canal NALCN
Imagerie sodique montrant l'entrée sodique en présence et absence de l'anticorps et sa quantification. Aucune différence significative sur l'entrée sodique à la suite de l'incubation avec cet anticorps.

Cet anticorps généré possède cependant une caractéristique non négligeable qui est celle de cibler un épitope extracellulaire. Il revêt donc un intérêt particulier en biologie cellulaire, notamment dans le marquage de la protéine NALCN sans avoir besoin de procéder à la perméabilisation cellulaire en immunocytochimie notamment (voir Annexe 4). Il présente également des possibilités d'utilisation en immunodétection notamment en condition native. En effet, la présence de l'épitope extracellulaire proche du pore permet de reconnaître une conformation tridimensionnelle de la protéine. Cet Anticorps ne présente donc pas les caractéristiques souhaitées cependant, présente des propriétés intéressantes dans le cadre de l'étude plus approfondie de l'expression et la régulation de NALCN. En effet si la protéine NALCN après avoir été transloquée à la membrane plasmique est réinternalisée, il est potentiellement envisageable de marquer cette protéine réinternalisée avec cet anticorps. Cela permettrait de suivre l'évolution de la protéine au cours du temps, et ses mouvements intracellulaires afin d'améliorer l'étude de la translocation de ce canal.

2. Translocation de NALCN à la membrane plasmique

En ce qui concerne la translocation de NALCN, plusieurs hypothèses ont été avancées sur les acteurs permettant cette translocation, notamment la calmoduline, déjà connue pour être

impliquée dans la translocation d'autres protéines. Cette calmoduline présente une particularité qui est sa sensibilité au calcium et dans notre cas, étant donné que la translocation de NALCN a lieu après un influx conséquent de calcium, elle semblait être une cible potentielle. Afin de tester son implication dans la translocation de NALCN à la membrane plasmique, nous avons utilisé des inhibiteurs de cette protéine (Figure 47).

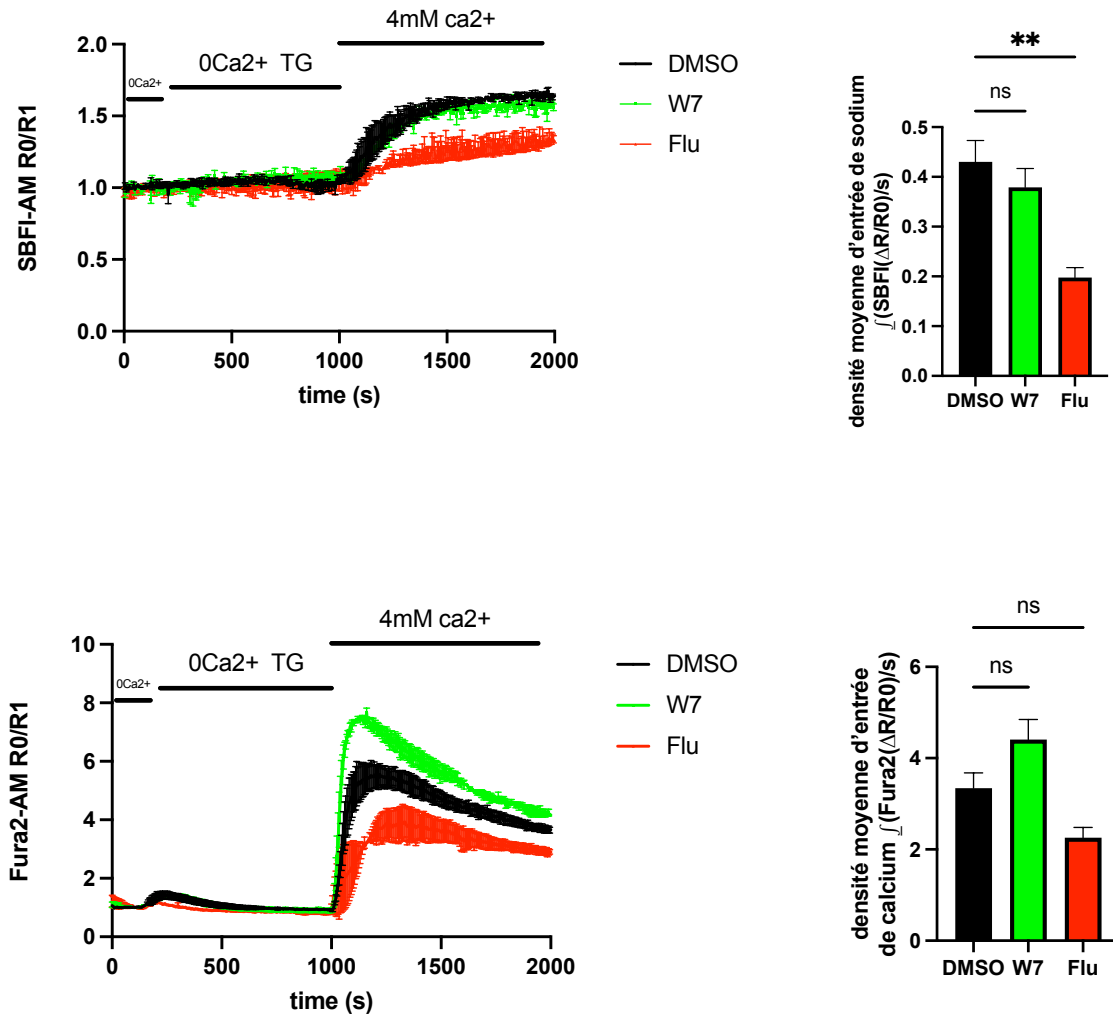


Figure 47 : Inhibition de la calmoduline effectrice potentielle de la translocation (Partie haute) Imagerie sodique et sa quantification lors d'une activation SOCE pour induire la translocation de NALCN, traité ou non avec des inhibiteurs de la calmoduline (W7) et (Fluphenazine). (Partie basse) imagerie calcique lors d'une induction SOCE sur des cellules traitées par des inhibiteurs de la calmoduline

Sur les deux inhibiteurs utilisés, il semblerait que la Fluphénazine présente un effet sur l'entrée sodique induite à la suite de l'activation du SOCE (Figure 47 partie haute). Cependant, les graphes montrent une entrée de sodium linéaire lors de l'utilisation de cette molécule dès le début de l'expérimentation. De plus, cette même molécule agit également sur le SOCE en lui-

même en induisant une diminution de l'activité SOCE sur les cellules. Statistiquement, l'effet ne semble pas significatif sur l'entrée SOCE cependant, la répétition de cette expérimentation pourrait changer ces statistiques. A contrario, le deuxième inhibiteur (le W7) semble augmenter l'entrée SOCE induite dans ces cellules et n'a aucun effet sur l'entrée sodique donc n'inhibe pas la translocation de NALCN. Il n'est pas certain que cette calmoduline soit à l'origine de la translocation de NALCN à la membrane, cela nécessite de plus amples investigations.

Étant donné que ce canal est constitutivement fonctionnel lorsqu'il est présent à la membrane plasmique, la translocation du canalosome à la membrane plasmique pourrait donc être un mécanisme de régulation de son activité. Néanmoins, si ce mécanisme de translocation explique son activité, il demeure la question de sa réexpression génique dans les cellules cancéreuses prostatiques.

3. Régulation de l'expression de NALCN

La question de la régulation génique à l'origine de la réexpression du canal NALCN dans ces cellules cancéreuses prostatiques s'est posée. En effet, ce canal se trouve être réexprimé uniquement dans certains sous-types de cellules cancéreuses et à certains stades du cancer de la prostate. De plus, la réexpression n'est pas due à un phénomène aléatoire puisqu'il joue un rôle dans l'invasion cellulaire et il semble exister un mécanisme de régulation de l'activité de cette protéine par le contrôle de sa localisation.

Nous avons pu remarquer que ce canal NALCN est présent dans des lignées cellulaires uniquement androgéno-indépendantes et à des stades tardifs chez les patients. Certaines données présentes dans la littérature montrent un effet direct des hormones progestérone et œstrogène sur l'expression de cette protéine (Amazu *et al*, 2020). Dans notre modèle, la perte de l'expression ou de l'activité du récepteur aux androgènes pourrait participer à la réexpression de NALCN. Afin de tester cette hypothèse, nous avons procédé à une réexpression transitoire du récepteur aux androgènes dans le modèle cellulaire PC-3-luc (Figure 48).

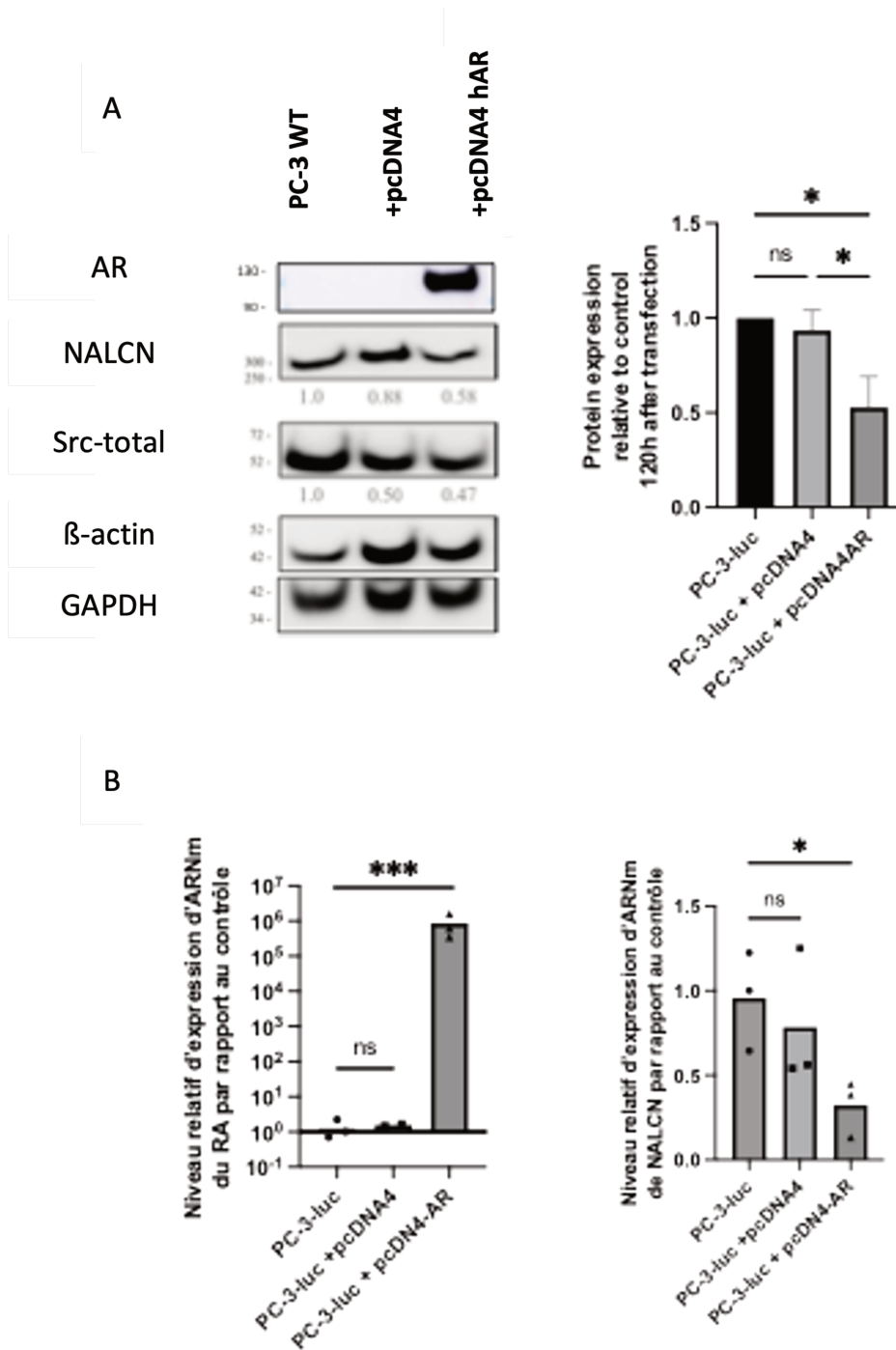


Figure 48 : Le récepteur aux androgènes régulateur de l'expression de NALCN

(A) Sur la lignée androgéno-indépendante PC-3, la réexpression du récepteur aux androgènes induit une diminution de l'expression protéique de NALCN d'environ 50% après 120h. (B) qPCR montrant l'expression du récepteur aux androgènes à la suite de la réexpression transitoire et la quantification de l'expression d'ARNm de NALCN montrant une diminution de l'expression génique de NALCN à la suite de cette réexpression transitoire.

Ces résultats montrent que la réexpression du récepteur aux androgènes dans cette lignée cellulaires est responsable de la diminution de l'expression l'ARNm et de la protéine NALCN (Figure 48B). Il est à noter que la diminution de l'ARNm de NALCN est effective dès 72h après la transfection du récepteur aux androgènes. En revanche, il est nécessaire d'attendre 120h avant d'observer un effet sur la protéine NALCN (Figure 48A). La perte de l'expression de ce récepteur aux androgènes lors de l'évolution du cancer de la prostate pourrait être à l'origine de la perte de la régulation négative de ce gène.

Ces perspectives et ces données préliminaires pourraient appuyer de nouveaux projets comme le ciblage de l'activité du canal NALCN pour une utilisation en thérapeutique ciblée. Ou encore, l'exploration du mécanisme de régulation par la translocation d'une protéine constitutivement active. De plus, ces perspectives sont valables dans un cadre plus général du traitement du cancer puisque NALCN n'est pas retrouvé que dans le cancer de la prostate.

4. NALCN est également associé à l'agressivité d'autres cancers

Cette protéine NALCN est également retrouvée surexprimée dans d'autres types de cancers comme le cancer du sein ou le cancer du côlon. Les données obtenues lors de coupe de tissus de patient atteint de ces types cancéreux montrent une augmentation de l'expression de NALCN associée à la progression (cf article). Par ailleurs, il est régulièrement démontré comme, étant muté dans de nombreux cancers et notamment dans le cancer du pancréas. D'autre part dans le cas du cancer du pancréas, la signalisation SOCE est également mise en avant comme étant impliquée dans l'évolution de ce cancer et la résistance aux chimiothérapies. NALCN, étant lui-même montré comme associé à la signalisation induite par le SOCE, il est possible qu'il ait un rôle à jouer également dans le cancer du pancréas.

PARTIE 2 : CANCER DU PANCRÉAS

Une des particularités du cancer du pancréas également associée à sa progression du cancer et sa chimiorésistance est le micro-environnement tumoral. Ce micro-environnement est complexe, composé de plusieurs types cellulaires, notamment les cellules stellaires principales sources des CAFs qui sont à l'origine d'une rigidité autour des cellules cancéreuses. Cette rigidité va évoluer avec l'évolution du cancer, notamment due à la sécrétion de protéines de la matrice par les cellules du micro-environnement. Cette sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire ne se fait pas de façon anarchique, mais en réponse à des stimuli environnementaux. En effet, de nombreux facteurs sont sécrétés par les différents types cellulaires présents, ce qui permet une communication intercellulaire.

Nous avons émis l'hypothèse que cette communication était basée sur le contrôle de l'homéostasie calcique et sodique, qui modulerait la rigidité du micro-environnement. Pour ce projet nous avons donc décidé de créer un environnement plus complexe qui prend en compte à la fois la rigidité de la matrice et la coculture cellulaire. Pour ce modèle, nous avons fait le choix de prendre différentes lignées cancéreuses (PANC1 et Capan-1) et une seule lignée non cancéreuse de cellules stellaires (PS-1). Les cellules stellaires sont également présentes dans le pancréas sain et évoluent avec le cancer, étant une source des CAFs.

Méthodologie mise en place pour mimer la rigidité de la matrice in vitro

Afin de mimer le modèle de rigidité de la matrice, il existe plusieurs possibilités, la plus simple étant la modification du support de culture cellulaire tout en gardant une culture cellulaire classique (2D). L'autre possibilité est de complexifier le modèle en choisissant des modèles de cultures en 3D qui permet de mimer, de façon plus réaliste, la rigidité qui est présente sur l'intégralité de la surface cellulaire, et l'effet sur les cellules qui subisse cette rigidité.

Méthodologie 3D

Pour la mise en place de la culture en 3D, encore une fois plusieurs choix étaient possibles. Le premier était l'utilisation de Matrigel pur pour créer un environnement de culture cellulaire. Cette méthodologie permet de créer une culture de sphéroïdes avec cependant une limite dans la modulation de la rigidité appliquée par le matrigel. En effet au maximum avec l'utilisation du matrigel pur, nous pouvons obtenir une rigidité de l'ordre de 2kPa ; de plus le matrigel induit également l'expression de gènes favorisant le processus cancéreux. Une autre possibilité qui s'offrait à nous était d'utiliser des hydrogels afin de permettre une culture 3D. La Startup HCSPharma a développé un hydrogel le BIOMIMESYS®, qui permet la culture

cellulaire en 3D avec une variation de la rigidité à façon. Ces hydrogels commerciaux permettaient de mimer de façon plus représentative la rigidité qui pouvait être observée dans le cancer du pancréas. C'est pourquoi nous avons choisi de travailler avec ces hydrogels qui sont principalement composés d'acide hyaluronique et de collagène I. Dans les débuts de notre collaboration, n'existait sur le marché que des hydrogels qui étaient composés de collagène de rat ; cependant dans le but d'étendre leurs activités, HCSPharma a innové en remplaçant les molécules issues du rat par des molécules humaines pour permettre une amélioration de la culture de cellules humaines. Après avoir testé les deux hydrogels, il s'est avéré que les hydrogels contenant des protéines humaines favorisent la culture des cellules cancéreuses pancréatiques (voir Annexe 5), et que cela affectait également la réponse calcique de ces cellules (Figure 49). Les cellules présentent une culture plus importante dans les hydrogels qui contenaient des protéines humaines comparativement aux hydrogels contenant des protéines de rat, avec un nombre de sphéroïdes plus important, et une taille plus importante pour le même nombre de jours de culture (très visible à 17 jours de culture en Annexe 5). De plus, une mesure du SOCE montre des réactions différentes de ces cellules en fonction de l'hydrogel. En effet, la réponse à la TG est plus importante lorsque les cellules sont cultivées sur des hydrogels de rat (plus de deux fois supérieur) ; en revanche, la réponse SOCE est quant à elle plus importante dans les hydrogels humains (supérieur de 40%). Travaillant sur des cellules d'origine humaine, et connaissant l'existence de cette différence de réaction, nous avons choisi de continuer avec les hydrogels humains.

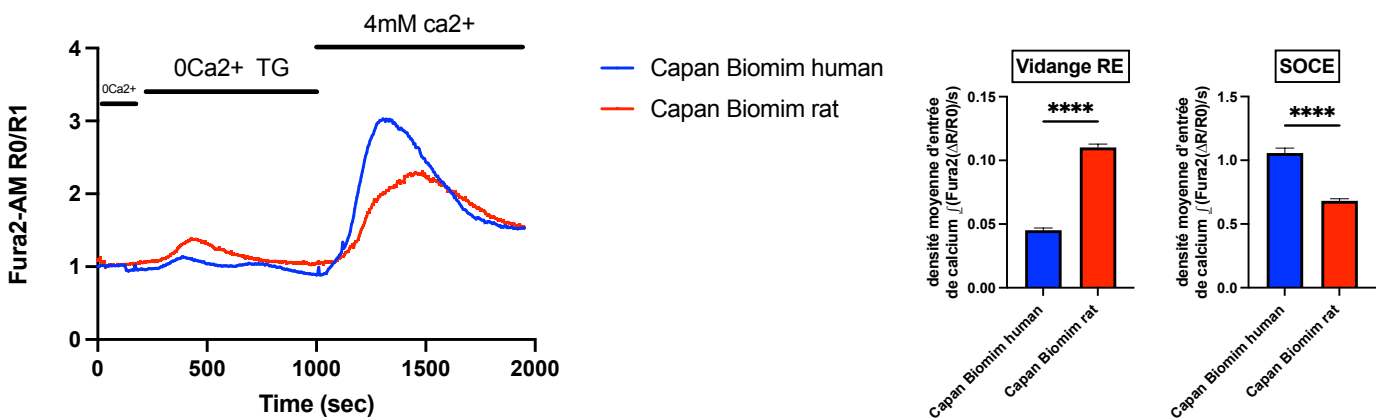


Figure 49 : Réponse calcique des cellules humaines dans des matrices de rats et humaines (Gauche) Graphe représentatif de la réponse calcique des cellules de type Capan-1, cultivé en 3D dans une matrice composée de protéines de rat comparativement à une matrice composée de protéine humaine. (Droite) quantification de la quantité de calcium relargué par le RE et de l'entrée calcique induite lors du SOCE.

Outre l'aspect onéreux des hydrogels humains, le temps de culture pour obtenir du matériel en taille et en quantité raisonnable est long. De plus, les expérimentations par imagerie calcique et sodique sur ce système ne permettaient pas de réaliser les cocultures. C'est pourquoi nous avons décidé d'ajouter un modèle 2D pour permettre une culture à la fois plus rapide, mais également d'envisager des expérimentations de coculture cellulaires en imagerie calcique ou sodique.

Méthodologie 2D

Cette méthodologie, basée sur les modules de Young, permet de moduler la rigidité du support par un gel de densité plus ou moins importante. C'est la densité de ce gel qui va alors permettre de moduler la rigidité. Ici, nous avons utilisé un gel d'acrylamide/bisacrylamide qui est polymérisé avec différentes concentrations d'acrylamide et de bisacrylamide afin de créer les différentes rigidités. Ce gel de polyacrylamide est ensuite recouvert d'une fine couche de collagène de type 1 humain. En effet, à la suite des résultats obtenus sur les hydrogels BIOMIMESYS®, il a été décidé de continuer les expérimentations avec du collagène humain. Les matrices ont été créées sur des lames en verre afin de garder le même support pour toutes les expérimentations. Cette méthodologie a permis de réaliser des cultures plus rapides et également un nombre d'expérimentations *in vitro* beaucoup plus importantes à moindre coût. Les cocultures étaient également possibles et nous pouvions utiliser ce protocole pour réaliser de l'imagerie calcique et sodique sur ces matrices en cultures simple et coculture. Les expérimentations réalisées en culture simple permettent de comparer l'effet de la rigidité du support sur les cellules. Les conditions de cocultures donnent des informations quant à la communication intercellulaire. Ces cocultures sont réalisées sur les différentes rigidités afin de prendre en compte également la possibilité d'une communication différente en fonction des rigidités du support. Visuellement, l'organisation cellulaire est dépendante à la fois des rigidités et des cocultures (Figure 50).

Lorsque les cellules de type PS1 sont mises en coculture avec les Capan-1, celles-ci présentent une forme beaucoup plus allongée sur un substrat de 34kPa comparativement au 1kPa. De plus, l'organisation de ces cellules PS1 semble différente. Sur une matrice plus rigide, celles-ci semblent entourer les cellules Capan-1. Et lorsque l'on compare avec les autres rigidités intermédiaires mises en place (8kPa et 16kPa) cette organisation semble être dépendante et progressive de la rigidité. Visuellement, nous pouvons donc remarquer qu'il existe un changement cellulaire en fonction de la rigidité, mais également en fonction de la coculture ce qui met en avant une communication entre ces cellules qui est à l'origine d'une réponse qui peut être modulé par la rigidité de la matrice.

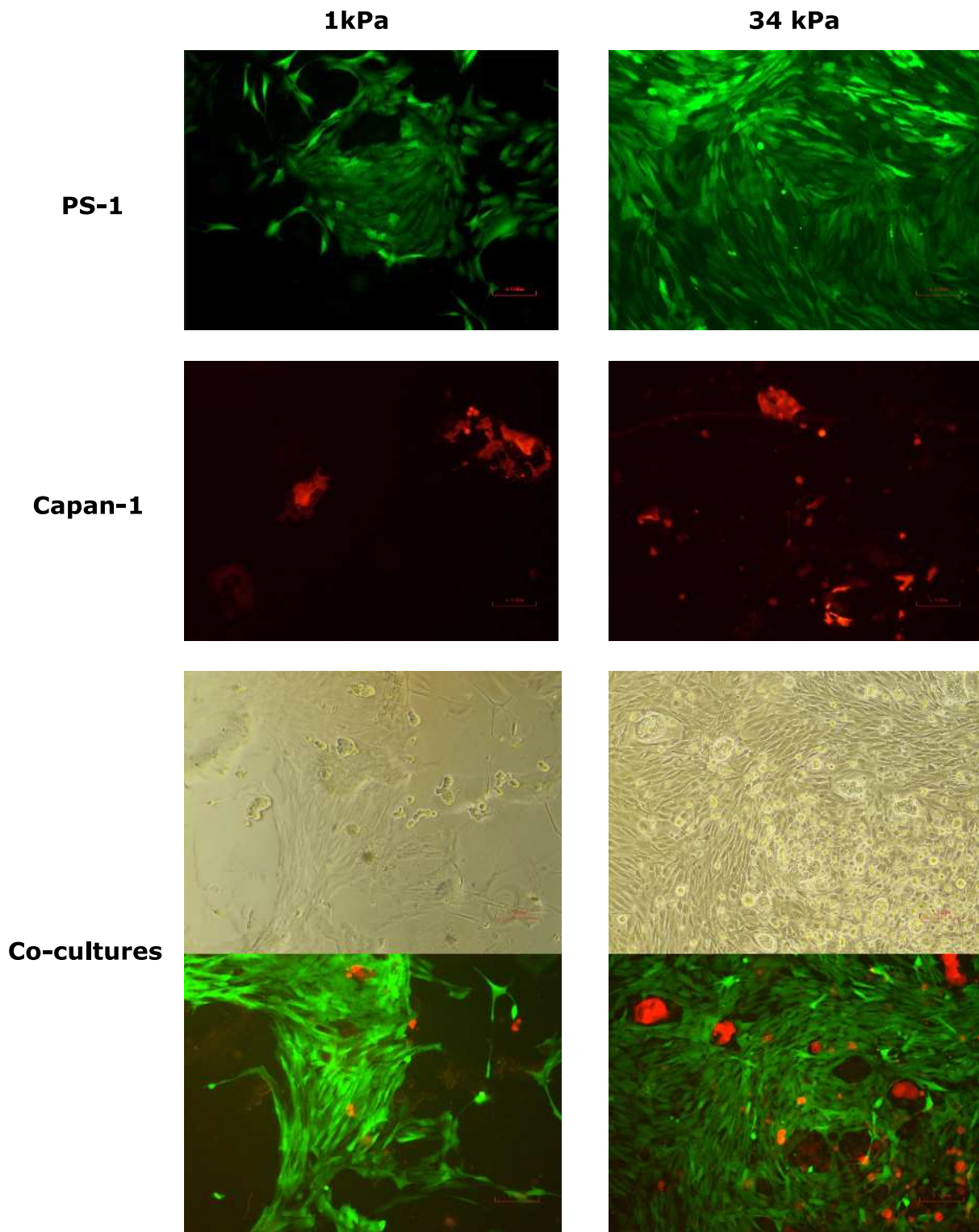


Figure 50 : Culture simple et coculture de cellules pancréatiques cancéreuses et stromales sur différentes rigidités. Photo de culture simple de cellules cancéreuses Capan-1 et de cellules stellaires de type PS-1 sur différentes rigidités. L'augmentation de la rigidité influe fortement sur les cellules stellaires de type PS-1 qui sont réorganisées et plus alignées. La partie co-cultures (en lumière blanche et fluorescente) montre que même sur une rigidité faible les cellules de type PS-1 sont réorganisées et alignées. Lorsque la rigidité est plus importante, ces cellules encerclent les cellules cancéreuses de type Capan-1.

La communication intercellulaire en fonction des différentes rigidités matricielles.

Afin de prendre en compte le maximum de paramètre, nous avons commencé par une analyse large. C'est pourquoi une analyse de RNAseq a été conçue afin de pouvoir prendre en compte les données de transcriptomiques dans les différentes conditions. Ces données avaient pour vocation d'orienter les recherches sur les gènes, mécanismes et par extension protéines potentiellement impliqués lors de changement de rigidités ou de coculture.

RNAseq single cell en fonction des rigidités matricielles et des cocultures

Pour réaliser ce RNAseq, la méthodologie 2D utilisant des surfaces de rigidités modulées par un gel d'acrylamide recouvert de collagène humain de type I a été choisie.

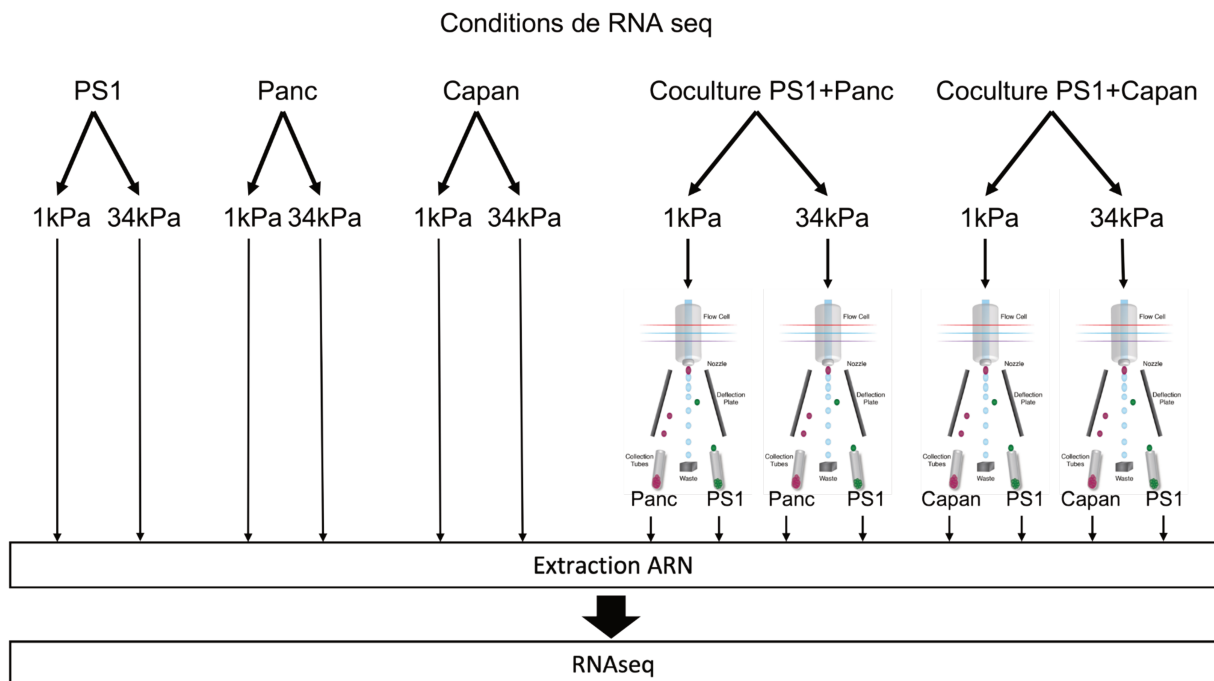


Figure 51 : représentation schématique des différentes conditions de RNAseq

Afin de définir les acteurs impliqués lors de la variation de la rigidité et également lors des cocultures, plusieurs conditions ont été mises en place. Les cultures simples sur chacune des rigidités, et également les cocultures sur chacune des rigidités qui nécessitent un triage cellulaire afin d'obtenir des populations cellulaires distinctes.

Les conditions sont assez nombreuses puisque cela prend en compte à la fois les différentes rigidités de culture et également les cocultures avec les différentes lignées cancéreuses (figure

51). Pour les cocultures avant de lancer l'extraction d'ARN, il était nécessaire de procéder au tri cellulaire. Ceci a été réalisé sur des lignées cellulaires fluorescentes qui ont permis d'utiliser le système FACS afin de sortir chaque sous-population cellulaire des cocultures. Les cellules cancéreuses possèdent une fluorescence dsRed alors que les cellules PS1 possèdent une fluorescence GFP. Tous ces ARN extraits ont ensuite donné lieu à un RNAseq avec 4 échantillons biologiques dans chacune des conditions, avant d'obtenir les données brutes en FASTQ.

La première chose remarquable lors de l'analyse des échantillons communs à toutes les conditions (PS-1) c'est la séparation distincte entre les conditions de cultures simple et de cocultures (Figure 52). En effet, indépendamment de la rigidité de la matrice, apparaissent trois groupes distincts qui correspondent à une expression spécifique de gènes.

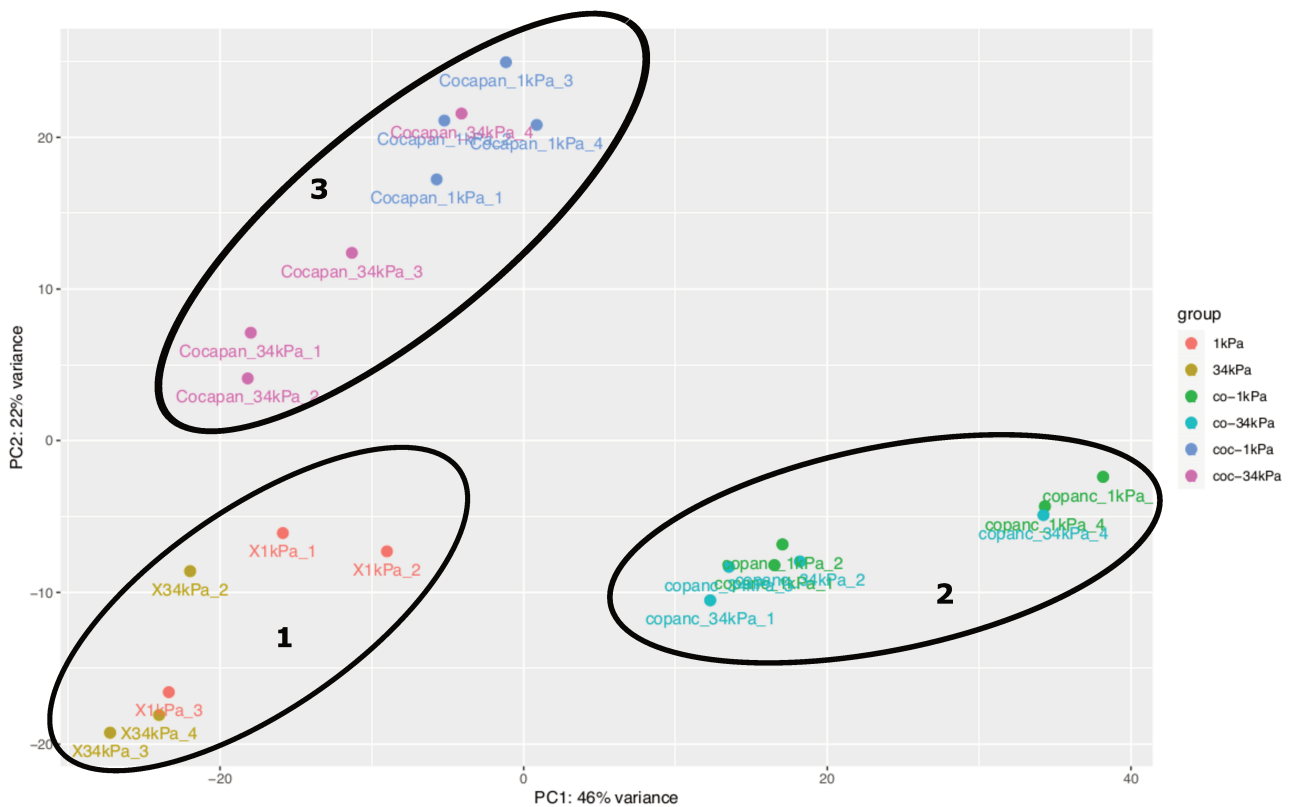


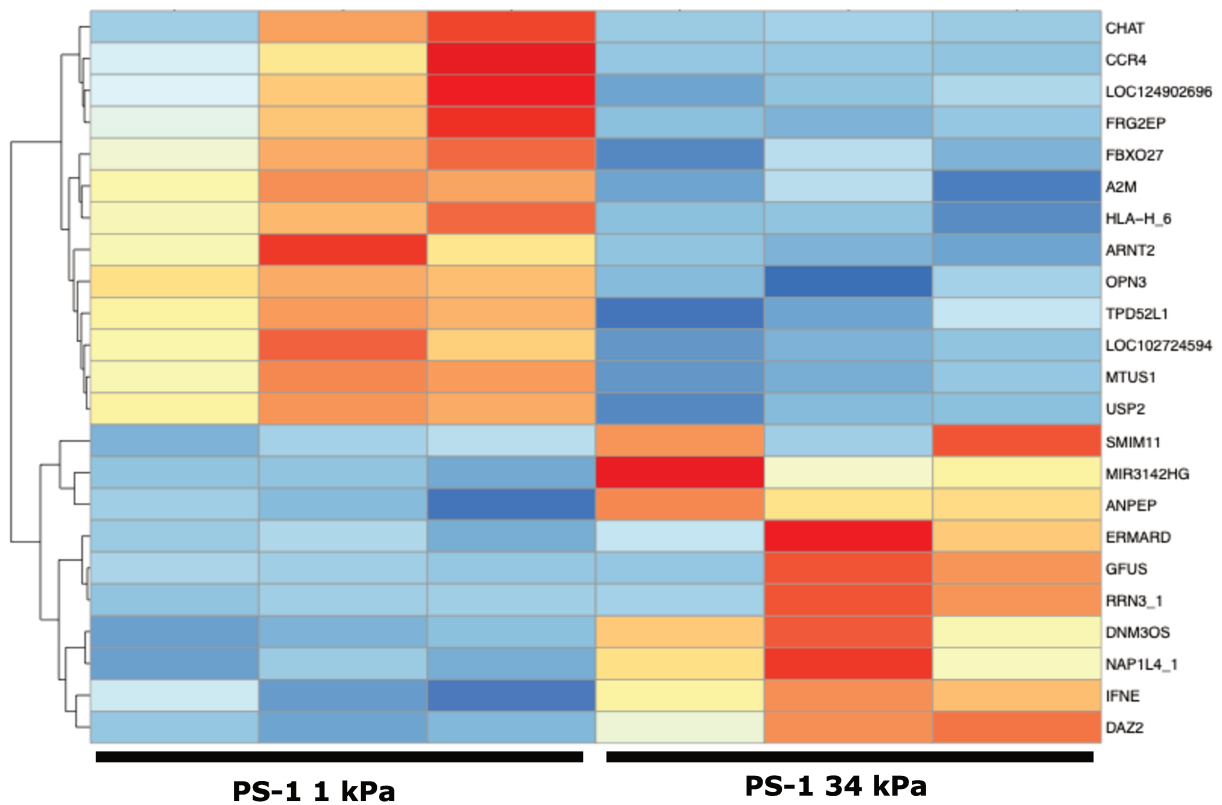
Figure 52 : Profils d'expression génique des cellules PS-1 en culture simple et lors des cocultures. L'expression génique se sépare en trois grandes parties (1) les cellules PS-1 seul indépendamment de la rigidité, (2) les cellules en cocultures avec les PANC1, et (3) les cellules en cocultures avec les Capan-1.

En effet, immédiatement trois grands groupes apparaissent représentant les cultures simples (Figure 52 groupe 1) puis un groupe pour chaque type de cocultures (figure 52 groupe 2 et 3). Ceci démontre déjà un effet important de la coculture sur l'expression génique indépendamment de la rigidité de la matrice et donc d'une communication intercellulaire

également indépendante de cette rigidité. Cependant afin de déterminer quelles sont les modifications géniques exclusivement dépendantes de la communication intercellulaire, il est nécessaire d'analyser l'effet de la rigidité sur chaque type cellulaire, mais également de la rigidité sur chaque coculture. Pour cela, il est nécessaire de procéder par groupes d'analyse et donc par lignées cellulaires.

L'expression génique des PS-1 dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures

Les cellules stellaires qui sont les représentantes dans notre modèle du micro-environnement tumoral sont présentes dans chacune des conditions. En effet, elles sont présentes dans les différentes rigidités, mais sont également le facteur commun à toutes les cocultures.



Gene up	Log fold change	Gene down	Log fold change
DNM3OS	0.942540799767641	TPD52L1	-0.993055096346993
ANPEP	1.08441630236127	OPN3	-0.994631098733411
IFNE	1.39431494461084	ARNT2	-1.15404986360511
DAZ2	2.27575759659464	MTUS1	-1.36942021474434
MIR3142HG	2.69894885380058	A2M	-1.55575569620199
NAP1L4_1	2.75514125019268	USP2	-2.04172695265933
ERMARD	3.31764363375937	FBXO27	-2.48317267190157
RRN3_1	3.55332653542073	LOC124902696	-3.03574830893303
SMIM11	4.35415624351769	CCR4	-3.48002719620221
GFUS	4.7059772364505	LOC102724594	-3.55772250545967
		HLA-H_6	-3.88510231850348
		CHAT	-5.81101077485237
		FRG2EP	-6.59009821325769

Figure 53 : heatmap de l'expression génique des cellules PS-1 sur les différentes rigidités. (Haut) Représentation en heatmap des gènes significativement différenciellement exprimés dans la condition 34kPa par rapport à la condition 1kPa. (En bleu sous exprimé, en rouge surexprimé) (Bas) Gènes dont l'expression est modulée, en rouge les gènes qui touchent la régulation de l'ADN ou histone, en vert les gènes qui touchent le cytosquelette par son rôle dans la mitose, ou la migration cellulaire.

Comme nous pouvons le remarquer, ces cellules stellaires ne présentent pas une variation importante de l'expression génique lors d'une modulation de la rigidité de la surface de culture (Figure 53). Seuls peu de gènes varient, et nous retrouvons principalement des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la modulation du cytosquelette (TPD52L1, MTUS1, A2M), et des gènes associés à la régulation de l'ADN et histones (NAP1L4_1, RRN3_1).

Les autres gènes présents sont des gènes modulés, mais ne présentent pas de liens entre eux. On retrouve par exemple des gènes qui sont impliqués dans l'expression d'interféron epsilon (réponse aux agressions par d'autres organismes). Rien ne permet d'associer ces gènes à un processus biologique en particulier. En revanche, lors des cocultures, nous retrouvons une variation très importante de nombreux gènes. Le premier niveau de comparaison est la modulation de l'expression génique sur la même rigidité par rapport aux cocultures. Si l'on compare les cocultures des cellules PS-1 avec les cultures simples sur une rigidité identique à 1kPa nous retrouvons alors des profils d'expression géniques qui vont être spécifiques de chaque culture (Figure 54).

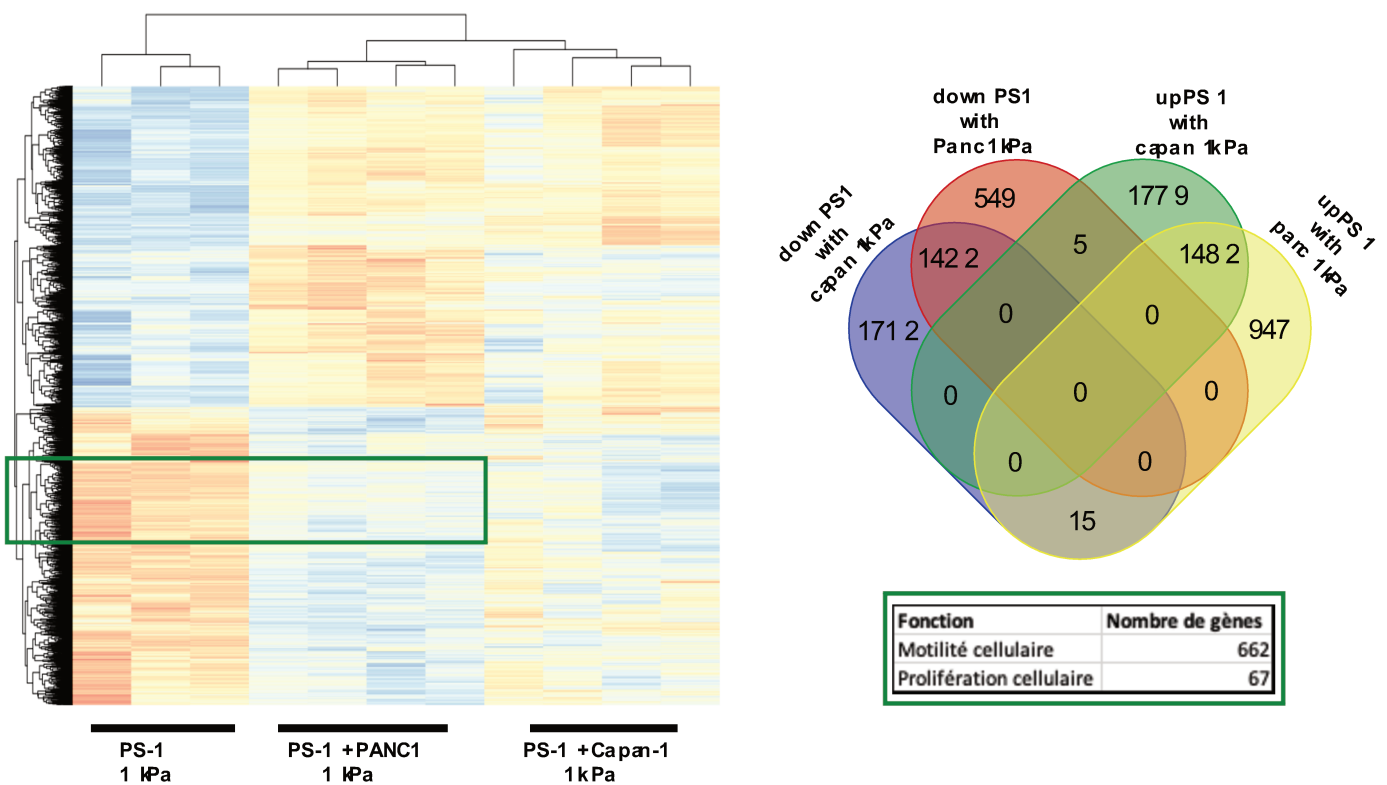


Figure 54 : heatmap de l'expression génique des cellules PS-1 lors des cocultures comparées aux cultures simples sur une même rigidité de 1kPa

(Gauche) Heatmap représentant les gènes significativement différenciellement exprimés des cellules de type PS-1 lors des cocultures avec les cellules cancéreuses de type PANC1 et Capan-1 comparativement aux cultures simples sur une rigidité de 1kPa. (Droite Haut) Diagramme de Venn comptabilisant les gènes communément exprimés et spécifiquement exprimés dans chacune des conditions. (Droite bas) Nombre de gènes sous-régulés dans la condition de coculture des PS-1 avec les PANC1 touchant spécifiquement la motilité cellulaire et la prolifération cellulaire.

Si l'on s'intéresse désormais aux gènes qui vont être modulés lors de la coculture par rapport à la culture simple, on observe alors, dans les gènes qui ont une surexpression, 1779 gènes spécifiquement exprimés de façon positive lors de la coculture avec les Capan-1 et 947

spécifiques à la coculture avec les Panc-1 (diagramme de Venn Figure 54). Nous retrouvons tout de même 1482 gènes communément surexprimés dans les deux cocultures. Pour les gènes qui sont sous-régulés, 1712 sont spécifiques à la culture avec les Capan-1 contre 549 spécifiques à la culture avec les Panc-1, et tout de même 1423 gènes communément sous-régulés. Parmi ces gènes on retrouve 20 gènes classés dans deux catégories hydrides. La première comporte 15 gènes sous-régulés en présence des Capan-1, mais surrégulés en présence des Panc-1. La deuxième présente 5 gènes surrégulés en présence des Capan-1 et sous-régulés en présence des Panc-1. Le même type d'analyses a été réalisé en comparant les gènes sur la rigidité de 34kPa, ce qui donne sensiblement le même type de gènes modulés. Dans ces cellules PS1, lors de la mise en place de la coculture, on observe parmi les gènes qui vont être surexprimés une augmentation de nombreux gènes qui sont associés, au métabolisme intracellulaire, ou encore impliqués dans la sécrétion. De plus, la mise en coculture avec les cellules cancéreuses semble avoir un effet non négligeable sur la motilité de ces cellules. En effet, de nombreux gènes sous-exprimés, sont associés à la motilité de ces cellules et à leur prolifération (Figure 54 droite bas). Si l'on s'attarde un peu plus sur la motilité de ces cellules dans ces conditions, nous pouvons alors réaliser un réseau d'interaction des 662 gènes qui sont régulés négativement lors de la coculture avec les cellules PANC1 (Figure 55). Un des principaux nodules sur cette figure concerne le gène FN1, qui code pour la fibronectine 1 (protéine de la matrice extracellulaire associée à la migration cellulaire et l'adhésion cellulaire). Ce gène est lié à 46 autres gènes, dont des gènes, de métalloprotéinases (MMP2, ADAMTS1, ADAM9), mais également des facteurs de croissance stimulateurs de la prolifération et mobilité, tels que (FGF2-5-7-17, PDGF), ou encore les gènes touchant les semaphorines impliquées dans la migration cellulaire et le développement des neurones. Chacun de ces 46 gènes étant également associé à d'autres gènes, cela crée un réseau d'interaction complexe qui montre le processus de motilité cellulaire des PS-1 diminué en présence des PANC1 en coculture (Figure 55). Comme le montre également cette figure, certains gènes ne sont pas directement liés entre eux dans ce réseau d'interaction comme par exemple CCAR1 (Cell Division Cycle And Apoptosis Regulator 1) qui est associé également à la migration cellulaire et la prolifération, mais dans notre réseau de gènes ne se trouve pas déjà démontré en association avec les autres gènes.

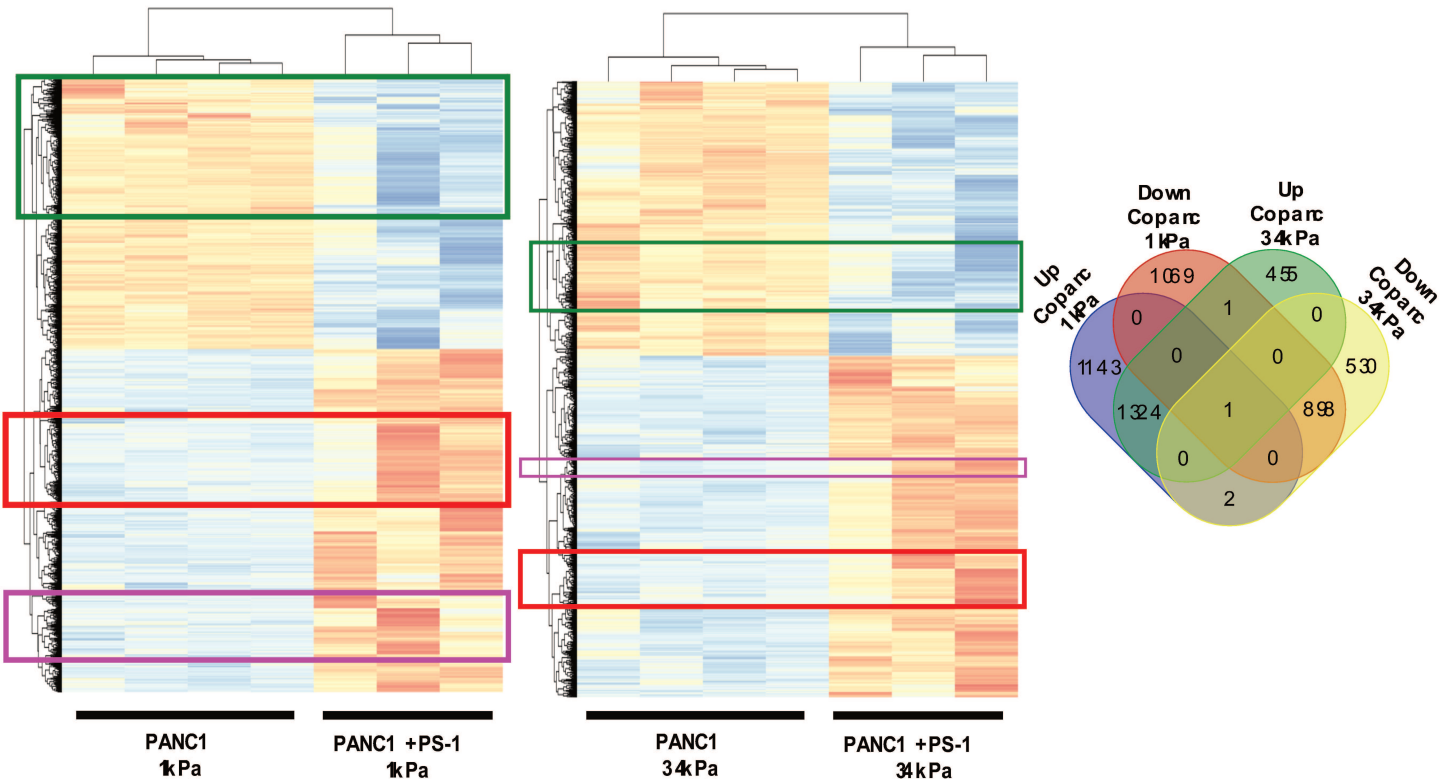
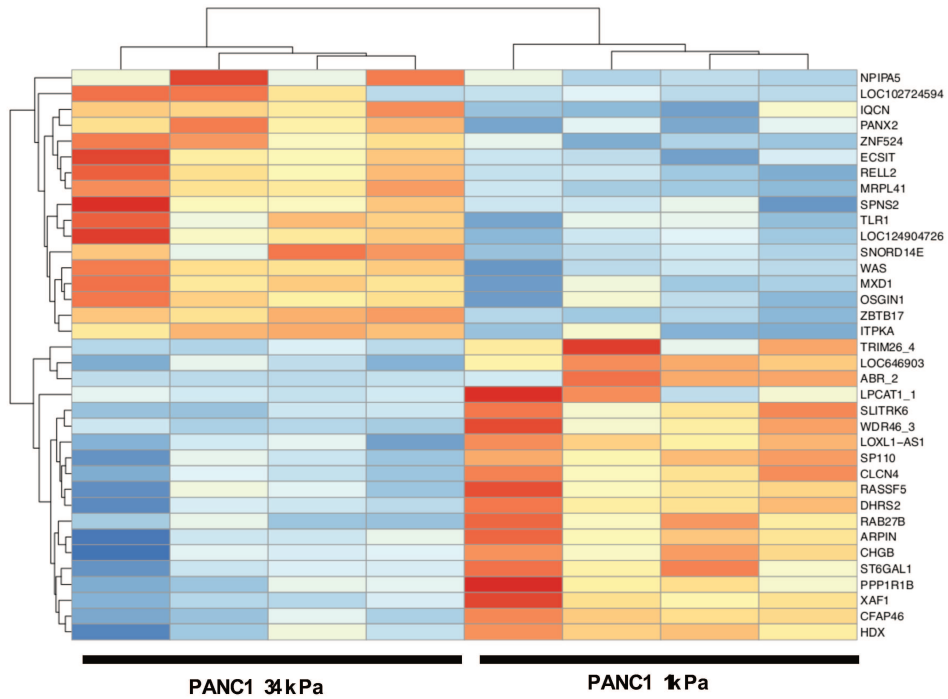
l'ADN et histone. Ceci est mis en contraste avec les grandes variations de l'expression génique de ces cellules lors des cocultures avec les cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses (PANC1 et Capan-1) semblent diminuer la motilité de ces cellules PS-1 et également leur prolifération lors de la coculture avec les cellules de type PANC1. La motilité de ces cellules sera testée par la suite par un suivi de la migration dans les différentes conditions, et également la prolifération sur une semaine afin de vérifier les données obtenues en RNAseq. Les cellules PS-1 ne représentent qu'une partie du modèle, il est donc nécessaire de comparer les modifications de l'expression génique dans les cellules cancéreuses sur les différentes rigidités et cocultures.

L'expression génique des PANC1 dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures

Dans les cellules cancéreuses de type PANC1, les modifications qui sont dues à la rigidité sont plus importantes que chez les cellules stellaires (Figure 56 partie haute). Cependant, comme chez les PS-1, un plus grand nombre de modifications d'expression génique a lieu dans les cocultures (Figure 56 partie basse).

Lorsque nous comparons l'influence de la rigidité sur ces cellules cancéreuses PANC-1 finalement assez peu de gènes varient (Figure 56 partie haute). Les variations des 36 gènes observées ne sont d'ailleurs pas associés à des processus biologiques spécifiques. En revanche lors des cocultures avec les cellules PS-1, un nombre beaucoup plus important de gènes sont impliqués (Figure 56 partie basse). Les variations de l'expression génique sont comptabilisées et résumées sur le diagramme de Venn (Figure 56 partie basse droite). Nous pouvons remarquer que 1143 et 1069 gènes sont spécifiquement surrégulés et sous-régulés respectivement sur la matrice avec une rigidité de 1kPa pour les cellules PANC1 en coculture avec les cellules PS-1. Seulement 455 et 530 sont spécifiquement surrégulés et sous-régulés respectivement sur la matrice de rigidité 34kPa. En revanche, il est important de noter que 1324 gènes sont surrégulés à la fois sur la matrice de 1kPa et sur la matrice de 34kPa, et 898 sont sous-régulés sur les deux matrices. Ceci représente plus de 2000 gènes qui varient de manière commune, indépendamment de la rigidité de la matrice. En revanche, il est tout de même intéressant de noter, qu'il existe un effet additif entre la coculture et la rigidité de la matrice sur l'expression des gènes. En effet au total seuls 36 gènes présentent une variation significative sur les cultures simples, donc ici en coculture nous nous attendions à n'avoir que peu de gènes spécifiques de chaque rigidité. Or il s'avère que nous avons près de 3000 gènes qui sont spécifiquement associés à la rigidité dans les cocultures. De ce fait, la rigidité participe

à la modification de l'expression génique de façon synergique avec la coculture. Les gènes qui sont sous-régulés lors des cocultures sont principalement associés au cycle cellulaire et à la



Down Panc1+PS-1 1kPa VS PANC1	
Fonction	Nombre de gènes
Cycle cellulaire / Mitose	811

Down Panc1+PS-1 3kPa VS PANC1	
Fonction	Nombre de gènes
Cycle cellulaire / Mitose	427

UP Panc1+PS-1 1kPa VS PANC1	
Fonction	Nombre de gènes
réponse aux cytokines et hormones	630
migration et inhibition de la mort cellulaire	481

UP Panc1+PS-1 3kPa VS PANC1	
Fonction	Nombre de gènes
réponse aux cytokines et hormones	376
inhibition de la mort cellulaire	133

Figure 56 : heatmap de l'expression génique des cellules PANC1 sur différentes rigidités et lors des cocultures comparées aux cultures simples

(Haut) Heatmap représentant les gènes significativement différentiellement exprimés des cellules de type PANC1 sur différentes rigidités. (Bas gauche) Heatmap représentant les gènes significativement différentiellement exprimés des cellules de type PANC1 lors de la coculture avec les cellules de type PS-1 sur une rigidité de 1kPa. (Bas milieu) Heatmap représentant les gènes significativement différentiellement exprimés des cellules de type PANC1 lors de la coculture avec les cellules de type PS-1 sur une rigidité de 34kPa. (Bas droite) Diagramme de Venn comptabilisant les gènes communément et spécifiquement exprimés dans chacune des conditions.

mitose (avec 811 gènes dans la condition 1kPa et 427 gènes dans la condition 34kPa). Ceci sous-entend un processus de régulation négative de la prolifération cellulaire.

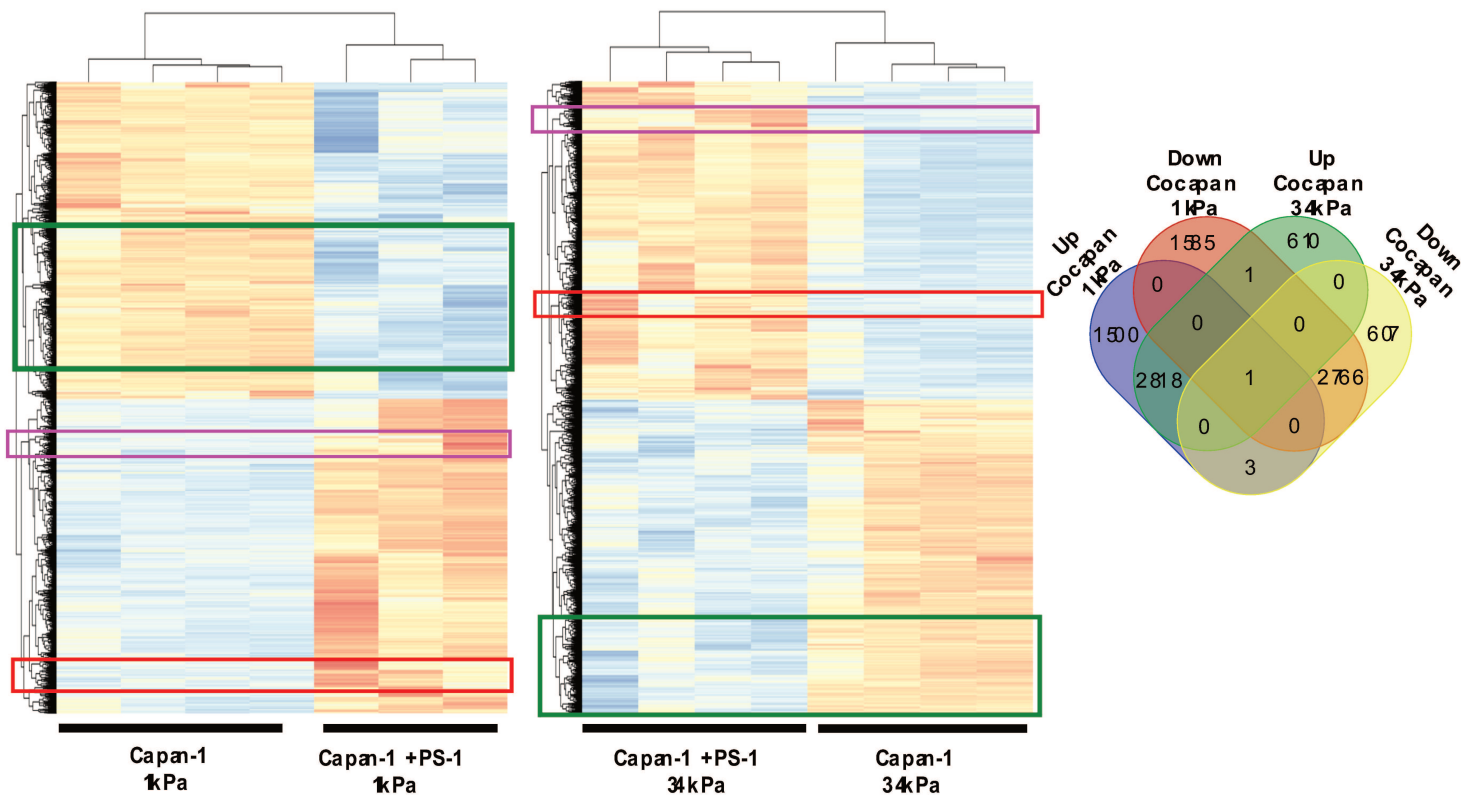
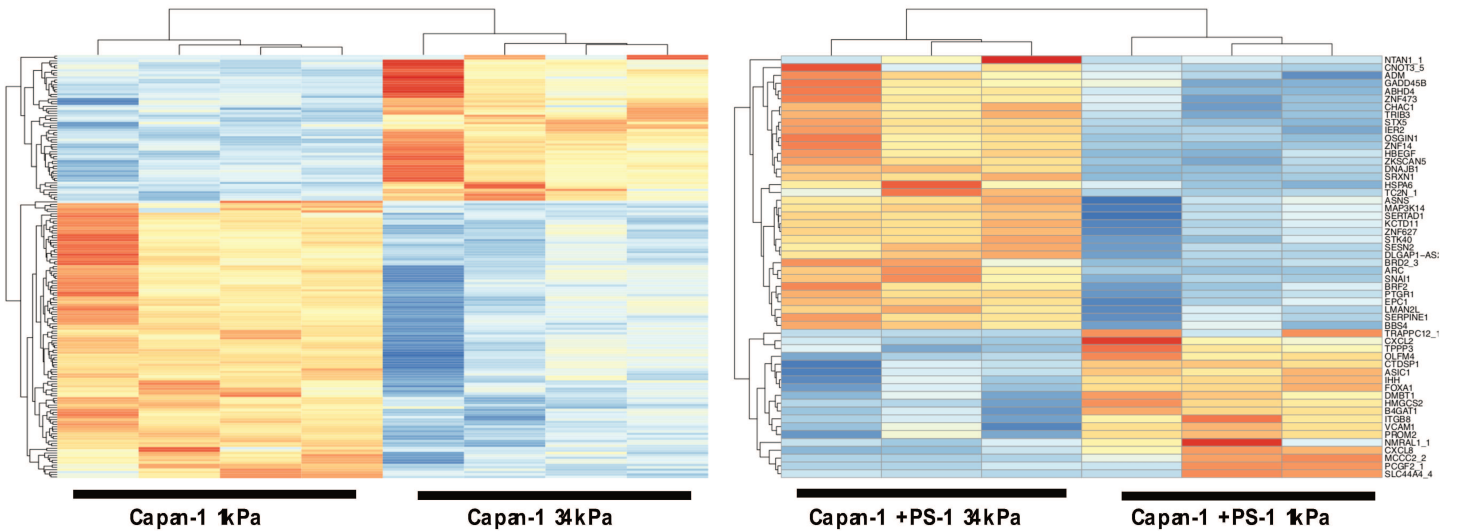
Les gènes surrégulés sont plus associés dans la réponse aux stimuli comme la réponse aux cytokines et la migration, ainsi que l'inhibition de la mort cellulaire, représentant respectivement 630 et 481 gènes lors de la mise en coculture sur une surface de 1kPa, et 376 et 133 gènes sur une surface de 34kPa. Ces données obtenues, sous-entendent que la mise en coculture favorise alors la résistance à la mort cellulaire avec une augmentation de la sensibilité aux cytokines et hormones présente dans l'environnement. Cette augmentation dans la réponse aux cytokines et hormones pourrait être responsable d'une augmentation de la migration cellulaire. La coculture aurait donc un effet promoteur de la migration et la résistance à la mort cellulaire tout en diminuant la prolifération cellulaire des cellules PANC1.

L'expression génique des Capan-1 dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures

De façon identique dans les cultures avec les cellules de type Capan-1, nous retrouvons également de plus nombreuses modifications de l'expression génique lors des cocultures (Figure 57).

De nouveau dans ces cultures avec les cellules Capan-1, peu de gènes varient sous l'influence de la rigidité seule (Figure 57 partie haute). La majeure partie de la variation se retrouve lors des cocultures où 8672 gènes varient dans la condition 1kPa et 6805 gènes dans la condition 34kPa (Diagramme de Venn figure 57). Comme pour les cellules de type Panc-1, il existe un effet additif entre la coculture et la rigidité de la matrice. En effet, la majorité de ces gènes varient de façon indépendante à la rigidité cependant, nous retrouvons 1500 et 1585 gènes surrégulés et sous-régulés respectivement spécifiquement dans la condition 1kPa. D'autres gènes sont spécifiques de la condition 34kPa avec 610 et 607 gènes surrégulés et sous-régulés. Presque 6000 gènes sont surrégulés et sous régule uniquement par l'effet de la coculture qui sont associé de nombreux processus biologiques. Les gènes sous-régulés sont principalement associés à la régulation du cycle cellulaire et de la mitose avec 728 gènes dans la condition

1kPa et 577 dans la condition 34kPa. Comme pour les cellules PANC1, cela semble indiquer une diminution de la régulation du cycle cellulaire et donc potentiellement une implication sur la prolifération cellulaire. Et de la même façon que pour les Panc-1 ces cellules ont des



Down Capan1 + PS-1 1kPa VS Capan1	
Fonction	Nombre de gènes
Cycle cellulaire / Mitose	728

Down Capan1 + PS-1 34kPa VS Capan1	
Fonction	Nombre de gènes
Cycle cellulaire / Mitose	577

UP Capan1 + PS-1 1kPa VS Capan1	
Fonction	Nombre de gènes
réponse aux cytokines et hormones	236
migration et inhibition de la mort cellulaire	169
réponse aux stress et matrice extracellulaire	428

UP Capan1 + PS-1 34kPa VS Capan1	
Fonction	Nombre de gènes
réponse aux cytokines et hormones	98
migration et inhibition de la mort cellulaire	84
réponse aux stress et matrice extracellulaire	364
Vascularisation	203

Figure 57 : heatmap de l'expression génique des cellules Capan-1 sur différentes rigidités et lors des cocultures comparées aux cultures simples

(Haut gauche) Heatmap représentant les gènes significativement différenciellement exprimés des cellules de type Capan-1 sur différentes rigidités. (Haut droit) Heatmap représentant les gènes significativement différenciellement exprimés des cellules de type Capan-1 lors des cocultures avec les cellules PS-1 sur la rigidité de 34kPa comparé celle de 1kPa. (Bas gauche) Heatmap représentant les gènes significativement différenciellement exprimés des cellules de type Capan-1 lors de la coculture avec les cellules de type PS-1 sur une rigidité de 1kPa. (Bas milieu) Heatmap représentant les gènes significativement différenciellement exprimés des cellules de type Capan-1 lors de la coculture avec les cellules de type PS-1 sur une rigidité de 34kPa. (Bas droite) Diagramme de Venn comptabilisant les gènes communément et spécifiquement exprimés dans chacune des conditions.

gènes surrégulés qui touchent principalement la réponse aux cytokines et aux hormones dans la condition 1 kPa. Il est important de noter dans cette lignée que la coculture induit une réponse au stress extracellulaire et de remodelage de la matrice extracellulaire, ce qui n'apparaissait pas dans la lignée PANC1. De plus, l'aspect synergique de la coculture et de la rigidité montre dans cette lignée une tendance à la surexpression des gènes favorisant la vascularisation.

Les résultats de ce RNAseq montrent tout d'abord que le profil d'expression génique est différent en fonction de la rigidité, mais est surtout également modulé par les sous-types cellulaires qui composent les cocultures. En effet, dès que le paramètre des cocultures est ajouté en supplément de la rigidité, nous observons alors une séparation distincte des cocultures par rapport aux cultures simples, et plus précisément, chaque type de coculture à un profil d'expression génique différent. La coculture semble être à l'origine de modification de ce profil d'expression beaucoup plus important que la rigidité en elle-même. De plus, ces gènes qui sont modulés par la coculture sont associés à des processus biologiques spécifiques, ce qui n'est pas forcément le cas des cultures simple sur les différentes rigidités. Ceci met en évidence que la communication intercellulaire est un paramètre qui conditionne le phénotype cellulaire. Ces cellules vivent dans le même micro-environnement, et communiquent entre-elles. Cette communication est à l'origine du remodelage de l'expression génique qui est également à l'origine de la modulation de la rigidité de ce micro-environnement, ceci est montré avec les cellules Capan-1 qui modulent les gènes associés au remodelage de la matrice extracellulaire. Cela a également un effet sur la motilité cellulaire puisqu'une tendance à la hausse de la régulation des gènes impliquant le cytosquelette et la migration a pu être mise en évidence. L'effet synergique observé reste un paramètre très intéressant puisque cela sous-entend que cette rigidité participe également à la communication intercellulaire. La rigidité seule, n'ayant pas d'impact concret sur l'expression génique des cultures simples, mais uniquement dans les cocultures, cela indique que la modulation de la rigidité est un

mécanisme de communications entre les différents types cellulaires en supplément des molécules sécrétées.

À plusieurs reprises, l'effet des cocultures et de la rigidité montrent un profil d'expression génique associé au processus de prolifération par la modulation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la mitose notamment par la diminution de leur expression. Mais également dans le potentiel migratoire de ces cellules par les gènes qui touchent la motilité et le cytosquelette. C'est pourquoi nous avons alors étudié les processus associés à la migration cellulaire et à la prolifération de ces cellules dans ces mêmes conditions.

Étude de la migration/invasion des cellules en fonction des rigidités matricielle et des cocultures.

Afin d'étudier l'influence de la rigidité et des cocultures sur la migration de ces cellules, nous avons mis en place un protocole afin de pouvoir réaliser un suivi cellulaire au cours du temps. Pour cela, nous avons induit la fluorescence spécifique des cellules, cultivées sur des matrices de rigidités différentes et en coculture, ce qui a permis de suivre ces cellules au cours du temps par l'utilisation du CD7 (cell discover 7).

La prolifération cellulaire a été mesurée sur les mêmes échantillons par comptage des cellules fluorescentes toutes les 24h (figure 58). Contrairement à ce que nous attendions, il s'avère qu'il n'existe pas de variation franche de la prolifération cellulaire. Seules les cellules PS-1 lorsqu'elles sont en coculture avec les cellules PANC1 montrent une nette diminution de leur prolifération (Figure 58A), ce qui est en concordance avec le RNAseq (Figure 54).

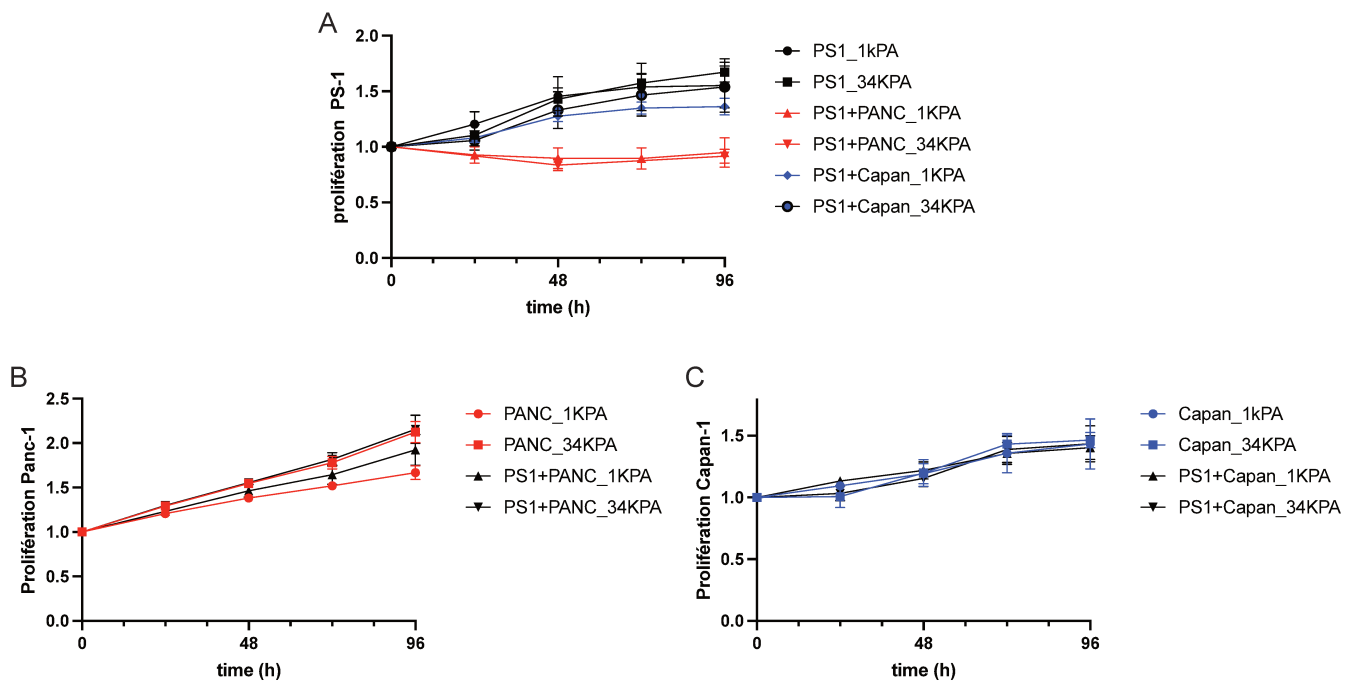


Figure 58 : effets de la rigidité et des cocultures sur la prolifération cellulaire

(A) prolifération des cellules PS-1 sur 96h en fonction des rigidités 1 et 34kPa et également en coculture avec les PANC1 et Capan-1. (B) Prolifération des cellules cancéreuses PANC1 en fonction des rigidités et des cocultures avec les cellules PS-1. (C) Prolifération des cellules Capan-1 en fonction des différentes rigidités et des cocultures avec les cellules de type PS-1.

Pour les cellules de type PANC-1 la prolifération cellulaire semble très légèrement supérieure sur la matrice de 34kPa par rapport à la condition 1kPa de manière indépendante à la coculture (Figure 58B). Cette augmentation de la prolifération est visible après 96h uniquement, mais contrairement aux résultats obtenus en RNAseq, la coculture ne semble pas diminuer la prolifération des cellules PANC1. Les Capan-1 semblent quant à elle ne pas avoir de modification de leur prolifération, quelle que soit la condition de culture (Figure 58C). La prolifération des cellules ne semble pas être réellement diminuée dans les conditions de cocultures concernant les cellules cancéreuses. En revanche, les cellules de type PS-1 ont bien une nette diminution de leur prolifération lors de la coculture avec les PANC1. Pour ce qui est de la migration des cellules PS-1, elles ne montrent pas de différence lors des cocultures avec les cellules cancéreuses (Figure 59 gauche). Elle est d'en moyenne 180µm lors de la culture sur une rigidité de 1kPa, et il n'existe pas de variation significative du rayon de déplacement lors des cocultures avec les cellules cancéreuses. En revanche lorsque ces cellules PS-1 sont cultivées sur une rigidité plus importante, nous observons une augmentation du rayon de déplacement de ces cellules à 250µm, déplacement similaire observé dans les conditions de cocultures. Concernant les cellules cancéreuses PANC1, il existe plusieurs effets, le premier

est également dû à la rigidité avec une augmentation du rayon de déplacement passant de 197µm à 295µm. Le deuxième effet semble dû à la coculture qui montre une tendance à la diminution du déplacement dans la condition 1kPa et une diminution significative du déplacement dans la condition 34kPa passant de 295µm à 218µm. Ces résultats ne sont en revanche pas les mêmes pour les cellules de type Capan-1, où il n'existe aucune différence significative quant à leur motilité dans ces conditions de rigidités et de coculture (Figure 59 droite).

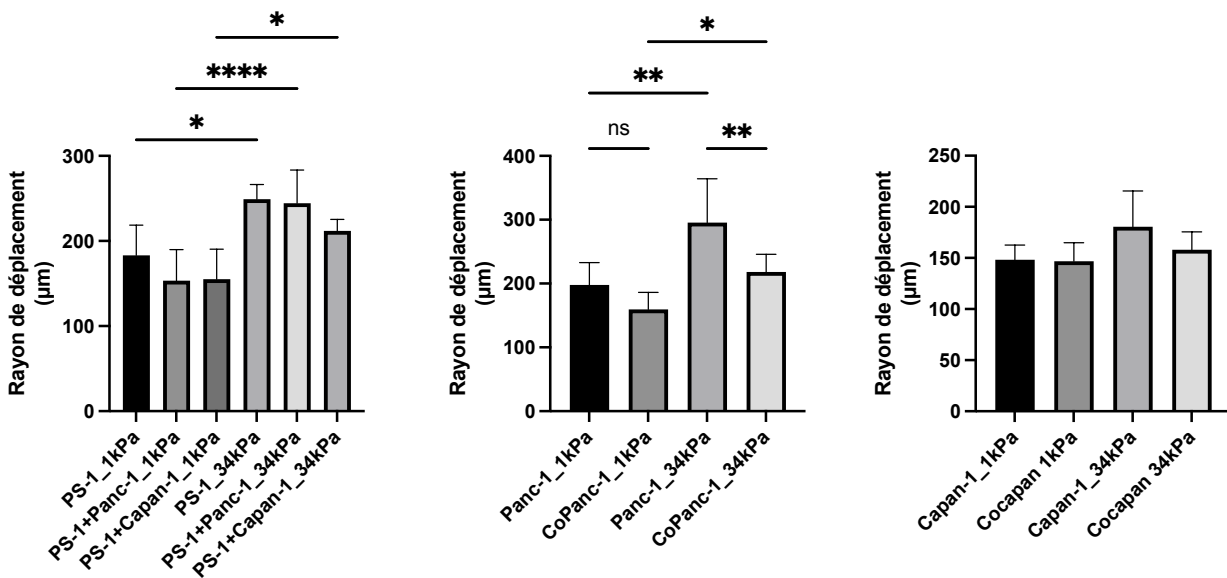


Figure 59 : Migration cellulaire dans les différentes conditions de rigidités et de cocultures (Gauche) Rayon de déplacement moyen observé chez les cellules PS-1 sur différente rigidité 1kPa et 34kPa, et également en coculture avec les cellules cancéreuses PANC1 et Capan-1. (Milieu) Rayon de déplacement moyen observé chez les cellules PANC1 sur différente rigidité et en coculture avec les cellules PS-1. (Droite) Rayon de déplacement moyen observé chez les cellules Capan-1 sur différente rigidité et en coculture avec les cellules de type PS-1.

La migration cellulaire semble donc être plus sous le contrôle de la rigidité que de l'aspect coculture pour les cellules PS-1. En revanche, les cellules cancéreuses de type PANC1 montrent une migration sous la dépendance à la fois de la rigidité et de la coculture avec les cellules stellaires. Paradoxalement, les résultats de RNAseq chez les PANC1 montraient une augmentation de la migration cellulaire lors des cocultures avec les cellules stellaires, ce qui semble être l'inverse lors de ces tests in vitro. Cela sous-entend que la régulation de la motilité de ces cellules n'est pas uniquement sous la dépendance de l'expression génique, mais probablement sous la dépendance d'un autre niveau de régulation, soit par des contrôles traductionnels de ces ARN ou lors de modification post-traductionnel qui jouerait sur l'activité

des protéines impliquées. Pour les cellules Capan-1, il n'existe pas d'effet concret sur la motilité de ces cellules ce qui est plutôt en concordance avec les résultats du RNAseq qui mettent en avant d'autres processus biologiques tels que le remodelage de la matrice extracellulaire et la sécrétion de ces protéines. Ce mécanisme de sécrétion dans ces cellules a déjà été associé à la signalisation calcique et sodique dans le cas du cancer de la prostate (première partie). De plus, la migration est tout de même modulée dans le cas des cellules PANC1 et PS-1. Ce processus de migration a déjà été associé à la signalisation calcique et notamment aux canaux de type SOCs. Il est donc possible ici que la rigidité augmente l'activité de ces canaux pour induire un effet sur la migration cellulaire, ou chez les Capan-1 une augmentation de sécrétion de protéine jouant sur la matrice extracellulaire.

La rigidité module l'entrée calcique

Modulation du SOCE en 2D

Les processus de migration cellulaire ont déjà pu être associés à l'activité SOCE dans le cancer. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer si dans ce modèle de rigidité cellulaire et de cocultures le SOCE est également impliqué. Afin de répondre à cette question, un protocole utilisant une activation artificielle du processus SOCE a été utilisé dans les différentes conditions de rigidité et de coculture (Figure 60).

Nous pouvons alors constater que le phénomène SOCE sur les différentes rigidités n'est pas identique en fonction des cellules concernées. En effet, les cellules stellaires PS-1 présentent une augmentation du SOCE lorsque la rigidité de la matrice augmente. Celle-ci passe d'une densité de calcium entrant de 0,24 (dans la condition 1kPa) à 0,39 (dans la condition 34kPa) (Figure 60 haut). En revanche, les cellules cancéreuses semblent au contraire présenter une diminution du SOCE (Figure 60 milieu et bas). En effet pour les cellules de type PANC1 (Figure 60 milieu), la densité de calcium entrant est de l'ordre de 2 dans la condition 1kPa, et diminue à 1,2 dans la condition 34kPa. Pour les cellules de type Capan-1 (Figure 60 bas), la diminution est de 30% entre la condition 1kPa et 34 kPa. L'augmentation du SOCE chez les cellules de type PS-1 avec l'augmentation de la rigidité est concordante avec l'augmentation de la

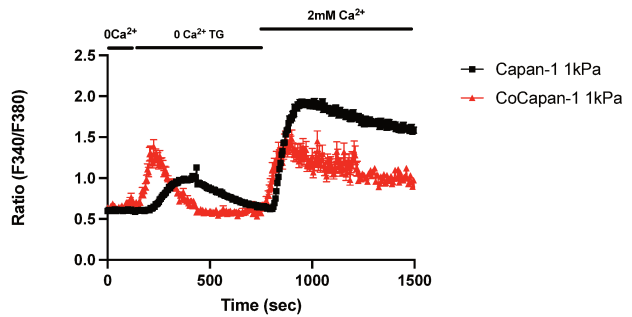
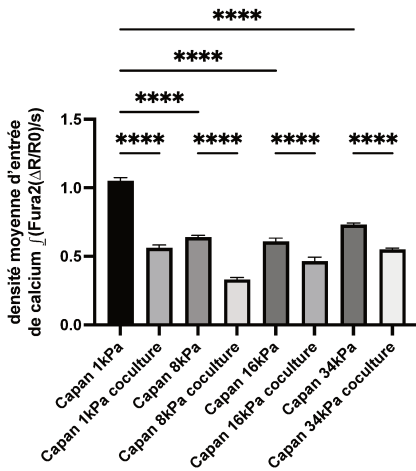
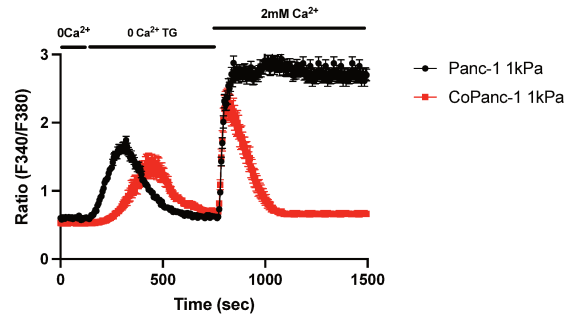
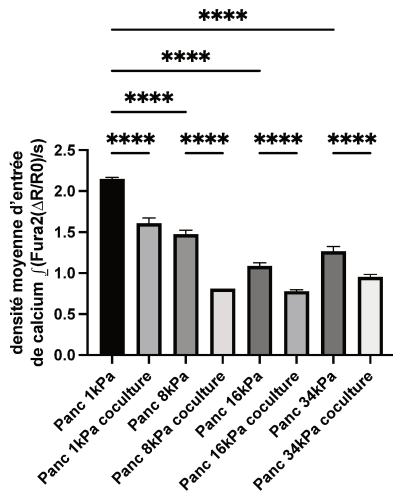
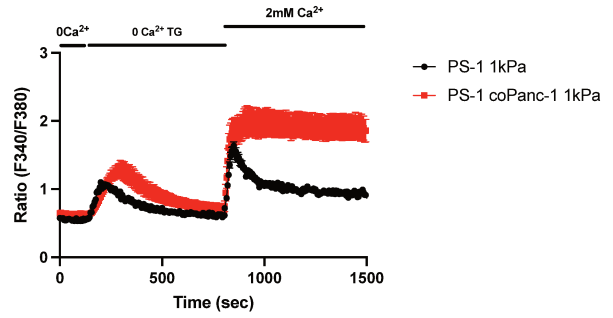
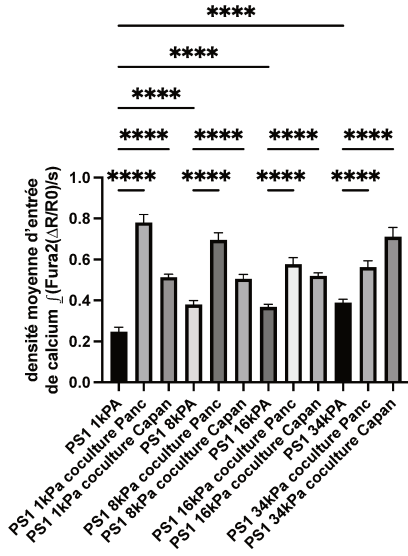


Figure 60 : Effets de la rigidité et des cocultures sur l'entrée SOCE des cellules PS-1, PANC1 et Capan-1 (Haut) quantification de la densité de calcium entrant et graphe représentatif chez les cellules PS-1 lors de la culture sur différentes rigidités (1kPa, 8kPa, 16kPa, 34kPa) et lors des cocultures avec les cellules cancéreuses de types PANC1 et Capan-1. L'augmentation de la rigidité sur les cultures simple PS-1 induit une augmentation de l'entrée SOCE. La coculture induit une augmentation de l'entrée SOCE des cellules de type PS-1. (Milieu) quantification de la densité de calcium entrant et graphe représentatif chez les cellules PANC1 lors de la culture sur différentes rigidités (1kPa, 8kPa, 16kPa, 34kPa) et lors des cocultures avec les cellules cancéreuses de types PS-1. (Bas) quantification de la densité de calcium entrant et graphe représentatif chez les cellules Capan-1 lors de la culture sur différentes rigidités (1kPa, 8kPa, 16kPa, 34kPa) et lors des cocultures avec les cellules cancéreuses de types PS-1. Les deux types de cellules cancéreuses ont une diminution de l'entrée SOCE avec l'augmentation de la rigidité et lors de la coculture avec les cellules stellaires de type PS-1.

migration sous le contrôle de l'influx calcique. En revanche chez les cellules cancéreuses les résultats semblent plus surprenants. En effet, les cellules PANC1 présentent une augmentation de la migration avec l'augmentation de la rigidité, mais une diminution de l'entrée calcique SOCE de près de 50%. De la même façon, la diminution du processus SOCE dans la lignée Capan-1 lors de l'augmentation de la rigidité n'impacte en aucun cas la migration cellulaire comme nous avons déjà pu le voir (Figure 59). La migration induite par l'augmentation de la rigidité pourrait donc être dépendante du SOCE dans le cas des cellules PS-1 et indépendante du SOCE dans le cas des cellules cancéreuses.

La mesure du SOCE lors des cocultures de PS-1 avec les cellules cancéreuses montre chez ces cellules une augmentation significative de l'entrée de calcium induite par la présence des cellules cancéreuses PANC1 ou Capan-1. En revanche, lorsque l'on quantifie le SOCE induit dans les lignées cancéreuses lors des cocultures avec les cellules PS-1, nous pouvons observer une nette diminution de l'entrée calcique induite dans ces lignées. Jusqu'à présent, l'activité SOCE est associée dans l'invasion et la migration cellulaire et par extension au développement du cancer et des métastases. Cette migration et développement des métastases qui est également décrit comme associé à une forte rigidité de la matrice. Paradoxalement ici la rigidité semble diminuer l'entrée SOCE et devrait également diminuer la migration cellulaire, ce qui n'est pas le cas comme nous l'avons déjà vu (Figure 59). La présence de cellules PS-1 dans ces cocultures induit une diminution de l'entrée SOCE indépendamment de la rigidité de la matrice, mais a également un effet additif lorsque nous faisons varier la rigidité de la matrice. Donc l'effet d'augmentation de la migration des cellules cancéreuses pancréatiques PANC1 associés à une augmentation de la rigidité n'est pas associé à l'entrée de calcium induite à la suite du SOCE. En revanche, concernant les cellules stellaires l'entrée SOCE qui est induite dans les différentes conditions de rigidité est cohérente avec l'augmentation du rayon de déplacement. Mais une augmentation du SOCE dans le cas des cocultures n'induit pas d'augmentation supplémentaire de migration et pourrait donc être à l'origine de l'augmentation d'autre activité comme la sécrétion.

La recherche des différents acteurs dans les fichiers obtenus lors du RNAseq montre que des acteurs associés au SOCE varient en fonction des conditions. L'acteur principal, le canal ORAI1 montre une surexpression dans chacune des conditions ce qui est plutôt paradoxal puisqu'il existe une diminution de l'entrée SOCE dans les lignées cancéreuses avec l'augmentation de la rigidité. Cependant dans ces conditions nous retrouvons également la présence de ORAI3 qui a une expression largement diminuée. La diminution de l'expression de ORAI3 pourrait avoir un impact sur le ratio ORAI1/ORAI3 et modifier l'entrée calcique induite à la suite du SOCE (Sanchez-Collado *et al*, 2021; Dubois *et al*, 2021). De plus, nous retrouvons également d'autres acteurs qui présentent des variations comme TRPC1 qui a également été montré associées au SOCE (Radoslavova *et al*, 2022), mais dont le rôle ici reste à déterminer. Ces résultats obtenus en 2D ont également été testés sur un modèle 3D.

Modulation du SOCE en 3D

L'étude de cette entrée SOCE dans ces cellules a également été débutée sur des cultures 3D utilisant les matrices BIOMIMESYS®. Cette méthodologie ne permet pas l'analyse de coculture par imagerie calcique c'est pourquoi nous nous sommes limitées aux cultures simples. De plus, la méthodologie de cultures 3D avec ces matrices semble beaucoup plus adaptée à la culture de cellules cancéreuses comparativement aux cellules stellaires. En effet, les cellules de type PS-1 présentent même après 14 jours de cultures une faible densité de cellules dans les hydrogels et restent plutôt isolées les unes des autres. Cependant, les expérimentations réalisées sur les cellules cancéreuses montrent d'une manière générale une diminution de l'entrée SOCE induite lors de l'augmentation de la rigidité (Figure 61).

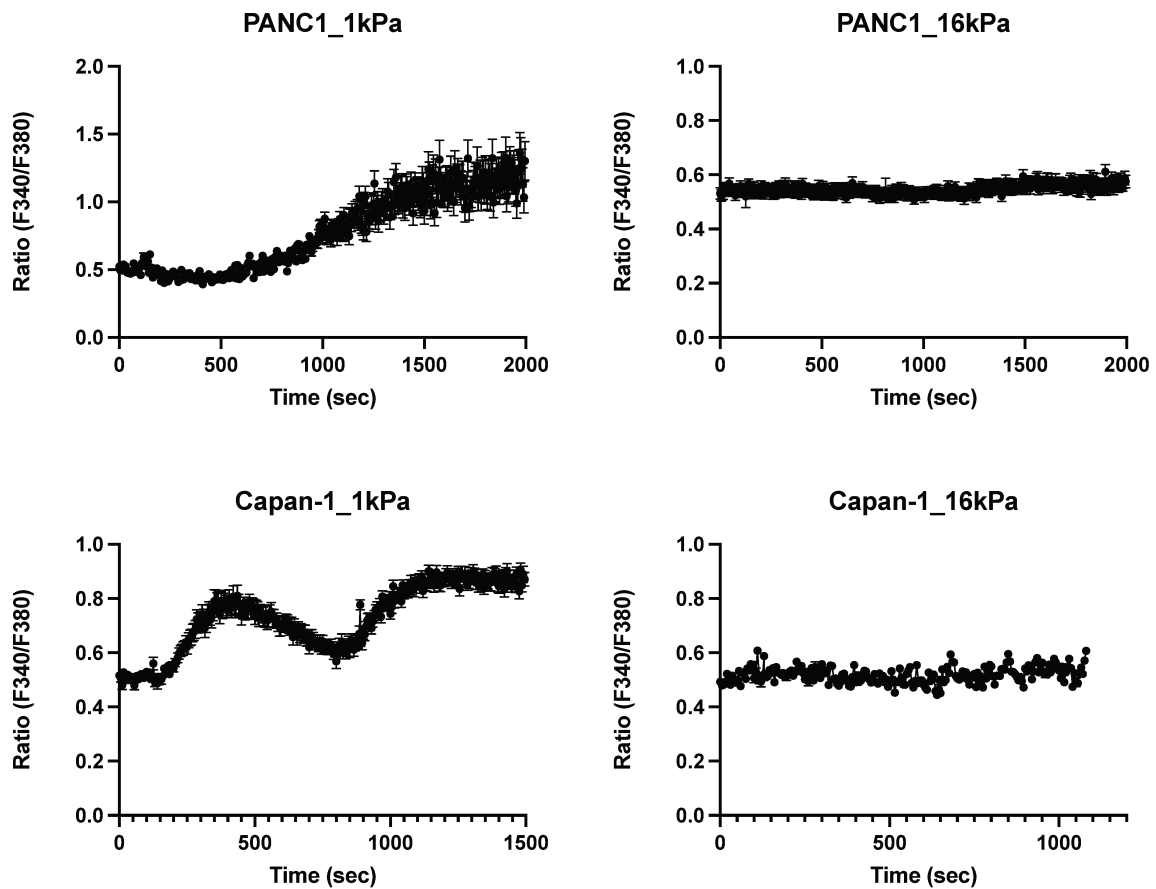


Figure 61 : Imagerie calcique sur de la culture 3D de cellules cancéreuses seules. Graphique représentatif de l'entrée calcique lors de l'induction d'un protocole SOCE sur des matrices permettant la culture 3D. L'augmentation de la rigidité réduit très fortement la réponse calcique de type SOCE.

Ces résultats montrent que, la méthodologie 3D utilisant du collagène de type 1 humain et de l'acide hyaluroniques, corroborent la méthodologie 2D mise en place sur l'entrée SOCE induite et la rigidité de la matrice. Avec cette méthodologie 3D, il semblerait que la TG ne soit pas efficace sur des rigidités plus importantes. Une des premières hypothèses fut que l'augmentation de la rigidité diminue l'efficacité de la diffusion de la TG, mais lors de l'analyse du RNAseq nous avons cependant trouvé une augmentation de l'expression de gène de résistance à la TG lors de l'augmentation de la rigidité. Il pourrait donc ici s'agir d'une réponse cellulaire au stimulus de la rigidité qui réduirait la réponse TG. D'autre part, les différences observées entre ces deux méthodologies peuvent provenir de la culture en elle-même. En effet sur la méthodologie 2D la surface des cellules est accessible, et ne subit pas la rigidité de la matrice alors que dans cette méthodologie la rigidité de la matrice est appliquée sur

l'intégralité de la surface cellulaire. Cette méthodologie 3D présente des caractéristiques intéressantes, mais nécessite la mise en place de ce type de culture en routine.

Ces résultats donnent lieu à un article en cours de préparation en collaboration avec le Dr Radoslavova. Cet article associe les données RNAseq avec certains processus migratoires pouvant être reliés à la signalisation calcique et également à la sécrétion induite dans ces conditions l'analyse protéomique du sécrétome. Ceci permet d'ouvrir les perspectives de travail quant aux mécanismes et protéines pouvant être impliqués dans la migration et l'invasion des cellules cancéreuses pancréatiques ainsi que le rôle du micro-environnement.

Discussion et perspective deuxième partie

La migration cellulaire qui a déjà été associée au processus SOCE (Diez-Bello *et al*, 2017; Chen *et al*, 2016; Yang *et al*, 2013) ne semble pas y être associée dans toutes nos conditions de cultures. En effet, l'augmentation de la rigidité du support induit une augmentation de la motilité cellulaire chez les cellules de type PANC1, cependant, dans nos conditions, le SOCE est quant à lui diminué pour ces mêmes cellules. Les cellules de type PS-1, en revanche, semblent être dans une dynamique opposée avec une augmentation de la rigidité qui induit une augmentation de l'entrée calcique induite à la suite du SOCE et également une augmentation de la motilité. Le point le plus remarquable sur ces conditions reste l'aspect des cocultures par rapport aux cultures simples. En effet, en ajoutant aux cellules cancéreuses pancréatiques un seul type de cellules stromales (ici les PS-1), on observe un changement radical de comportement. Les cellules cancéreuses ont une diminution drastique de leurs entrées SOCE et a contrario les cellules PS-1 ont une augmentation de leur entrée SOCE. Ces cellules semblent réagir de façon antiparallèle lorsqu'elles se retrouvent au sein d'une même coculture, et cela de façon indépendante de la rigidité. En revanche, les modulations de la motilité cellulaire semblent être dépendantes du paramètre de la rigidité plus que de l'aspect coculture. Bien qu'il n'y ait pas de modification de l'expression génique de canaux dits mécanosensibles tels que Piezo, il est tout à fait envisageable que ces canaux soient suractivés sur des substrats plus rigides et induisent une entrée de calcium suffisamment importante pour expliquer le phénomène de migration cellulaire indépendamment du SOCE. Dans ce cas, le contrôle de la migration cellulaire serait plutôt dû à la régulation de l'activité des canaux calciques plutôt que par leur expression.

La présence dans le même environnement de culture, de deux types cellulaires différents induit une modification de comportement à la fois des cellules stromales, et des cellules

cancéreuses. En effet, les cellules de type PS-1 sont sensibles à la rigidité, ce qui est montré par une augmentation de la migration et du phénomène SOCE. Mais lorsque celles-ci se retrouvent en coculture avec des cellules cancéreuses, elles semblent également avoir une modification de leur comportement et de leur réponse calcique. Leur prolifération cellulaire est uniquement affectée en présence des cellules cancéreuses de type PANC1 et non pas des cellules de type Capan-1. En revanche, quel que soit le sous-type cancéreux utilisé pour cette coculture, l'entrée calcique qui est induite est beaucoup plus importante en présence des cellules cancéreuses. Ceci démontre que les cellules cancéreuses sont à l'origine de la modulation de la réponse calcique des cellules qui composent le micro-environnement tumoral. Ces mêmes cellules cancéreuses ont également une réponse conditionnée par la présence ou non des cellules du micro-environnement. En effet, la migration des cellules de type PANC1 est diminuée en présence des cellules de type PS-1, tout comme le SOCE des deux sous-types cancéreux. Ceci démontre qu'il existe une régulation de l'activité des cellules cancéreuses pancréatiques en fonction des cellules micro-environnementales. Cette double régulation constitue une communication intercellulaire. Cette communication des sous-types cellulaires présents dans un même micro-environnement participe à la modulation de la réponse cellulaire notamment dans la migration des cellules de type PS1 et PANC1 et également sur la prolifération des cellules de type PS-1. Cette modulation pourrait être en partie due à la communication calcique induite dans ces cellules dans les différentes conditions. En effet pour les cellules de type PS-1 et PANC1, la migration augmentée pour les cellules PS-1 peut être expliquée par un SOCE augmenté, et a contrario chez les PANC1 la migration diminuée peut être associée à la diminution du SOCE. En revanche pour les cellules de type Capan-1 cela est plus compliqué puisqu'en effet, nous avons une variation du SOCE qui est observé, mais aucun changement dans la réponse à la migration ni la prolifération. De plus très récemment, il a été mis en évidence un rôle contradictoire du SOCE dans les processus cellulaires, avec la démonstration d'une inhibition du SOCE comme étant responsable du développement cancéreux dans le cas du mélanome (Gross *et al*, 2022). Il est également important de noter qu'ici nous avons utilisé deux lignées cellulaires cancéreuses différentes. Ces lignées ont des origines et des propriétés qui sont différentes. En effet, les PANC1 ont une origine pancréatique canalaire alors que les Capan-1 sont issues des métastases du foie à la suite d'un ACCP. Ces cellules Capan-1 présentent une morphologie différente des PANC1 et ont également la caractéristique de se multiplier en cluster sans montrer une propension à l'étalement. Ces cellules Capan-1, en plus de la mutation KRAS, présentent également une mutation sur SMAD4 qui est impliquée dans la voie de signalisation au TGFbeta. Les cellules de type PS-1 présentent la caractéristique de fortement sécréter du

TGFbeta qui pourrait-être une des molécules à l'origine de la communication par la voie calcique, et pourrait expliquer les réponses différentes avec les cellules de type Capan-1 qui ont cette voie de signalisation mutée. La modulation de l'activité SOCE par le TGFbeta dans nos conditions de rigidité et de cocultures a également été testée afin de définir s'il pouvait-être un médiateur.

TGFb1, médiateur pour les cellules cancéreuses ?

Le TGFb1 est un facteur de croissance qui est sécrété par les cellules PS1, mais également connu désormais dans le processus de régulation de la prolifération et du SOCE (Radoslavova *et al*, 2021). C'est pourquoi, ayant cette information de sécrétion et de régulation de l'entrée SOCE, nous avons mis au point une série d'expérimentations visant à déterminer si la sécrétion du TGFb1 par les cellules PS-1 pourrait être suffisante pour moduler le SOCE (Figure 62).

Les résultats montrent qu'un traitement des cellules pendant 24 heures par le TGFb1 induit une augmentation de l'entrée SOCE pour la lignée PS-1 sur une rigidité de 1kPa, mais pas de 34kPa (Figure 62 haut). De plus, la réponse de ces cellules est également modulée en fonction des types de cellules cancéreuses qui composent la coculture. En effet, le SOCE est augmenté lorsque ces cellules sont en cocultures avec les cellules PANC1, SOCE qui est encore augmenté par le traitement TGFb1 sur cette condition. En revanche, lors de la coculture avec les Capan-1, le traitement par le TGFb1 semble induire une tendance à la diminution de l'entrée calcique induite à la suite du SOCE. L'effet du traitement TGFb1 sur ces cellules est donc à la fois dépendant de la rigidité, mais également de la communication intercellulaire et fonction des cellules qui composent les cocultures.

La lignée PANC-1 présente quant à elle une augmentation de l'entrée calcique induite à la suite du SOCE lors du traitement au TGFb1, quelle que soit la condition de culture. Cette lignée est donc sensible au TGFb1 et joue un rôle important sur l'entrée SOCE induite par ces cellules PANC1. De ce fait, lors de la coculture précédente, lorsque le SOCE est diminué en présence des cellules de type PS-1 (Figure 61), cette diminution du SOCE induite est médiée par un autre acteur que le TGFb1 dans cette condition. Pour les cellules de types Capan-1, dans toutes les conditions de culture, le traitement par le TGFb1 induit une diminution de l'entrée calcique induite à la suite du SOCE. Si l'on compare avec les résultats précédemment obtenus, la diminution du SOCE observé lors des cocultures avec les cellules PS-1 pourrait être dû à la sécrétion de TGFb1 par les cellules de type PS-1.

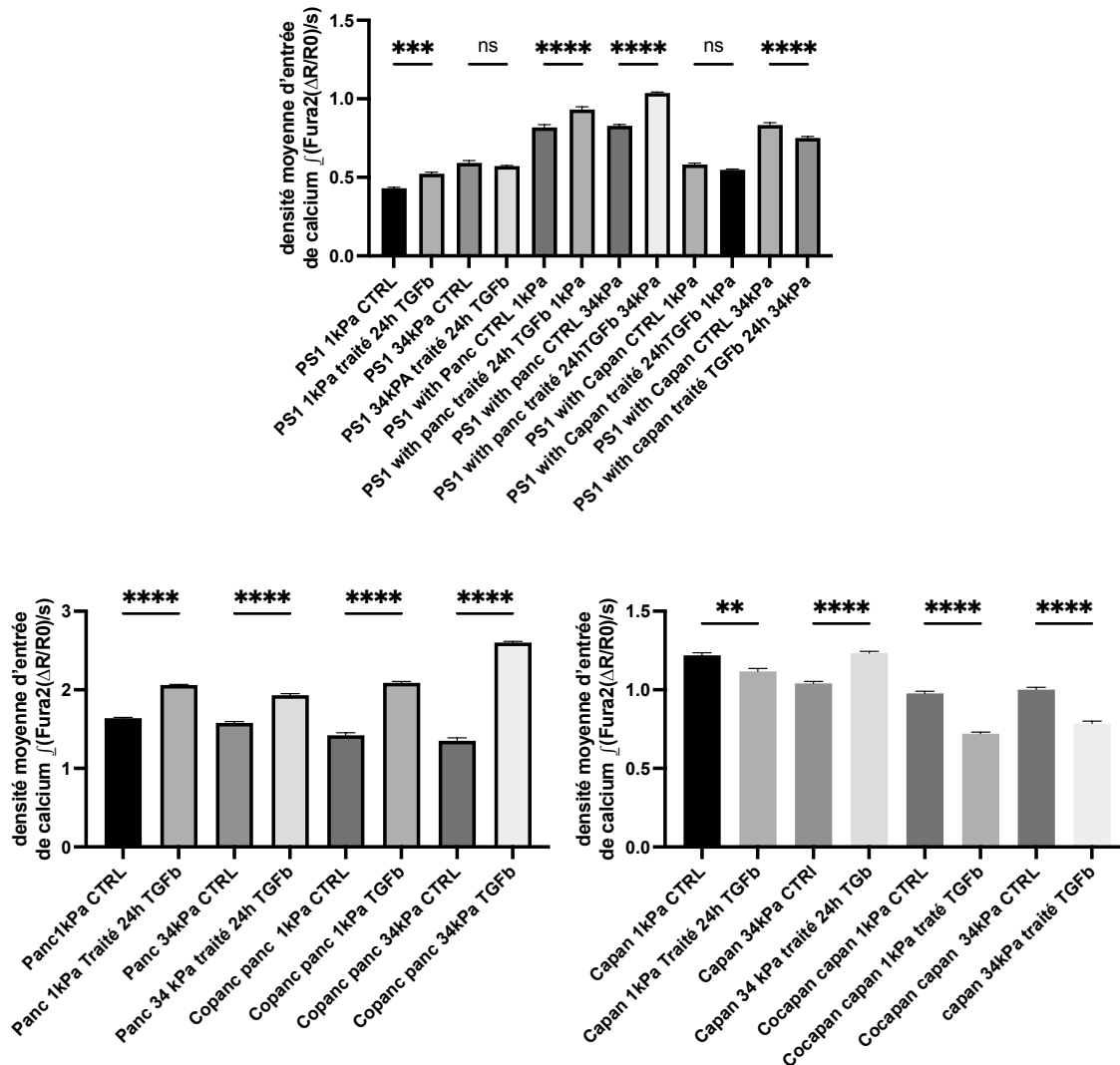


Figure 62 : Effets du traitement TGFb1 sur la réponse SOCE des cellules PS-1 PANC1 et Capan-1
 Traitement des cellules avec du TGFb1 pendant 24h, suivi d'une imagerie calcique en utilisant un protocole SOCE.
 (Haut) quantification de la réponse calcique des cellules de type PS-1 sur les différentes rigidités et lors des cocultures avec les cellules cancéreuses. (Bas gauche) quantification de la réponse calcique des cellules de type PANC1 sur les différentes rigidités et en cocultures avec les cellules PS-1 ; (Bas droite) quantification de la réponse SOCE des cellules Capan-1 en fonction des rigidités et lors des cocultures avec les cellules PS-1.

Le TGFbeta semble avoir un effet sur l'entrée SOCE, mais ne peut pas à lui seul expliquer les modifications observées. Ce TGFb1 pourrait donc être un élément de communication avec les cellules cancéreuses, étant lui-même sécrété, à la fois par les cellules stromales et cancéreuses. Ce qui pourrait expliquer dans le cas des cocultures PS-1 + Capan-1 la diminution du SOCE dans les cellules Capan-1 et l'augmentation dans les cellules PS-1.

D'autres ARNm ont été mis en évidence comme modulés lors de l'analyse RNAseq, ce qui ouvre de nombreuses possibilités. De plus, il est important de noter que les données obtenues

ne montrent pas de modifications de l'expression des canaux dits mécanosensibles. Pourtant il s'avère que des processus tels que la migration des cellules de type PS-1 et PANC1 sont dépendants de la rigidité du substrat. Outre la régulation transcriptionnelle, il est également important de prendre en compte la régulation traductionnelle potentiellement, mais surtout l'activité de certaines protéines telles que Piezo qui peuvent être suractivées dans des conditions de rigidité importantes sans pour autant avoir un niveau de régulation transcriptomique ou traductionnelle. La mise en place de culture 3D permettrait de contrôler la rigidité de façon plus précise que le modèle 2D utilisé par l'application de la rigidité sur l'intégralité de la surface membranaire. De plus, ce type de culture permet une organisation cellulaire dans l'espace qui n'est pas envisageable dans un modèle 2D. Bien qu'il s'agisse d'une difficulté technique importante, ceci est un atout majeur dans la mise en place d'un modèle plus complexe encore avec d'autres sous-types cellulaires, modèle plus complexe, mais qui mime de façon plus réaliste la tumeur et ses réactions notamment dans la réponse aux traitements pharmacologiques.

Dans cette étude, seul l'aspect calcique a été étudié ; cependant comme le montre la première partie sur la prostate, le sodium est également un élément essentiel dans la modulation de l'activité calcique. Il serait donc intéressant de combiner l'aspect sodique avec l'aspect calcique dans cette communication puisque NALCN a pu être associé à l'invasion et le développement des métastases dans le cancer de la prostate. De plus, certains canaux de type sodique tels que TRPM7 ou encore TRPM4 sont retrouvés modulés dans ces conditions (données retrouvées dans le RNAseq). Il reste néanmoins important de garder à l'esprit que le canal NALCN est également retrouvé muté dans le cancer du pancréas. Il serait intéressant de poursuivre l'analyse de l'implication de ce canal dans le cancer du pancréas sachant que celui-ci est également retrouvé dans les cellules cancéreuses et les cellules stromales de type PS1.



Discussion



Ce travail axé en deux grandes parties montre dans un premier temps l'importance de la signalisation sodique dans les mécanismes associés à la progression du cancer. Ici le canal NALCN et ses protéines partenaires ont été mis en avant comme acteurs importants dans la régulation de l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques jusqu'à présent associée à la signalisation calcique. Nous avons pu démontrer que l'homéostasie calcique est également en lien étroit avec l'homéostasie sodique et que certains acteurs sodiques sont primordiaux dans le maintien d'une signature calcique oscillatoire nécessaire à la progression du cancer. Il s'agit ici en réalité d'une double régulation par le calcium et le sodium qui est à l'origine de processus complexe permettant le mouvement cellulaire et la dégradation de l'environnement pour permettre l'invasion. Dans le cancer du pancréas, il semble évident que l'homéostasie calcique participe à la régulation nécessaire dans la modulation du micro-environnement. Probablement existe-t-il un rôle de l'homéostasie sodique également de par la codépendance calcium-sodium. En conclusion, ces résultats mettent en avant un rôle de l'homéostasie calcique et sodique dans l'adaptation tumorale en réponse aux stimuli environnementaux, et permettent la modulation des réponses cellulaires et du micro-environnement en lui-même. Néanmoins cette adaptation tumorale par l'homéostasie ionique évolue avec l'état tumoral, des types cellulaires présents dans la tumeur et le micro-environnement ainsi que sa composition acellulaire.

La connaissance plus approfondie des mécanismes du cancer de la prostate et l'existence de traitement plutôt efficace actuellement permet d'envisager une recherche afin d'améliorer la prise en charge des patients. Ceci pourrait se faire par la mise en place de recherche visant à moduler l'homéostasie cellulaire générale en commençant par le sodium et le calcium. L'inhibition ou le ciblage de certains acteurs spécifiques, tel que NALCN, à des stades tardifs du cancer de la prostate, pourrait permettre d'améliorer considérablement la prise en charge des patients en situation d'échec thérapeutique. La mise en place de modèles de culture 3D sur ce modèle prostatique permettrait de reproduire au mieux la signalisation calcique et sodique et la communication cellulaire dans un contexte de communication cellule-cellule par interaction directe. Le ciblage de nouveaux acteurs par pharmacologie, ou l'utilisation de nouveaux outils pourrait alors être testé dans des conditions 3D en y ajoutant ainsi la variable micro-environnementale. Cette variable micro-environnementale est également un élément essentiel dans la réponse aux traitements et dans la réaction aux stimuli. De plus comme le montre la deuxième partie de ce projet sur le cancer du pancréas, la réponse de l'homéostasie calcique est différente en fonction des sous-types cellulaires présents dans le milieu. Dans l'hypothèse de NALCN comme cible thérapeutique, il serait intéressant d'ajouter d'autres types cellulaires comme des neurones par exemple dans ce micro-environnement. En effet, le

cancer de la prostate est très innervé et ce canal NALCN est également primordial dans les neurones, de ce fait un traitement même localisé ciblant NALCN pourrait avoir un effet sur les nerfs du micro-environnement et moduler d'autres aspects qui seraient importants de prendre en compte. Ce canal NALCN a été supposé présent et associé à la progression d'autres types de cancers comme dans le cancer du pancréas où il est muté. C'est pourquoi la deuxième partie de ce travail porte sur le cancer du pancréas avec un contexte différent du fait de l'absence de traitement efficace notamment dû à la présence d'un dense tissu fibreux autour de la tumeur réduisant l'accès aux chimiothérapies. Des variations de l'homéostasie sodique et calcique sont à l'origine de communications cellulaires et du contrôle de la sécrétion notamment par le calcium. C'est dans ce contexte que nous avons imaginé que l'apparition du tissu fibreux dense autour des cellules cancéreuses pouvait être due à la sécrétion sous le contrôle de l'homéostasie calcique. De ce fait l'étude et la modulation de cette homéostasie calcique pourraient permettre de moduler la fibrose entourant la tumeur et ainsi permettre une amélioration de l'efficacité des chimiothérapies. Ce travail est en réalité une ouverture à des recherches plus précises puisqu'ici nous avons mimé à la fois la condition de rigidité et une partie de la communication avec le micro-environnement. Certaines propriétés cellulaires sont plus spécifiques de la rigidité de la matrice comme la migration, et a contrario, certaines sont plus spécifiques de la communication avec les autres types cellulaires comme l'entrée calcique. Aujourd'hui de nombreuses données issues du RNAseq peuvent être utilisées et regorgent d'informations encore inexploitées. Le différentiel d'expression est obtenu dans les différentes conditions de rigidité et de coculture, mais les processus biologiques associés à des clusters de gènes ne sont pas tous exploités actuellement. Ce RNAseq est une base de données conséquente qui permet d'avoir une ouverture quant à l'expression génique dans ces différentes conditions. Cependant, il est important de noter qu'outre la régulation transcriptionnelle, il existe également une régulation traductionnelle et de l'activité de chaque protéine. Néanmoins, l'analyse spécifique concernant la motilité a montré qu'elle pouvait être associée à la signalisation calcique dans le cas des cellules de types PS-1 et PANC1 lors des cocultures. En effet, cette signalisation calcique est impactée lors de cocultures avec les cellules stromales. L'homéostasie calcique est régulée de façon opposée entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales. L'augmentation de l'entrée calcique représentée par la densité moyenne de calcium pourrait jouer un rôle sur la sécrétion par les cellules de type PS-1 de molécules de matrice. Nous retrouvons dans les clusters du RNAseq de nombreuses molécules qui sont associées à la matrice extracellulaire, qui sont surexprimées dans des conditions de coculture pour les cellules de type PS-1. Ces molécules pourraient alors être sécrétées sous la dépendance de l'homéostasie calcique. D'autres acteurs qui ne sont pas

forcément directement associés au SOCE comme TRPC1 ou TRPV4 sont également retrouvés surexprimés dans certaines conditions. Ils pourraient alors participer également au maintien d'une augmentation de la densité de calcium dans ces cellules et ainsi participer à la sécrétion. Paradoxalement, les cellules de type PS-1 semblent diminuer la migration des cellules cancéreuses en coculture ainsi que l'entrée de calcium. Or, une des caractéristiques du cancer du pancréas reste l'invasion rapide des tissus environnants par le développement de métastases. D'autres sous-types cellulaires présents dans le micro-environnement pourraient donc avoir un effet inverse favorisant l'invasion de ces cellules cancéreuses. Cependant, le modèle d'étude en 2D présente une limite importante quand on parle de la rigidité puisqu'en effet, les cellules ne subissent la rigidité que sur une face et non pas sur l'intégralité de leur surface. C'est pourquoi l'utilisation de modèle 3D pourrait permettre de renforcer la connaissance de la communication lorsque les cellules subissent la rigidité de la matrice sur l'intégralité de leur surface cellulaire. De plus, l'organisation cellulaire en 3D favorise les interactions cellule-cellule directes qui peuvent également participer dans une modulation de leurs réponses. Comme nous avons pu le voir l'utilisation de cellules telles que les Capan-1, se prêtent très bien à la culture en 3D. Cette culture 3D outre le coût important présente également l'inconvénient du temps de culture qui est plus important, mais reste néanmoins envisageable dans le cas de test spécifique afin de valider les résultats obtenus en 2D par exemple. Cette deuxième partie apporte plus de questions que de réponses, puisqu'en effet l'homéostasie calcique semble impliquée mais qu'en est-il de la communication avec l'homéostasie sodique ? Les acteurs à l'origine de ce contrôle de l'homéostasie calcique peuvent être SOCE ou non, comme le montre le RNAseq avec l'expression de canaux TRPV, TRPC et TRPM. Le rôle concret du SOCE dans ce modèle pourrait être déterminé par le ciblage spécifique de certaines protéines par leur inhibition. L'utilisation de siRNA par exemple permettrait de suivre l'évolution du calcium et le rôle d'acteur particulier lorsque ceux-ci sont inhibés. Ces acteurs présentent des propriétés différentes qui permettent également un contrôle de la spatiotemporalité, et si l'on ajoute au calcium une étude du sodium, une régulation fine de l'homéostasie générale. La connaissance de cette régulation fine de l'homéostasie générale pourrait permettre le ciblage précis d'acteurs, afin de moduler de façon précise le micro-environnement et ainsi permettre une amélioration de l'efficacité des traitements. Le but étant d'éviter une dissémination encore plus rapide, en favorisant certains processus biologiques ou certains sous-types cellulaires dans le micro-environnement par exemple. Ces données restent donc préliminaires, qui ouvrent des perspectives pour d'autres recherches plus ciblées.



Références



- Abate-Shen C & Shen MM (2002) Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet* 18: S1–S5
- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, *et al* (2014) Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* 158: 1110–1122
- Adeyemo A, Gerry N, Chen G, Herbert A, Doumatey A, Huang H, Zhou J, Lashley K, Chen Y, Christman M, *et al* (2009) A genome-wide association study of hypertension and blood pressure in African Americans. *PLoS Genet* 5: e1000564
- Affo S, Nair A, Brundu F, Ravichandra A, Bhattacharjee S, Matsuda M, Chin LK, Filliol A, Wen W, Song X, *et al* (2021) Promotion of cholangiocarcinoma growth by diverse cancer-associated fibroblast subpopulations. *Cancer Cell* 39: 866–882.e11
- Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas G V, Weinstein AS, Friedl V, Zhang C, Witte ON, *et al* (2018) Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 36: 2492–2503
- Aizenstein M (2008) Principles of molecular oncology. *Rev Bras Ciências Farm* 44: 531–532
- Al-Sayed MD, Al-Zaidan H, Albakheet A, Hakami H, Kenana R, Al-Yafee Y, Al-Dosary M, Qari A, Al-Sheddi T, Al-Muheiza M, *et al* (2013) Mutations in NALCN cause an autosomal-recessive syndrome with severe hypotonia, speech impairment, and cognitive delay. *Am J Hum Genet* 93: 721–726
- Alexander SPH, Kelly E, Marrion N V, Peters JA, Faccenda E, Harding SD, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C & Davies JA (2017) The concise guide to pharmacology 2017/18: Other ion channels. *Br J Pharmacol* 174: S195–S207
- Alharbi AF & Parrington J (2019) Endolysosomal Ca²⁺ Signaling in Cancer: The Role of TPC2, From Tumorigenesis to Metastasis. *Front Cell Dev Biol* 7: 1–7
- Amazu C, Ma X, Henkes C, Ferreira JJ, Santi CM & England SK (2020) Progesterone and estrogen regulate NALCN expression in human myometrial smooth muscle cells. *Am J Physiol Metab* 318: E441–E452
- Amith SR & Fliegel L (2013) Regulation of the Na/H Exchanger (NHE1) in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 73: 1259–1264
- Amith SR, Fong S, Baksh S & Fliegel L (2015) Na⁺/H⁺ exchange in the tumour microenvironment: Does NHE1 drive breast cancer carcinogenesis? *Int J Dev Biol* 59: 367–377
- Amith SR, Vincent KM, Wilkinson JM, Postovit LM & Fliegel L (2017) Defining the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 interactome in triple-negative breast cancer cells. *Cell Signal* 29: 69–77
- Anderson KJ, Cormier RT & Scott PM (2019) Role of ion channels in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol* 25: 5732–5772
- Angius A, Cossu S, Uva P, Oppo M, Onano S, Persico I, Fotia G, Atzeni R, Cuccuru G, Asunis M, *et al* (2018) Novel NALCN biallelic truncating mutations in siblings with IHPF1 syndrome. *Clin Genet* 93: 1245–1247 doi:10.1111/cge.13162 [PREPRINT]
- Angius A, Uva P, Oppo M, Buers I, Persico I, Onano S, Cuccuru G, Van Allen MI, Hulait G, Aubertin G, *et al* (2019) Exome sequencing in Crisponi/cold-induced sweating syndrome-like individuals reveals unpredicted alternative diagnoses. *Clin Genet* 95: 607–614
- Aoyagi K, Rossignol E, Hamdan FF, Mulcahy B, Xie L, Nagamatsu S, Rouleau GA, Zhen M & Michaud JL (2015) A Gain-of-Function Mutation in NALCN in a Child with Intellectual Disability, Ataxia, and Arthrogryposis. *Hum Mutat* 36: 753–757

- Apte M V, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC & Wilson JS (1999) Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 44: 534–541
- Ardestani G, Mehregan A, Fleig A, Horgen FD, Carvacho I & Fissore RA (2020) Divalent cation influx and calcium homeostasis in germinal vesicle mouse oocytes. *Cell Calcium* 87: 102181
- Ardito CM, Grüner BM, Takeuchi KK, Lubeseder-Martellato C, Teichmann N, Mazur PK, Delgiorno KE, Carpenter ES, Halbrook CJ, Hall JC, *et al* (2012) EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 22: 304–317
- Askari A (2019) The other functions of the sodium pump. *Cell Calcium* 84: 102105
- Askland K, Read C & Moore J (2009) Pathways-based analyses of whole-genome association study data in bipolar disorder reveal genes mediating ion channel activity and synaptic neurotransmission. *Hum Genet* 125: 63–79
- Aviezer D, Hecht D, Safran M, Eisinger M, David G & Yaron A (1994) Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79: 1005–1013
- Ayala AG & Ro JY (2007) Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Arch Pathol Lab Med* 131: 1257–1266
- Azadi S, Tafazzoli-Shadpour M, Soleimani M & Warkiani ME (2019) Modulating cancer cell mechanics and actin cytoskeleton structure by chemical and mechanical stimulations. *J Biomed Mater Res A* 107: 1569–1581
- Babaei G, Aziz SGG & Jaghi NZZ (2021) EMT, cancer stem cells and autophagy; The three main axes of metastasis. *Biomed Pharmacother* 133: 110909
- Bae YH, Mui KL, Hsu BY, Liu S-L, Cretu A, Razinia Z, Xu T, Puré E & Assoian RK (2014) A FAK-Cas-Rac-lamellipodin signaling module transduces extracellular matrix stiffness into mechanosensitive cell cycling. *Sci Signal* 7: ra57
- Bandzerewicz A & Gadowska-Gajadhur A (2022) Into the Tissues: Extracellular Matrix and Its Artificial Substitutes: Cell Signalling Mechanisms. *Cells* 11
- Bardeesy N, Aguirre AJ, Chu GC, Cheng K-H, Lopez L V, Hezel AF, Feng B, Brennan C, Weissleder R, Mahmood U, *et al* (2006) Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5947–5952
- Barrett T, Riemer F, McLean MA, Kaggie J, Robb F, Tropp JS, Warren A, Bratt O, Shah N, Gnanapragasam VJ, *et al* (2018) Quantification of Total and Intracellular Sodium Concentration in Primary Prostate Cancer and Adjacent Normal Prostate Tissue with Magnetic Resonance Imaging. *Invest Radiol* 53: 450–456
- Bartis D, Mise N, Mahida RY, Eickelberg O & Thickett DR (2014) Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax* 69: 760–765
- Batlle E & Massagué J (2019) Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity* 50: 924–940
- Batut B, Van den Beek M, Doyle M & Soranzo N (2021) RNA-Seq Data Analysis in Galaxy Be'ré'nice. *Methods Mol Biol* 2284: 367–392
- Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W, Klemens B, Schulze TG, Cichon S, Rietschel M, Nöthen MM, *et al* (2008) A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 13: 197–207

- Beatty BT & Condeelis J (2014) Digging a little deeper: The stages of invadopodium formation and maturation. *Eur J Cell Biol* 93: 438–444
- Ben-Kasus Nissim T, Zhang X, Elazar A, Roy S, Stolwijk JA, Zhou Y, Motiani RK, Gueguinou M, Hempel N, Hershinkel M, *et al* (2017) Mitochondria control store-operated Ca²⁺ entry through Na⁺ and redox signals. *EMBO J* 36: 797–815
- Benton G, Arnaoutova I, George J, Kleinman HK & Koblinski J (2014) Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev* 79–80: 3–18
- Bernard V, Semaan A, Huang J, San Lucas FA, Mulu FC, Stephens BM, Guerrero PA, Huang Y, Zhao J, Kamyabi N, *et al* (2019) Single-Cell Transcriptomics of Pancreatic Cancer Precursors Demonstrates Epithelial and Microenvironmental Heterogeneity as an Early Event in Neoplastic Progression. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 25: 2194–2205
- Berridge MJ, Lipp P & Bootman MD (2000) 2000-Review-Calcium Signalling. 1: 11–21
- Bertoli C, Skotheim JM & de Bruin RAM (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 518–528
- Bezprozvanny IB (2010) Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae* 2: 72–82
- Bhattacharjee S, Hamberger F, Ravichandra A, Miller M, Nair A, Affo S, Filliol A, Chin L, Savage TM, Yin D, *et al* (2021) Tumor restriction by type I collagen opposes tumor-promoting effects of cancer-associated fibroblasts. *J Clin Invest* 131
- Biankin A V, Waddell N, Kassahn KS, Gingras M, Muthuswamy LB, Johns AL, Miller DK, Wilson PJ, Wu J, Chang DK, *et al* (2012) Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* 491: 399–405
- Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crépin A, Delcourt P, Slomianny C, Thebault S, Bonnal JL, Benahmed M, Cabon F, *et al* (2005) Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: Functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* 12: 367–382
- Biffi G, Oni TE, Spielman B, Hao Y, Elyada E, Park Y, Preall J & Tuveson DA (2019) IL1-Induced JAK/STAT Signaling Is Antagonized by TGF β to Shape CAF Heterogeneity in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Discov* 9: 282–301
- Bishop JR, Schuksz M & Esko JD (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446: 1030–1037
- Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, Parmigiani G, Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC-H, Leary RJ, Eshleman JR, *et al* (2009) SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 15: 4674–4679
- Blandino G & Di Agostino S (2018) New therapeutic strategies to treat human cancers expressing mutant p53 proteins. *J Exp Clin Cancer Res* 37: 30
- Bluemn EG, Coleman IM, Lucas JM, Coleman RT, Hernandez-Lopez S, Tharakan R, Bianchi-Frias D, Dumpit RF, Kaipainen A, Corella AN, *et al* (2017) Androgen Receptor Pathway-Independent Prostate Cancer Is Sustained through FGF Signaling. *Cancer Cell* 32: 474–489.e6
- Bogeski I, Kilch T & Niemeyer BA (2012) ROS and SOCE: Recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J Physiol* 590: 4193–4200
- Bonnett K, Zweig R, Aamodt EJ & Dwyer DS (2014) Food deprivation and nicotine correct akinesia and freezing in Na⁽⁺⁾-leak current channel (NALCN)-deficient strains of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Brain Behav* 13: 633–642

- Bononi A, Giorgi C, Patergnani S, Larson D, Verbruggen K, Tanji M, Pellegrini L, Signorato V, Olivetto F, Pastorino S, *et al* (2017) BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature* 546: 549–553
- Boone AN, Senatore A, Chemin J, Monteil A & Spafford JD (2014) Gd³⁺ and calcium sensitive, sodium leak currents are features of weak membrane-glass seals in patch clamp recordings. *PLoS One* 9
- Bootman MD, Rietdorf K, Hardy H, Dautova Y, Corps E, Pierro C, Stapleton E, Kang E & Proudfoot D (2012) Calcium Signalling and Regulation of Cell Function. *eLS*
- Bouasse M, Impheng H, Servant Z, Lory P & Monteil A (2019) Functional expression of CLIFAHDD and IHPRF pathogenic variants of the NALCN channel in neuronal cells reveals both gain- and loss-of-function properties. *Sci Rep* 9: 11791
- Bourque DK, Dymont DA, MacLusky I, Kernohan KD & McMillan HJ (2018) Periodic breathing in patients with NALCN mutations. *J Hum Genet* 63: 1093–1096
- Bramswig NC, Bertoli-Avella AM, Albrecht B, Al Aqeel AI, Alhashem A, Al-Sannaa N, Bah M, Bröhl K, Depienne C, Dorison N, *et al* (2018) Genetic variants in components of the NALCN-UNC80-UNC79 ion channel complex cause a broad clinical phenotype (NALCN channelopathies). *Hum Genet* 137: 753–768
- Brandman O, Liou J, Park WS & Meyer T (2007) STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell* 131: 1327–1339
- Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J & Forman D (2012) Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* 13: 790–801
- Brini M, Cali T, Ottolini D & Carafoli E (2013) Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling. In *Metallomics and the Cell*, Banci L (ed) pp 119–168. Dordrecht: Springer Netherlands
- Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, Rubino R, Besson P, Labbal F, Chevalier S, *et al* (2013a) Nav1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* 126: 4835–4842
- Brisson L, Driffort V, Benoist L, Poet M, Counillon L, Antelmi E, Rubino R, Besson P, Labbal F, Chevalier S, *et al* (2013b) Nav1.5 Na⁺ channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote the activity of breast cancer cell invadopodia. *J Cell Sci* 126: 4835–4842
- Brodsky B & Persikov A V (2005) Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 70: 301–339
- Burgoyne T, Patel S & Eden ER (2014) Calcium signaling at ER membrane contact sites. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1853: 2012–2017
- Busco G, Cardone RA, Greco MR, Bellizzi A, Colella M, Antelmi E, Mancini MT, Dell'Aquila ME, Casavola V, Paradiso A, *et al* (2010) NHE1 promotes invadopodial ECM proteolysis through acidification of the peri-invadopodial space. *FASEB J* 24: 3903–3915
- Bussard KM, Mutkus L, Stumpf K, Gomez-Manzano C & Marini FC (2016) Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res* 18: 1–11
- Büsselberg D & Florea AM (2017) Targeting intracellular calcium signaling ([Ca²⁺]_i) to overcome acquired multidrug resistance of cancer cells: A mini-overview. *Cancers (Basel)* 9
- Campbell TM, Main MJ & Fitzgerald EM (2013) Functional expression of the voltage-gated Na⁺-channel Nav1.7 is necessary for EGF-mediated invasion in human non-small cell

- lung cancer cells. *J Cell Sci* 126: 4939–4949
- Carapuça EF, Gemenetzidis E, Feig C, Bapiro TE, Williams MD, Wilson AS, Delvecchio FR, Arumugam P, Grose RP, Lemoine NR, *et al* (2016) Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol* 239: 286–296
- Cardone RA, Alfarouk KO, Elliott RL, Alqahtani SS, Ahmed SBM, Aljarbou AN, Greco MR, Cannone S & Reshkin SJ (2019) The role of sodium hydrogen exchanger 1 in dysregulation of proton dynamics and reprogramming of cancer metabolism as a sequela. *Int J Mol Sci* 20: 1–14
- Catterall WA, Cestèle S, Yarov-Yarovoy V, Yu FH, Konoki K & Scheuer T (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon* 49: 124–141
- Cha A, Ruben PC, George ALJ, Fujimoto E & Bezanilla F (1999) Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation. *Neuron* 22: 73–87
- Chaudhuri O, Koshy ST, Branco da Cunha C, Shin J-W, Verbeke CS, Allison KH & Mooney DJ (2014) Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater* 13: 970–978
- Chen H-Q, Zhao J, Li Y, He L-X, Huang Y-J, Shu W-Q, Cao J, Liu W-B & Liu J-Y (2018a) Gene expression network regulated by DNA methylation and microRNA during microcystin-leucine arginine induced malignant transformation in human hepatocyte L02 cells. *Toxicol Lett* 289: 42–53
- Chen X, Wanggou S, Bodalia A, Zhu M, Dong W, Fan JJ, Yin WC, Min H-K, Hu M, Draghici D, *et al* (2018b) A Feedforward Mechanism Mediated by Mechanosensitive Ion Channel PIEZO1 and Tissue Mechanics Promotes Glioma Aggression. *Neuron* 100: 799-815.e7
- Chen YF, Hsu KF & Shen MR (2016) The store-operated Ca²⁺ entry-mediated signaling is important for cancer spread. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863: 1427–1435
- Cheng X-B, Kohi S, Koga A, Hirata K & Sato N (2016) Hyaluronan stimulates pancreatic cancer cell motility. *Oncotarget* 7: 4829–4840
- Choi S-C, Choi J-H, Park C-Y, Ahn C-M, Hong S-J & Lim D-S (2012) Nanog regulates molecules involved in stemness and cell cycle-signaling pathway for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma stem cells. *J Cell Physiol* 227: 3678–3692
- Chong JX, Mcmillin MJ, Shively KM, Beck AE, Marvin CT, Armenteros JR, Buckingham KJ, Nkinsi NT, Boyle EA, Berry MN, *et al* (2015) De Novo Mutations in NALCN Cause a Syndrome Characterized by Congenital Contractures of the Limbs and Face, Hypotonia, and Developmental Delay. *Am J Hum Genet* 96: 462–473
- Chow CY, Chin YK-Y, Walker AA, Guo S, Blomster L V, Ward MJ, Herzig V, Rokyta DR & King GF (2020) Venom Peptides with Dual Modulatory Activity on the Voltage-Gated Sodium Channel NaV1.1 Provide Novel Leads for Development of Antiepileptic Drugs. *ACS Pharmacol Transl Sci* 3: 119–134
- Chua HC, Wulf M, Weidling C, Rasmussen LP & Pless SA (2020) The NALCN channel complex is voltage sensitive and directly modulated by extracellular calcium. *Sci Adv* 6: eaaz3154
- Cicenas J, Kvederaviciute K, Meskinyte I, Meskinyte-Kausiliene E, Skeberdyte A & Cicenas J (2017) KRAS, TP53, CDKN2A, SMAD4, BRCA1, and BRCA2 Mutations in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 9
- Cochet-Bissuel M, Lory P & Monteil A (2014a) The sodium leak channel, NALCN, in health and disease. *Front Cell Neurosci* 8: 1–17

- Cochet-Bissuel M, Lory P & Monteil A (2014b) The sodium leak channel, NALCN, in health and disease. *Front Cell Neurosci* 8: 1–17
- Collins K, Jacks T & Pavletich NP (1997) The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 2776–2778 doi:10.1073/pnas.94.7.2776 [PREPRINT]
- Conklin MW, Eickhoff JC, Riching KM, Pehlke CA, Eliceiri KW, Provenzano PP, Friedl A & Keely PJ (2011) Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma. *Am J Pathol* 178: 1221–1232
- Cui C, Merritt R, Fu L & Pan Z (2017) Targeting calcium signaling in cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 7: 3–17
- Cui H, Freeman C, Jacobson GA & Small DH (2013) Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 65: 108–120
- Culhaci N, Sagol O, Karademir S, Astarcioglu H, Astarcioglu I, Soy Turk M, Oztop I & Obuz F (2005) Expression of transforming growth factor-beta-1 and p27Kip1 in pancreatic adenocarcinomas: relation with cell-cycle-associated proteins and clinicopathologic characteristics. *BMC Cancer* 5: 98
- Dabovic B, Chen Y, Choi J, Davis EC, Sakai LY, Todorovic V, Vassallo M, Zilberberg L, Singh A & Rifkin DB (2011) Control of lung development by latent TGF- β binding proteins. *J Cell Physiol* 226: 1499–1509
- Dai C, Heemers H & Sharifi N (2017) Androgen signaling in prostate cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7: 1–18
- Danese A, Patergnani S, Bonora M, Wieckowski MR, Previati M, Giorgi C & Pinton P (2017) Calcium regulates cell death in cancer: Roles of the mitochondria and mitochondria-associated membranes (MAMs). *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1858: 615–627
- Davidson SM, Foote K, Kunuthur S, Gosain R, Tan N, Tyser R, Zhao YJ, Graeff R, Ganesan A, Duchon MR, *et al* (2015) Inhibition of NAADP signalling on reperfusion protects the heart by preventing lethal calcium oscillations via two-pore channel 1 and opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res* 108: 357–366
- Delierneux C, Kouba S, Shanmughapriya S, Potier-Cartereau M, Trebak M & Hempel N (2020) Mitochondrial Calcium Regulation of Redox Signaling in Cancer. *Cells* 9: 432
- Deng B, Zhao Z, Kong W, Han C, Shen X & Zhou C (2022) Biological role of matrix stiffness in tumor growth and treatment. *J Transl Med* 20: 1–15
- Denis M, Gregory A, Bayat M, Fazio RT, Whaley DH, Ghosh K, Shah S, Fatemi M & Alizad A (2016) Correlating Tumor Stiffness with Immunohistochemical Subtypes of Breast Cancers: Prognostic Value of Comb-Push Ultrasound Shear Elastography for Differentiating Luminal Subtypes. *PLoS One* 11: e0165003
- Deryugina EI & Quigley JP (2017) Tumor Angiogenesis: MMP-Mediated Induction of Intravasation- and Metastasis-Sustaining Neovasculature Elena. *J Int Soc Burn Inj* 43: 909–932
- Desai PN, Zhang X, Wu S, Janoshazi A, Bolimuntha S, Putney JW & Trebak M (2015) Multiple types of calcium channels arising from alternative translation initiation of the *Orai1* message. *Sci Signal* 8: ra74–ra74
- Diez-Bello R, Jardin I, Salido GM & Rosado JA (2017) Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1864: 1064–1070
- Ding JH, Jin Z, Yang X, Lou J, Shan W, Hu Y, Du Q, Liao Q, Xu J & Xie R (2020) Plasma membrane Ca²⁺-permeable channels and sodium/calcium exchangers in tumorigenesis

- and tumor development of the upper gastrointestinal tract. *Cancer Lett* 475: 14–21
- Djamgoz MBA, Coombes RC & Schwab A (2014) Ion transport and cancer: From initiation to metastasis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 369: 7–9
- Djamgoz MBA, Fraser SP & Brackenbury WJ (2019) In vivo evidence for voltage-gated sodium channel expression in carcinomas and potentiation of metastasis. *Cancers (Basel)* 11
- Doello K (2018) The role of trophoblastic epigenetic reprogramming in benign tumor cells on malignant progression: A molecular hypothesis. *Med Hypotheses* 113: 68–71
- Dolmetsch RE, Xu K & Lewis RS (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392: 933–936
- Driffort V, Gillet L, Bon E, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Joulin V, Collin C, Pagès JC, Jourdan ML, Chevalier S, *et al* (2014) Ranolazine inhibits Nav1.5-mediated breast cancer cell invasiveness and lung colonization. *Mol Cancer* 13: 1–6
- Dubois C, Vanden Abeele F, Lehen'kyi V, Gkika D, Guarmit B, Lepage G, Slomianny C, Borowiec A, Bidaux G, Benahmed M, *et al* (2014) Remodeling of Channel-Forming ORAI Proteins Determines an Oncogenic Switch in Prostate Cancer. *Cancer Cell* 26: 19–32
- Dubois C, Kondratska K, Kondratskyi A, Morabito A, Mesilmany L, Farfariello V, Toillon R-A, Ziental Gelus N, Laurence E, Vanden Abeele F, *et al* (2021) ORAI3 silencing alters cell proliferation and promotes mitotic catastrophe and apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868: 119023
- Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, Zanconato F, Le Digabel J, Forcato M, Bicciato S, *et al* (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474: 179–183
- Egan JM, Peterson CA & Fry WM (2018) Lack of current observed in HEK293 cells expressing NALCN channels. *Biochim Open* 6: 24–28
- Ellenrieder V, Hendler SF, Boeck W, Seufferlein T, Menke A, Ruhland C, Adler G & Gress TM (2001) Transforming growth factor beta1 treatment leads to an epithelial-mesenchymal transdifferentiation of pancreatic cancer cells requiring extracellular signal-regulated kinase 2 activation. *Cancer Res* 61: 4222–4228
- Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le Q-T & Giaccia AJ (2009) Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15: 35–44
- Esko JD, Kimata K & Lindahl U (2009) Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In, Varki A Cummings RD Esko JD Freeze HH Stanley P Bertozzi CR Hart GW & Etzler ME (eds) Cold Spring Harbor (NY)
- Esposito MR, Binatti A, Pantile M, Coppe A, Mazzocco K, Longo L, Capasso M, Lasorsa VA, Luksch R, Bortoluzzi S, *et al* (2018) Somatic mutations in specific and connected subpathways are associated with short neuroblastoma patients' survival and indicate proteins targetable at onset of disease. *Int J Cancer* 143: 2525–2536
- Evans A, Whelehan P, Thomson K, McLean D, Brauer K, Purdie C, Baker L, Jordan L, Rauchhaus P & Thompson A (2012) Invasive breast cancer: relationship between shear-wave elastographic findings and histologic prognostic factors. *Radiology* 263: 673–677
- Ewan KB, Shyamala G, Ravani SA, Tang Y, Akhurst R, Wakefield L & Barcellos-Hoff MH (2002) Latent transforming growth factor-beta activation in mammary gland: regulation by ovarian hormones affects ductal and alveolar proliferation. *Am J Pathol* 160: 2081–2093
- Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA & Clark AT (2005) Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. *Cancer* 104: 2255–2265

- Fan Y, Sun Q, Li X, Feng J, Ao Z, Li X & Wang J (2021) Substrate Stiffness Modulates the Growth, Phenotype, and Chemoresistance of Ovarian Cancer Cells. *Front cell Dev Biol* 9: 718834
- Fattet L, Jung H-Y, Matsumoto MW, Aubol BE, Kumar A, Adams JA, Chen AC, Sah RL, Engler AJ, Pasquale EB, *et al* (2020) Matrix Rigidity Controls Epithelial-Mesenchymal Plasticity and Tumor Metastasis via a Mechanoresponsive EPHA2/LYN Complex. *Dev Cell* 54: 302-316.e7
- Faugeroux V, Pailler E, Oulhen M, Deas O, Brulle-Soumare L, Hervieu C, Marty V, Alexandrova K, Andree KC, Stoecklein NH, *et al* (2020) Genetic characterization of a unique neuroendocrine transdifferentiation prostate circulating tumor cell-derived explant model. *Nat Commun* 11: 1–16
- Feldmann G, Beaty R, Hruban RH & Maitra A (2007) Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 14: 224–232
- Fels B, Nielsen N & Schwab A (2016) Role of TRPC1 channels in pressure - mediated activation of murine pancreatic stellate cells. *Eur Biophys J* 45: 657–670
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D & Bray F (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136: E359–E386
- Feske S (2011) Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Ann N Y Acad Sci* 1238: 74–90
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M & Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441: 179–185
- Flourakis M, Kula-Eversole E, Hutchison AL, Han TH, Aranda K, Moose DL, White KP, Dinner AR, Lear BC, Ren D, *et al* (2015) A Conserved Bicycle Model for Circadian Clock Control of Membrane Excitability. *Cell* 162: 836–848
- Fontanillo C, Aibar S, Sanchez-Santos JM & De Las Rivas J (2012) Combined analysis of genome-wide expression and copy number profiles to identify key altered genomic regions in cancer. *BMC Genomics* 13 Suppl 5: S5
- Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, Fukutaki K, Fullman N, McGaughey M, Pletcher MA, Smith AE, Tang K, Yuan C-W, *et al* (2018) Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet (London, England)* 392: 2052–2090
- Fradet A, Sorel H, Depalle B, Serre CM, Farlay D, Turtoi A, Bellahcene A, Follet H, Castronovo V, Clézardin P, *et al* (2013) A New Murine Model of Osteoblastic/Osteolytic Lesions from Human Androgen-Resistant Prostate Cancer. *PLoS One* 8: e75092
- Fratzl P, Misof K, Zizak I, Rapp G, Amenitsch H & Bernstorff S (1998) Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J Struct Biol* 122: 119–122
- Friedl P & Wolf K (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 3: 362–374
- Friedl P & Wolf K (2008) Tube travel: The role of proteases in individual and collective cancer cell invasion. *Cancer Res* 68: 7247–7249
- Fries H, Elsässer HP, Mahlbacher V, Neumann K & Kern HF (1994) Localisation of hyaluronate (HA) in primary tumors and nude mouse xenografts of human pancreatic carcinomas using a biotinylated HA-binding protein. *Virchows Arch* 424: 7–12
- Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, Ebert M, Begler HG, Gold LI & Korc M (1993) Enhanced

- expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 105: 1846–1856
- Frischauf I, Schindl R, Derler I, Bergsmann J, Fahrner M & Romanin C (2008) The STIM/Orai coupling machinery. *Channels* 2: 261–268
- Froeling FEM, Feig C, Chelala C, Dobson R, Mein CE, Tuveson DA, Clevers H, Hart IR & Kocher HM (2011) Retinoic Acid-Induced Pancreatic Stellate Cell Quiescence Reduces Paracrine Wnt/Catenin Signaling to Slow Tumor Progression. *Gastroenterology* 141: 1486-1497.e14
- Fukai R, Saitsu H, Okamoto N, Sakai Y, Fattal-Valevski A, Masaaki S, Kitai Y, Torio M, Kojima-Ishii K, Ihara K, *et al* (2016) De novo missense mutations in NALCN cause developmental and intellectual impairment with hypotonia. *J Hum Genet* 61: 451–455
- Fukushima M, Tomita T, Janoshazi A & Putney JW (2012) Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J Cell Sci* 125: 4354–4361
- Fullár A, Dudás J, Oláh L, Hollósi P, Papp Z, Sobel G, Karászi K, Paku S, Baghy K & Kovalszky I (2015) Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer* 15: 256
- Gao R, Shen Y, Cai J, Lei M & Wang Z (2010) Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer. *Oncol Rep* 23: 1293–1299
- Gao S, Xie L, Kawano T, Po MD, Pirri JK, Guan S, Alkema MJ & Zhen M (2015) Corrigendum: The NCA sodium leak channel is required for persistent motor circuit activity that sustains locomotion. *Nat Commun* 6: 7191 doi:10.1038/ncomms8191 [PREPRINT]
- Gawlitza J, Reiss-Zimmermann M, Thörmer G, Schaudinn A, Linder N, Garnov N, Horn L-C, Minh DH, Ganzer R, Stolzenburg J-U, *et al* (2017) Impact of the use of an endorectal coil for 3 T prostate MRI on image quality and cancer detection rate. *Sci Rep* 7: 40640
- Geiger B & Zamir E (2001) Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 114: 3577–3579
- Gentiluomo M, Canzian F, Nicolini A, Gemignani F, Landi S & Campa D (2022) Germline genetic variability in pancreatic cancer risk and prognosis. *Semin Cancer Biol* 79: 105–131
- Ghezzi A, Liebeskind BJ, Thompson A, Atkinson NS & Zakon HH (2014) Ancient association between cation leak channels and Mid1 proteins is conserved in fungi and animals. *Front Mol Neurosci* 7: 15
- Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G & Le Guennec JY (2009a) Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* 284: 8680–8691
- Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, Lalmanach G & Le Guennec JY (2009b) Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* 284: 8680–8691
- Gkretsi V & Stylianopoulos T (2018) Cell Adhesion and Matrix Stiffness: Coordinating Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Front Oncol* 8: 145
- Glazer ES, Welsh E, Pimiento JM, Teer JK & Malafa MP (2017) TGFβ1 overexpression is associated with improved survival and low tumor cell proliferation in patients with early-stage pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 8: 999–1006
- Goeckeler ZM, Masaracchia RA, Zeng Q, Chew TL, Gallagher P & Wysolmerski RB (2000) Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J Biol Chem* 275: 18366–18374

- Gopal S, Veracini L, Grall D, Butori C, Schaub S, Audebert S, Camoin L, Baudelet E, Radwanska A, Beghelli-de la Forest Divonne S, *et al* (2017) Fibronectin-guided migration of carcinoma collectives. *Nat Commun* 8: 14105
- Grimm C, Bartel K, Vollmar AM & Biel M (2018) Endolysosomal cation channels and cancer—a link with great potential. *Pharmaceuticals* 11: 1–8
- Gross S, Hooper R, Tomar D, Armstead AP, Shanas N, Mallu P, Joshi H, Ray S, Chong PL-G, Astsaturov I, *et al* (2022) Suppression of Ca(2+) signaling enhances melanoma progression. *EMBO J* 41: e110046
- Guclur A & Hogan PG (2017) The STIM-Orai Pathway: Orai, the Pore-Forming Subunit of the CRAC Channel. In *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways: Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)physiology*, Groschner K Graier WF & Romanin C (eds) pp 39–57. Cham: Springer International Publishing
- Guéguinou M, Gambade A, Félix R, Chantôme A, Fourbon Y, Bougnoux P, Weber G, Potier-Cartereau M & Vandier C (2015) Lipid rafts, KCa/ClCa/Ca²⁺ channel complexes and EGFR signaling: Novel targets to reduce tumor development by lipids? *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1848: 2603–2620
- Guo Y, Liu S, Wang P, Zhao S, Wang F, Bing L, Zhang Y, Ling E-A, Gao J & Hao A (2011) Expression profile of embryonic stem cell-associated genes Oct4, Sox2 and Nanog in human gliomas. *Histopathology* 59: 763–775
- Gupta S & Maitra A (2016) EMT: Matter of Life or Death? *Cell* 164: 840–842
- Guzman R, Valente EG, Pretorius J, Pacheco E, Qi M, Bennett BD, Fong DH, Lin F-F, Bi V & McBride HJ (2014) Expression of ORAI1, a plasma membrane resident subunit of the CRAC channel, in rodent and non-rodent species. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc* 62: 864–878
- Gwack Y, Srikanth S, Feske S, Cruz-Guilloty F, Oh-hora M, Neems DS, Hogan PG & Rao A (2007) Biochemical and functional characterization of Orai proteins. *J Biol Chem* 282: 16232–16243
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, *et al* (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271: 350–353
- Han J, Zhang F, Yu M, Zhao P, Ji W, Zhang H, Wu B, Wang Y & Niu R (2012) RNA interference-mediated silencing of NANOG reduces cell proliferation and induces G0/G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Cancer Lett* 321: 80–88
- Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12: 31–46
- Hanahan D & Coussens LM (2012) Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* 21: 309–322
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674
- Haneder S, Giordano FA, Konstandin S, Brehmer S, Buesing KA, Schmiedek P, Schad LR, Wenz F, Schoenberg SO & Ong MM (2015) ²³Na-MRI of recurrent glioblastoma multiforme after intraoperative radiotherapy: technical note. *Neuroradiology* 57: 321–326
- Hansel DE, Kern SE & Hruban RH (2003) Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4: 237–256
- Harnden P, Shelley MD, Coles B, Staffurth J & Mason MD (2007) Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 8: 411–419
- Hay ED (1991) Cell biology of extracellular matrix Springer Science & Business Media

- He W, Li K, Wang F, Qin Y-R & Fan Q-X (2012) Expression of OCT4 in human esophageal squamous cell carcinoma is significantly associated with poorer prognosis. *World J Gastroenterol* 18: 712–719
- Henke E, Nandigama R & Ergün S (2020) Extracellular Matrix in the Tumor Microenvironment and Its Impact on Cancer Therapy. *Front Mol Biosci* 6: 1–24
- Hezel AF, Deshpande V, Zimmerman SM, Contino G, Alagesan B, O'Dell MR, Rivera LB, Harper J, Lonning S, Brekken RA, *et al* (2012) TGF- β and $\alpha\beta 6$ integrin act in a common pathway to suppress pancreatic cancer progression. *Cancer Res* 72: 4840–4845
- Hidalgo M (2010) Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* 362: 1605–1617
- Hilgemann DW (2020) Control of cardiac contraction by sodium: Promises, reckonings, and new beginnings. *Cell Calcium* 85: 102129
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S & Tuveson DA (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7: 469–483
- Hinshaw DC & Shevde LA (2019) The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res* 79: 4557–4566
- Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg H-H, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, Grützmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger H-D, *et al* (2007) Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* 67: 8344–8350
- Hofmarcher T, Lindgren P, Wilking N & Jönsson B (2020) The cost of cancer in Europe 2018. *Eur J Cancer* 129: 41–49
- Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K & Saitoh M (2009) Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 284: 245–253
- Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajzman ZL, Friedman M, Papsidero L, Kim U, Chai LS, Kakati S, Arya SK, *et al* (1980) The LNCaP cell line - a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res* 37: 115–132
- House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, *et al* (2010a) Voltage-gated Na⁺ channel SCN5A is a key regulator of a gene transcriptional network that controls colon cancer invasion. *Cancer Res* 70: 6957–6967
- House CD, Vaske CJ, Schwartz AM, Obias V, Frank B, Luu T, Sarvazyan N, Irby R, Strausberg RL, Hales TG, *et al* (2010b) Voltage-Gated Na⁺ Channel SCN5A Is a Key Regulator of a Gene Transcriptional Network That Controls Colon Cancer Invasion. *Cancer Res* 70: 6957–6967
- House CD, Wang B-D, Ceniccola K, Williams R, Simaan M, Olender J, Patel V, Baptista-Hon DT, Annunziata CM, Silvio Gutkind J, *et al* (2015) Voltage-gated Na⁺ Channel Activity Increases Colon Cancer Transcriptional Activity and Invasion Via Persistent MAPK Signaling. *Sci Rep* 5: 11541
- Hu B, Wu C, Mao H, Gu H, Dong H, Yan J, Qi Z, Yuan L, Dong Q & Long J (2022) Subpopulations of cancer-associated fibroblasts link the prognosis and metabolic features of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Transl Med* 10: 262–262
- Hu C, Hart SN, Polley EC, Gnanaolivu R, Shimelis H, Lee KY, Lilyquist J, Na J, Moore R, Antwi SO, *et al* (2018) Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA* 319: 2401–2409
- Huang P, Chen J, Wang L, Na Y, Kaku H, Ueki H, Sasaki K, Yamaguchi K, Zhang K, Saika T, *et al* (2012) Implications of transcriptional factor, OCT-4, in human bladder malignancy and

- tumor recurrence. *Med Oncol* 29: 829–834
- Huang Q, Li X-M, Sun J-P & Zhou Y (2022) Tumor-derived endomucin promotes colorectal cancer proliferation and metastasis. *Cancer Med*
- Hui L, Geiger NH, Bloor-Young D, Churchill GC, Geiger JD & Chen X (2015) Release of calcium from endolysosomes increases calcium influx through N-type calcium channels: Evidence for acidic store-operated calcium entry in neurons. *Cell Calcium* 58: 617–627
- Hulbert-Williams NJ, Beatty L & Dhillon HM (2018) Psychological support for patients with cancer: evidence review and suggestions for future directions. *Curr Opin Support Palliat Care* 12
- Hulmes DJS (2002) Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol* 137: 2–10
- Humphrey JA, Hamming KS, Thacker CMM, Scott RL, Sedensky MMM, Snutch TP, Morgan PGG & Nash HA (2007) A Putative Cation Channel and Its Novel Regulator: Cross-Species Conservation of Effects on General Anesthesia. *Curr Biol* 17: 624–629
- Hunger J, Bernecker A, Bakker HJ, Bonn M & Richter RP (2012) Hydration dynamics of hyaluronan and dextran. *Biophys J* 103: L10-2
- Iamshanova O, Fiorio Pla A & Prevarskaya N (2017) Molecular mechanisms of tumour invasion: regulation by calcium signals. *J Physiol* 595: 3063–3075
- Iamshanova O, Mariot P, Lehen'kyi V & Prevarskaya N (2016) Comparison of fluorescence probes for intracellular sodium imaging in prostate cancer cell lines. *Eur Biophys J* 45: 765–777
- Iftinca MC (2011) Neuronal T-type calcium channels: what's new? Iftinca: T-type channel regulation. *J Med Life* 4: 126–138
- Impheng H (2020) Expression Fonctionnelle du canal sodique de fuite NALCN en système recombinant.
- Impheng H, Lemmers C, Bouasse M, Legros C, Pakaprot N, Guérineau NC, Lory P & Monteil A (2021) The sodium leak channel NALCN regulates cell excitability of pituitary endocrine cells. *FASEB J* 35
- Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T & Tuveson DA (2001) Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15: 3243–3248
- Jackson SP & Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071–1078
- Jacobs MA, Ouwerkerk R, Wolff AC, Gabrielson E, Warzecha H, Jeter S, Bluemke DA, Wahl R & Stearns V (2011) Monitoring of neoadjuvant chemotherapy using multiparametric, ²³Na sodium MR, and multimodality (PET/CT/MRI) imaging in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 128: 119–126
- Jardin I & Rosado JA (2016) STIM and calcium channel complexes in cancer. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863: 1418–1426
- Javle M, Li Y, Tan D, Dong X, Chang P, Kar S & Li D (2014) Biomarkers of TGF- β signaling pathway and prognosis of pancreatic cancer. *PLoS One* 9: e85942
- Johnstone LS, Graham SJL & Dziadek MA (2010) STIM proteins: integrators of signalling pathways in development, differentiation and disease. *J Cell Mol Med* 14: 1890–1903
- Jospin M, Watanabe S, Joshi D, Young S, Hamming K, Thacker C, Snutch TP & Jorgensen EM (2007) Report UNC-80 and the NCA Ion Channels Contribute to Endocytosis Defects in Synaptojanin Mutants. *Curr Biol* 17: 1595–1600
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF & Jones LW (1979) Establishment and

- characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17: 16–23
- Kalluri R & Weinberg RA (2009) Particle-in-cell simulations of a beam driven plasma. *J Clin Invest* 119: 1420–1428
- Kanda M, Matthaei H, Wu J, Hong S-M, Yu J, Borges M, Hruban RH, Maitra A, Kinzler K, Vogelstein B, *et al* (2012) Presence of somatic mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia. *Gastroenterology* 142: 730–733.e9
- Kang Y & Chen L (2022) Structure and mechanism of NALCN-FAM155A-UNC79-UNC80 channel complex. *Nat Commun* 13: 1–10
- Kang Y, Wu JX & Chen L (2020) Structure of voltage-modulated sodium-selective NALCN-FAM155A channel complex. *Nat Commun* 11: 1–10
- Kano MR, Bae Y, Iwata C, Morishita Y, Yashiro M, Oka M, Fujii T, Komuro A, Kiyono K, Kaminishi M, *et al* (2007) Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 3460–3465
- Kar S & Patra SK (2018) Overexpression of OCT4 induced by modulation of histone marks plays crucial role in breast cancer progression. *Gene* 643: 35–45
- Kasap M, Aamodt EJ, Sagrera CE & Dwyer DS (2020) Novel pharmacological modulation of dystonic phenotypes caused by a gain-of-function mutation in the Na⁺ leak-current channel. *Behav Pharmacol* 31: 465–476
- Kasap M, Bonnett K, Aamodt EJ & Dwyer DS (2017) Akinesia and freezing caused by Na⁺leak-current channel (NALCN) deficiency corrected by pharmacological inhibition of K⁺channels and gap junctions. *J Comp Neurol* 525: 1109–1121
- Kaur H, Samarska I, Lu J, Faisal F, Maughan BL, Murali S, Asrani K, Alshalalfa M, Antonarakis ES, Epstein JI, *et al* (2020) Neuroendocrine differentiation in usual-type prostatic adenocarcinoma: Molecular characterization and clinical significance. *Prostate* 80: 1012–1023
- Khan MT, Wagner L, Yule DI, Bhanumathy C & Joseph SK (2006) Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 281: 3731–3737
- Kho M, Smith JA, Verweij N, Shang L, Ryan KA, Zhao W, Ware EB, Gansevoort RT, Irvin MR, Lee JE, *et al* (2020) Genome-Wide Association Meta-Analysis of Individuals of European Ancestry Identifies Suggestive Loci for Sodium Intake, Potassium Intake, and Their Ratio Measured from 24-Hour or Half-Day Urine Samples. *J Nutr* 150: 2635–2645
- Kilpatrick BS, Eden ER, Schapira AH, Futter CE & Patel S (2013) Direct mobilisation of lysosomal Ca²⁺ triggers complex Ca²⁺ signals. *J Cell Sci* 126: 60–66
- Kim BJ, Chang IY, Choi S, Jun JY, Jeon JH, Xu WX, Kwon YK, Ren D & So I (2012) Involvement of Na⁺-leak channel in substance P-induced depolarization of pacemaking activity in interstitial cells of Cajal. *Cell Physiol Biochem* 29: 501–510
- King GF, Escoubas P & Nicholson GM (2008) Peptide toxins that selectively target insect Na^v and Ca^v channels. *Channels* 2: 100–116
- Klec C, Ziomek G, Pichler M, Malli R & Graier WF (2019) Calcium signaling in β -cell physiology and pathology: A revisit. *Int J Mol Sci* 20
- Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin A V, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH, *et al* (2016) Pancreatic cancer. *Nat Rev Dis Prim* 2: 16022
- Klimczak M (2015) Oncogenesis and induced pluripotency-Commonalities of signalling pathways. *Wspolczesna Onkol* 1A: A16–A21
- Knudsen ES, O'Reilly EM, Brody JR & Witkiewicz AK (2016) Genetic Diversity of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Opportunities for Precision Medicine. *Gastroenterology*

150: 48–63

- Kocarnik JM, Compton K, Dean FE, Fu W, Gaw BL, Harvey JD, Henrikson HJ, Lu D, Pennini A, Xu R, *et al* (2022) Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life Years for 29 Cancer Groups From 2010 to 2019 A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *JAMA Oncol* 8: 420–444
- Kocher HM, Basu B, Froeling FEM, Sarker D, Slater S, Carlin D, deSouza NM, De Paepe KN, Goulart MR, Hughes C, *et al* (2020) Phase I clinical trial repurposing all-trans retinoic acid as a stromal targeting agent for pancreatic cancer. *Nat Commun* 11: 4841
- Koltai T, Reshkin SJ, Carvalho TMA & Cardone RA (2021) Targeting the stromal pro-tumoral hyaluronan-cd44 pathway in pancreatic cancer. *Int J Mol Sci* 22
- Konieczny V, Keebler M V. & Taylor CW (2012) Spatial organization of intracellular Ca²⁺ signals. *Semin Cell Dev Biol* 23: 172–180
- Köroğlu Ç, Seven M & Tolun A (2013) Recessive truncating NALCN mutation in infantile neuroaxonal dystrophy with facial dysmorphism. *J Med Genet* 50: 515–520
- Kozlowski JM, Fidler IJ, Campbell D, Xu ZL, Kaighn ME & Hart IR (1984) Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res* 44: 3522–3529
- Krupp DR, Barnard RA, Duffourd Y, Evans SA, Mulqueen RM, Bernier R, Rivière J-B, Fombonne E & O’Roak BJ (2017) Exonic Mosaic Mutations Contribute Risk for Autism Spectrum Disorder. *Am J Hum Genet* 101: 369–390
- Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Fölsch UR & Schmidt WE (2000) TGFbeta1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul Pept* 90: 47–52
- Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW, Goodrich MM, Labbé DP, Gomez EC, Wang J, *et al* (2017) Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* 355: 78–83
- Lacroix M, Linares LK & Le Cam L (2013) Rôle du suppresseur de tumeurs p53 dans le contrôle du métabolisme. *Medecine/Sciences* 29: 1125–1130
- Laklai H, Miroshnikova YA, Pickup MW, Collisson EA, Kim GE, Barrett AS, Hill RC, Lakins JN, Schlaepfer DD, Mouw JK, *et al* (2016) Genotype tunes pancreatic ductal adenocarcinoma tissue tension to induce matricellular fibrosis and tumor progression. *Nat Med* 22: 497–505
- Lakpa KL, Halcrow PW, Chen X & Geiger JD (2020) Readily Releasable Stores of Calcium in Neuronal Endolysosomes: Physiological and Pathophysiological Relevance. In *Calcium Signalling* pp 681–697.
- Lambert AW, Pattabiraman DR & Weinberg RA (2017) Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 168: 670–691
- Lasorsa VA, Montella A, Cantalupo S, Tirelli M, de Torres C, Aveic S, Tonini GP, Iolascon A & Capasso M (2022) Somatic Mutations Enriched in Cis-Regulatory Elements Affect Genes Involved in Embryonic Development and Immune System Response in Neuroblastoma. *Cancer Res* 82: 1193–1207
- Lauritzen G, Stock CM, Lemaire J, Lund SF, Jensen MF, Damsgaard B, Petersen KS, Wiwel M, Rønnov-Jessen L, Schwab A, *et al* (2012) The Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, but not the Na⁺, HCO₃⁻ cotransporter NBCn1, regulates motility of MCF7 breast cancer cells expressing constitutively active ErbB2. *Cancer Lett* 317: 172–183
- Leanza L, Biasutto L, Managò A, Gulbins E, Zoratti M & Szabò I (2013) Intracellular ion channels and cancer. *Front Physiol* 4: 227

- Lear BC, Darrah EJ, Aldrich BT, Gebre S, Scott RL, Nash HA & Allada R (2013) UNC79 and UNC80, putative auxiliary subunits of the NARROW ABDOMEN ion channel, are indispensable for robust circadian locomotor rhythms in *Drosophila*. *PLoS One* 8: e78147
- Lee J, Cribbs LL & Perez-reyes E (1999a) Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *FEBS Lett* 445: 231–236
- Lee JH, Cribbs LL & Perez-Reyes E (1999b) Cloning of a novel four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels. *FEBS Lett* 445: 231–236
- Lee Y, Yoon K, Joo J, Lee D, Bae K, Han J & Lee S (2013) Prognostic implications of genetic variants in advanced non-small cell lung cancer : a genome-wide association study. *Carcinog Integr Cancer Res* 34: 307–313
- Leung L, Radulovich N, Zhu C-Q, Wang D, To C, Ibrahimov E & Tsao M-S (2013) Loss of canonical Smad4 signaling promotes KRAS driven malignant transformation of human pancreatic duct epithelial cells and metastasis. *PLoS One* 8: e84366
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SFT, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W, *et al* (2009) Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* 139: 891–906
- Li S, Balmain A & Counter CM (2018) A model for RAS mutation patterns in cancers: finding the sweet spot. *Nat Rev Cancer* 18: 767–777
- Li Z, Lu J, Xu P, Xie X, Chen L & Xu T (2007) Mapping the interacting domains of STIM1 and Orai1 in Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activation. *J Biol Chem* 282: 29448–29456
- Lin S, Lv Y, Xu J, Mao X, Chen Z & Lu W (2019) Over-expression of Nav1.6 channels is associated with lymph node metastases in colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 17: 1–10
- Lin X & Feng X-H (2005) Abrogation of transforming growth factor-beta signaling in pancreatic cancer. *World J Surg* 29: 312–316
- Lin Y, Yang Y, Li W, Chen Q, Li J, Pan X, Zhou L, Liu C, Chen C, He J, *et al* (2012) Reciprocal regulation of Akt and Oct4 promotes the self-renewal and survival of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell* 48: 627–640
- Liou J, Kim ML, Heo W Do, Jones JT, Myers JW, Ferrell JEJ & Meyer T (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol* 15: 1235–1241
- Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A & Penner R (2007) CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Curr Biol* 17: 794–800
- Liu T & O'Rourke B (2013) Regulation of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger by pyridine nucleotide redox potential in ventricular myocytes. *J Biol Chem* 288: 31984–31992
- Lu B, Su Y, Das S, Liu J, Xia J & Ren D (2007) The Neuronal Channel NALCN Contributes Resting Sodium Permeability and Is Required for Normal Respiratory Rhythm. *Cell* 129: 371–383
- Lu B, Su Y, Das S, Wang H, Wang Y, Liu J & Ren D (2009) Peptide neurotransmitters activate a cation channel complex of NALCN and UNC-80. *Nat Rev Cancer* 457: 741–744
- Lu B, Zhang Q, Wang H, Wang Y, Nakayama M & Ren D (2010) Extracellular Calcium Controls Background Current and Neuronal Excitability via an UNC79-UNC80-NALCN Cation Channel Complex. *Neuron* 68: 488–499
- Lu P, Takai K, Weaver VM & Werb Z (2011) Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Lu P, Weaver VM & Werb Z (2012) The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer

- progression. *J Cell Biol* 196: 395–406
- Lu TZ & Feng Z-P (2011) A sodium leak current regulates pacemaker activity of adult central pattern generator neurons in *Lymnaea stagnalis*. *PLoS One* 6: e18745
- Luik RM, Wang B, Prakriya M, Wu MM & Lewis RS (2008) Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation. *Nature* 454: 538–542
- Luo AJ, Tan J, He LY, Jiang XZ, Jiang ZQ, Zeng Q, Yao K & Xue J (2019) Suppression of Tescalcin inhibits growth and metastasis in renal cell carcinoma via downregulating NHE1 and NF- κ B signaling. *Exp Mol Pathol* 107: 110–117
- Mahlbacher V, Sewing A, Elsässer HP & Kern HF (1992) Hyaluronan is a secretory product of human pancreatic adenocarcinoma cells. *Eur J Cell Biol* 58: 28–34
- Makohon-Moore A & Iacobuzio-Donahue CA (2016) Pancreatic cancer biology and genetics from an evolutionary perspective. *Nat Rev Cancer* 16: 553–565
- Malik R, Lelkes PI & Cukierman E (2015) Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol* 33: 230–236
- Mandal K, Wang I, Vitiello E, Orellana LAC & Balland M (2014) Cell dipole behaviour revealed by ECM sub-cellular geometry. *Nat Commun* 5
- Manoukian P, Bijlsma M & van Laarhoven H (2021) The Cellular Origins of Cancer-Associated Fibroblasts and Their Opposing Contributions to Pancreatic Cancer Growth. *Front Cell Dev Biol* 9: 1–19
- Marchi S, Marinello M, Bononi A, Bonora M, Giorgi C, Rimessi A & Pinton P (2012) Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca²⁺ release and apoptosis. *Cell Death Dis* 3: 1–10
- Marusyk A, Almendro V & Polyak K (2012) Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer* 12: 323–334
- Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Kume K & Shimosegawa T (2003) Differential roles of signaling pathways for proliferation and migration of rat pancreatic stellate cells. *Tohoku J Exp Med* 199: 69–84
- Massagué J (2008) TGF β in Cancer. *Cell* 134: 215–230
- McNally BA, Yamashita M, Engh A & Prakriya M (2009) Structural determinants of ion permeation in CRAC channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22516–22521
- Mecham RP (2001) Overview of extracellular matrix. *Curr Protoc cell Biol* Chapter 10: Unit 10.1
- Melica ME, La Regina G, Parri M, Peired AJ, Romagnani P & Lasagni L (2019) Substrate Stiffness Modulates Renal Progenitor Cell Properties via a ROCK-Mediated Mechanotransduction Mechanism. *Cells* 8
- Menon S & Beningo KA (2011) Cancer cell invasion is enhanced by applied mechanical stimulation. *PLoS One* 6: e17277
- Mercer JC, Dehaven WI, Smyth JT, Wedel B, Boyles RR, Bird GS & Putney JWJ (2006) Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem* 281: 24979–24990
- Metz EP, Wilder PJ, Dong J, Datta K & Rizzino A (2020) Elevating SOX2 in prostate tumor cells upregulates expression of neuroendocrine genes, but does not reduce the inhibitory effects of enzalutamide. *J Cell Physiol* 235: 3731–3740
- Missirotli S, Danese A, Iannitti T, Patergnani S, Perrone M, Previati M, Giorgi C & Pinton P (2017) Endoplasmic reticulum-mitochondria Ca²⁺ crosstalk in the control of the tumor cell fate. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1864: 858–864
- Monteith GR, Prevarskaya N & Roberts-Thomson SJ (2017) The calcium-cancer signalling

- nexus. *Nat Rev Cancer* 17: 367–380
- Moose DL, Haase SJ, Aldrich BT & Lear BC (2017) The Narrow Abdomen Ion Channel Complex Is Highly Stable and Persists from Development into Adult Stages to Promote Behavioral Rhythmicity. *Front Cell Neurosci* 11: 159
- Mouw JK, Ou G & Weaver VM (2014) Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 771–785
- Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P, Schindl R, Hesch C, Polzinger B, Fritsch R, *et al* (2008) Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORA11 with STIM1 mediates ORA11 channel activation. *J Biol Chem* 283: 8014–8022
- Munaron L (2015) Systems biology of ion channels and transporters in tumor angiogenesis: An omics view. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1848: 2647–2656
- Munaron L, Antoniotti S & Lovisolo D (2004) Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J Cell Mol Med* 8: 161–168
- Murphy DA & Courtneidge SA (2011) The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 413–426
- Nagelkerke A, Bussink J, Rowan AE & Span PN (2015) tumours. *Semin Cancer Biol* 35: 62–70
- Najafi M, Farhood B & Mortezaee K (2019) Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers. *J Cell Biochem* 120: 2782–2790
- Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D & Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11382–11388
- Nash HA, Scott RL, Lear BC & Allada R (2002) An Unusual Cation Channel Mediates Photoc Control of Locomotion in *Drosophila*. *Curr Biol* 12: 2152–2158
- Navas C, Hernández-Porras I, Schuhmacher AJ, Sibilia M, Guerra C & Barbacid M (2012) EGF receptor signaling is essential for k-ras oncogene-driven pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 22: 318–330
- Nelson M, Yang M, Millican-Slater R & Brackenbury WJ (2015) Nav1.5 regulates breast tumor growth and metastatic dissemination in vivo. *Oncotarget* 6
- Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, Ragulan C, Cros J, Patil Y, Martinet M, Erkan M, Kleeff J, Wilson J, Apte M, *et al* (2019) Inter- and intra-tumoural heterogeneity in cancer-associated fibroblasts of human pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Pathol* 248: 51–65
- Noble M, Lin Q, Sirko C, Haupt JA, Novello MJ & Stathopoulos PB (2020) Structural Mechanisms of Store-Operated and Mitochondrial Calcium Regulation: Initiation Points for Drug Discovery. *Int J Mol Sci* 21: 3642
- Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, Fernández-Zapico ME & Hanahan D (2009) GLI1 is regulated through Smoothed-muscle-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev* 23: 24–36
- Northey JJ, Barrett AS, Acerbi I, Hayward M-K, Talamantes S, Dean IS, Mouw JK, Ponik SM, Lakins JN, Huang P-J, *et al* (2020) Stiff stroma increases breast cancer risk by inducing the oncogene ZNF217. *J Clin Invest* 130: 5721–5737
- Norton J, Foster D, Chinta M, Titan A & Longaker M (2020) Pancreatic cancer associated fibroblasts (CAF): Under-explored target for pancreatic cancer treatment. *Cancers (Basel)* 12: 1–18
- Oettle H (2014) Progress in the knowledge and treatment of advanced pancreatic cancer: From benchside to bedside. *Cancer Treat Rev* 40: 1039–1047

- Öhlund D, Handly-Santana A, Biffi G, Elyada E, Almeida AS, Ponz-Sarvisé M, Corbo V, Oni TE, Hearn SA, Lee EJ, *et al* (2017) Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J Exp Med* 214: 579–596
- Olawaiye AB, Baker TP, Washington MK & Mutch DG (2021) The new (Version 9) American Joint Committee on Cancer tumor, node, metastasis staging for cervical cancer. *CA Cancer J Clin* 71: 287–298
- Ope O, Bhoj EJ, Nelson B, Li D, Hakonarson H & Sobering AK (2020) A homozygous truncating NALCN variant in two Afro-Caribbean siblings with hypotonia and dolichocephaly. *Am J Med Genet A* 182: 1877–1880 doi:10.1002/ajmg.a.61744 [PREPRINT]
- Oshima M, Okano K, Muraki S, Haba R, Maeba T, Suzuki Y & Yachida S (2013) Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg* 258: 336–346
- Ouwerkerk R, Bleich KB, Gillen JS, Pomper MG & Bottomley P a (2003) Tissue sodium concentration in human brain tumors as measured with ²³Na MR imaging. *Radiology* 227: 529–537
- Ouwerkerk R, Jacobs MA, Macura KJ, Wolff AC, Stearns V, Mezban SD, Khouri NF, Bluemke DA & Bottomley PA (2007) Elevated tissue sodium concentration in malignant breast lesions detected with non-invasive ²³Na MRI. *Breast Cancer Res Treat* 106: 151–160
- Özdemir BC, Pentcheva-Hoang T, Carstens JL, Zheng X, Wu C-C, Simpson TR, Laklai H, Sugimoto H, Kahlert C, Novitskiy SV, *et al* (2014) Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* 25: 719–734
- Padua D & Massagué J (2009) Roles of TGFβ in metastasis. *Cell Res* 19: 89–102
- Pandol S, Gukovskaya A, Edderkoui M, Dawson D, Eibl G & Lugea A (2012) Epidemiology, risk factors, and the promotion of pancreatic cancer: Role of the stellate cell. *J Gastroenterol Hepatol* 27: 127–134
- Parekh A, Ruppender NS, Branch KM, Sewell-Loftin MK, Lin J, Boyer PD, Candiello JE, Merryman WD, Guelcher SA & Weaver AM (2011) Sensing and modulation of invadopodia across a wide range of rigidities. *Biophys J* 100: 573–582
- Parisotto M, Grelet E, Bizri R El, Dai Y, Terzic J, Eckert D, Gargowitsch L, Bornert JM & Metzger D (2018) PTEN deletion in luminal cells of mature prostate induces replication stress and senescence in vivo. *J Exp Med* 215: 1749–1763
- Park H, Bang J-H, Nam A-R, Park JE, Jin MH, Bang Y-J & Oh D-Y (2020) The prognostic role of soluble TGF-β and its dynamics in unresectable pancreatic cancer treated with chemotherapy. *Cancer Med* 9: 43–51
- Park HS, Shin HJ, Shin KC, Cha JH, Chae EY, Choi WJ & Kim HH (2018) Comparison of peritumoral stromal tissue stiffness obtained by shear wave elastography between benign and malignant breast lesions. *Acta Radiol* 59: 1168–1175
- Parkash J & Asotra K (2010) Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci* 87: 587–595
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J & Pisani P (2005) Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108
- Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, Reinhart-King CA, Margulies SS, Dembo M, Boettiger D, *et al* (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8: 241–254
- Patel F & Brackenbury WJ (2015) Dual roles of voltage-gated sodium channels in development and cancer. *Int J Dev Biol* 59: 357–366

- Pei D, Shu X, Gassama-Diagne A & Thiery JP (2019) Mesenchymal–epithelial transition in development and reprogramming. *Nat Cell Biol* 21: 44–53
- Peng Y, Chen Z, Chen Y, Li S, Jiang Y, Yang H, Wu C, You F, Zheng C, Zhu J, *et al* (2019) ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta Biomater* 88: 86–101
- Pereira BA, Vennin C, Papanicolaou M, Chambers CR, Herrmann D, Morton JP, Cox TR & Timpson P (2019) CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal Targets in Pancreatic Cancer. *Trends in cancer* 5: 724–741
- Perez C, Ziburkus J & Ullah G (2016) Analyzing and Modeling the Dysfunction of Inhibitory Neurons in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 11: e0168800
- Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT & Salzberg SL (2016) Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 11: 1650–1667
- Piao J, You K, Guo Y, Zhang Y, Li Z & Geng L (2017) Substrate stiffness affects epithelial-mesenchymal transition of cervical cancer cells through miR-106b and its target protein DAB2. *Int J Oncol* 50: 2033–2042
- Pierce-Shimomura JT, Chen BL, Mun JJ, Ho R, Sarkis R & McIntire SL (2008) Genetic analysis of crawling and swimming locomotory patterns in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 20982–20987
- Piersma B, Hayward M-K & Weaver VM (2020) Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochim Biophys Acta Rev cancer* 1873: 188356
- Poku LO, Phil M, Cheng Y, Wang K & Sun X (2020) ²³Na-MRI as a Noninvasive Biomarker for Cancer Diagnosis and Prognosis. *J Magn Reson Imaging*
- Prakriya M & Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev* 95: 1383–1436
- Prauzner-Bechcicki S, Raczowska J, Madej E, Pabijan J, Lukes J, Sepitka J, Rysz J, Awsiuk K, Bernasik A, Budkowski A, *et al* (2015) PDMS substrate stiffness affects the morphology and growth profiles of cancerous prostate and melanoma cells. *J Mech Behav Biomed Mater* 41: 13–22
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: New roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 11: 609–618
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y (2018a) Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol Rev* 98: 559–621
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y (2018b) ION CHANNELS IN CANCER : ARE CANCER HALLMARKS ONCOCHANNELOPATHIES ? *Physiol Rev* 98: 559–621
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y (2018c) Ion channels in cancer: Are cancer hallmarks oncochannelopathies? *Physiol Rev* 98: 559–621
- Prokopenko D, Morgan SL, Mullin K, Hofmann O, Chapman B, Kirchner R, Amberkar S, Wohlers I, Lange C, Hide W, *et al* (2020) Whole-genome sequencing reveals new Alzheimer's disease-associated rare variants in loci related to synaptic function and neuronal development. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci* doi:10.1101/2020.11.03.20225540 [PREPRINT]
- Prokopenko D, Morgan SL, Mullin K, Hofmann O, Chapman B, Kirchner R, Amberkar S, Wohlers I, Lange C, Hide W, *et al* (2021) Whole-genome sequencing reveals new Alzheimer's disease-associated rare variants in loci related to synaptic function and neuronal development. *Alzheimers Dement* 17: 1509–1527
- Provenzano PP, Eliceiri KW, Campbell JM, Inman DR, White JG & Keely PJ (2006) Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med* 4: 38

- Qian Y, Gong Y, Fan Z, Luo G, Huang Q, Deng S, Cheng H, Jin K, Ni Q, Yu X, *et al* (2020) Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Hematol Oncol* 13: 1–20
- Qian ZR, Rubinson DA, Nowak JA, Morales-Oyarvide V, Dunne RF, Kozak MM, Welch MW, Brais LK, Da Silva A, Li T, *et al* (2018) Association of Alterations in Main Driver Genes With Outcomes of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol* 4: e173420
- Qin F, Siwik DA, Pimentel DR, Morgan RJ, Biolo A, Tu VH, James Kang Y, Cohen RA & Colucci WS (2014) Cytosolic H₂O₂ mediates hypertrophy, apoptosis, and decreased SERCA activity in mice with chronic hemodynamic overload. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 306: 1453–1463
- Quétier I, Marshall JJT, Spencer-Dene B, Lachmann S, Casamassima A, Franco C, Escuin S, Worrall JT, Baskaran P, Rajeeve V, *et al* (2016) Knockout of the PKN Family of Rho Effector Kinases Reveals a Non-redundant Role for PKN2 in Developmental Mesoderm Expansion. *Cell Rep* 14: 440–448
- Radoslavova S, Fels B, Pethö Z, Gruner M, Ruck T, Meuth SG, Folcher A, Prevarskaya N, Schwab A & Ouadid-Ahidouch H (2022) TRPC1 channels regulate the activation of pancreatic stellate cells through ERK1/2 and SMAD2 pathways and perpetuate their pressure-mediated activation. *Cell Calcium* 106: 102621
- Radoslavova S, Folcher A, Lefebvre T, Kondratska K, Guénin S, Dhennin-Duthille I, Gautier M, Prevarskaya N & Ouadid-Ahidouch H (2021) Orai1 Channel Regulates Human-Activated Pancreatic Stellate Cell Proliferation and TGF(β₁) Secretion through the AKT Signaling Pathway. *Cancers (Basel)* 13
- Rahrman EP, Shorthouse D, Jassim A, Hu LP, Ortiz M, Mahler-Araujo B, Vogel P, Paez-Ribes M, Fatemi A, Hannon GJ, *et al* (2022) The NALCN channel regulates metastasis and nonmalignant cell dissemination. *Nat Genet*
- Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P & Pezzilli R (2010) Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 24: 349–358
- Rajkomar K & Jamieson NB (2022) Pancreatic cancer. *Surg* 40: 237–248
- Raphaël M, Lehen V, Vandenberghe M, Beck B & Khalimonchik S (2014) TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 3870–3879
- Rash BG, Ackman JB & Rakic P (2016) Bidirectional radial Ca²⁺ activity regulates neurogenesis and migration during early cortical column formation. *Sci Adv* 2: e1501733
- Rass E, Grabarz A, Bertrand P & Lopez B-S (2012) Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* 16: 1–10
- Ren D (2011a) Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors. *Neuron* 72: 899–911
- Ren D (2011b) Sodium leak channels in neuronal excitability and rhythmic behaviors. *Neuron* 72: 899–911
- Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, Dekleva EN, Saunders T, Becerra CP, Tattersall IW, *et al* (2014) Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* 25: 735–747
- Ricard-Blum S & Ruggiero F (2005) The collagen superfamily: from the extracellular matrix to

- the cell membrane. *Pathol Biol (Paris)* 53: 430–442
- Riggins GJ, Kinzler KW, Vogelstein B & Thiagalingam S (1997) Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res* 57: 2578–2580
- Rijlaarsdam MA, van Herk HADM, Gillis AJM, Stoop H, Jenster G, Martens J, van Leenders GJLH, Dinjens W, Hoogland AM, Timmermans M, *et al* (2012) Erratum: Specific detection of OCT3/4 isoform A/B/B1 expression in solid (germ cell) tumours and cell lines: confirmation of OCT3/4 specificity for germ cell tumours. *Br J Cancer* 106: 791
- Rizaner N, Onkal R, Fraser SP, Pristerá A, Okuse K & Djamgoz MBA (2016) Intracellular calcium oscillations in strongly metastatic human breast and prostate cancer cells: control by voltage-gated sodium channel activity. *Eur Biophys J* 45: 735–748
- Roderick HL & Cook SJ (2008) Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: Remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 8: 361–375
- Roger S, Besson P & Le Guennec J-Y (2003) Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line. *Biochim Biophys Acta* 1616: 107–111
- Roger S, Gillet L, Le Guennec JY & Besson P (2015) Voltage-gated sodium channels and cancer: Is excitability their primary role? *Front Pharmacol* 6: 1–22
- Roger S, Rollin J, Barascu A, Besson P, Raynal P-I, Iochmann S, Lei M, Bougnoux P, Gruel Y & Le Guennec J-Y (2007) Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 774–786
- Rösel D, Brabek J, Veselý P & Fernandes M (2013) Drugs for solid cancer the productivity crisis prompts a rethink. *Onco Targets Ther*: 767
- Rozario T & DeSimone DW (2010) The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 341: 126–140
- Sallán MC, Visa A, Shaikh S, Nàger M, Herreros J & Cantí C (2018) T-type Ca²⁺ Channels: T for Targetable. *Cancer Res* 78: 603–609
- Sallinger M, Berlansky S & Frischauf I (2020) Orai channels: key players in Ca²⁺ homeostasis. *Curr Opin Physiol* 17: 42–49
- Samandari M, Julia MG, Rice A, Chronopoulos A & del Rio Hernandez AE (2018) Liquid biopsies for management of pancreatic cancer. *Transl Res* 201: 98–127
- Sanchez-Collado J, Jardin I, López JJ, Ronco V, Salido GM, Dubois C, Prevarskaya N & Rosado JA (2021) Role of Orai3 in the Pathophysiology of Cancer. *Int J Mol Sci* 22
- Sanjabi S, Oh SA & Li MO (2017) Regulation of the Immune Response by TGF- β : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 9
- SanMartín CD, Böhme D & Rojas-Rivera D (2020) Calcium & ROS: Two orchestra directors for the requiem of death. *Cell Calcium* 85: 2019–2020
- Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, Benten D, Forbes SJ, Wells RG & Iredale JP (2011) Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53: 1192–1205
- Schutte M, Hruban RH, Hedrick L, Cho KR, Nadasdy GM, Weinstein CL, Bova GS, Isaacs WB, Cairns P, Nawroz H, *et al* (1996) DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res* 56: 2527–2530
- Schwarte-Waldhoff I, Volpert O V, Bouck NP, Sipos B, Hahn SA, Klein-Scory S, Lüttges J, Klöppel G, Graeven U, Eilert-Micus C, *et al* (2000) Smad4/DPC4-mediated tumor suppression through suppression of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9624–

9629

- Schwartz MA (2010) Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a005066
- Schwarzbauer JE & DeSimone DW (2011) Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Senatore A, Monteil A, van Minnen J, Smit AB & Spafford JD (2013) NALCN Ion Channels Have Alternative Selectivity Filters Resembling Calcium Channels or Sodium Channels. *PLoS One* 8: e55088
- Senatore A & Spafford JD (2013) A uniquely adaptable pore is consistent with NALCN being an ion sensor. *Channels* 7: 60–68
- Shah K, Patel S, Mirza S & Rawal RM (2018) Unravelling the link between embryogenesis and cancer metastasis. *Gene* 642: 447–452
- Sherman MH, Yu RT, Engle DD, Ding N, Atkins AR, Tiriach H, Collisson EA, Connor F, Van Dyke T, Kozlov S, *et al* (2014) Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Cell* 159: 80–93
- Shi Y, Abe C, Holloway BB, Shu XS, Kumar NN, Weaver XJL, Sen J, Perez-reyes E, Stornetta XRL, Guyenet XPG, *et al* (2016) Nalcn Is a “ Leak ” Sodium Channel That Regulates Excitability of Brainstem Chemosensory Neurons and Breathing. *J Neurosci* 36: 8174–8187
- Shi Y, Hata A, Lo RS, Massagué J & Pavletich NP (1997) A structural basis for mutational inactivation of the tumour suppressor Smad4. *Nature* 388: 87–93
- Shukla VC, Higuera-Castro N, Nana-Sinkam P & Ghadiali SN (2016) Substrate stiffness modulates lung cancer cell migration but not epithelial to mesenchymal transition. *J Biomed Mater Res A* 104: 1182–1193
- Sidaway P (2017) Pancreatic Cancer: EGFR inhibition is effective against KRAS-wild-type disease. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 524–525
- Simon Davis DA & Parish CR (2013) Heparan sulfate: a ubiquitous glycosaminoglycan with multiple roles in immunity. *Front Immunol* 4: 470
- Singh P, Carraher C & Schwarzbauer JE (2010) Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26: 397–419
- Sinke AP & Deen PMT (2011) The physiological implication of novel proteins in systemic osmoregulation. *FASEB J* 25: 3279–3289
- Snutch TP & Monteil A (2007) The Sodium ‘Leak’ Has Finally Been Plugged. *Neuron* 54: 505–507
- Sobierajska K, Ciszewski WM, Sacewicz-Hofman I & Niewiarowska J (2020) Endothelial Cells in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1234: 71–86
- Soboloff J, Spassova MA, Hewavitharana T, He L-P, Xu W, Johnstone LS, Dziadek MA & Gill DL (2006) STIM2 Is an Inhibitor of STIM1-Mediated Store-Operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol* 16: 1465–1470
- Spassova MA, Soboloff J, He L-P, Xu W, Dziadek MA & Gill DL (2006) STIM1 has a plasma membrane role in the activation of store-operated Ca(2+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 4040–4045
- Specia DJ, Chihara D, Ashique AM, Bowers MS, Pierce-Shimomura JT, Lee J, Rabbee N, Speed TP, Gularte RJ, Chitwood J, *et al* (2010) Conserved role of unc-79 in ethanol responses in lightweight mutant mice. *PLoS Genet* 6
- Spugnini EP, Sonveaux P, Stock C, Perez-Sayans M, De Milito A, Avnet S, Garcia AG, Harguindey S & Fais S (2015) Proton channels and exchangers in cancer. *Biochim*

- Biophys Acta - Biomembr* 1848: 2715–2726
- Steffan JJ, Snider JL, Skalli O, Welbourne T & Cardelli JA (2009) Na⁺/H⁺ exchangers and RhoA regulate acidic extracellular pH-induced lysosome trafficking in prostate cancer cells. *Traffic* 10: 737–753
- Steiner JF, Cavender TA, Main DS & Bradley CJ (2004) Assessing the impact of cancer on work outcomes: What are the research needs? *Cancer* 101: 1703–1711
- Stephens RF, Guan W, Zhorov BS & Spafford JD (2015) Selectivity filters and cysteine-rich extracellular loops in voltage-gated sodium, calcium, and NALCN channels. *Front Physiol* 6: 1–19
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH & Paulson DF (1978) Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21: 274–281
- Su Y, Chen Y, Tseng Y, Shieh G, Wu P, Shiau A & Wu C (2021) The Pro-Survival Oct4/Stat1/Mcl-1 Axis Is Associated with Poor Prognosis in Lung Adenocarcinoma Patients. *Cells* 10: 2642
- Subramanian G, Schwarz RE, Higgins L, McEnroe G, Chakravarty S, Dugar S & Reiss M (2004) Targeting endogenous transforming growth factor beta receptor signaling in SMAD4-deficient human pancreatic carcinoma cells inhibits their invasive phenotype¹. *Cancer Res* 64: 5200–5211
- Sun J, Lu F, He H, Shen J, Messina J, Mathew R, Wang D, Sarnaik AA, Chang W, Kim M, *et al* (2014) STIM1- and Orai1-mediated Ca²⁺ oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *J Cell Biol* 207: 535–548
- Sun M, Chi G, Li P, Lv S, Xu J, Xu Z, Xia Y, Tan Y, Xu J, Li L, *et al* (2018) Effects of Matrix Stiffness on the Morphology, Adhesion, Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int J Med Sci* 15: 257–268
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A & Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 71: 209–249
- Suy S, Hansen TP, Auto HD, Kallakury BV., Dailey V, Danner M, MacArthur L, Zhang Y, Miessau MJ, Collins SP, *et al* (2012) Expression of Voltage-Gated Sodium Channel Nav 1.8 in Human Prostate Cancer is Associated with High Histological Grade. *J Clin Exp Oncol* 1
- Swayne LA, Mezghrani A, Varrault A, Chemin J, Bertrand G, Dalle S, Bourinet E, Lory P, Miller RJ & Nargeot J (2009a) The NALCN ion channel is activated by M3 muscarinic receptors in a pancreatic b-cell line. *EMBO Rep* 10: 873–880
- Swayne LA, Mezghrani A, Varrault A, Chemin J, Bertrand G, Dalle S, Bourinet E, Lory P, Miller RJ, Nargeot J, *et al* (2009b) The NALCN ion channel is activated by M3 muscarinic receptors in a pancreatic β-cell line. *EMBO Rep* 10: 873–880
- Szabo T, Vanderheyden V, Parys JB, Smedt H De, Rietdorf K & Kotelevets L (2008) receptors by protein kinase B / Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Pnas* 105: 2427–2432
- Tang D, Wang D, Yuan Z, Xue X, Zhang Y, An Y, Chen J, Tu M, Lu Z, Wei J, *et al* (2013) Persistent activation of pancreatic stellate cells creates a microenvironment favorable for the malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 132: 993–1003
- Tang Z, Ma H, Mao Y, Ai S, Zhang P, Nie C, Gao Y & Lu R (2019) Identification of stemness in primary retinoblastoma cells by analysis of stem-cell phenotypes and tumorigenicity with culture and xenograft models. *Exp Cell Res* 379: 110–118
- Taylor J, Azimi I, Monteith G & Bebawy M (2020) Ca²⁺ mediates extracellular vesicle

- biogenesis through alternate pathways in malignancy. *J Extracell Vesicles* 9
- Teraoka H, Sawada T, Yamashita Y, Nakata B, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H & Hirakawa K (2001) TGF-beta1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cellular invasion. *Int J Oncol* 19: 709–715
- Thiery JP (2002) Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2: 442–454
- Thomas D & Radhakrishnan P (2020) Pancreatic Stellate Cells: The Key Orchestrator of The Pancreatic Tumor Microenvironment. In *Tumor Microenvironment: Non-Hematopoietic Cells*, Birbrair A (ed) pp 57–70. Cham: Springer International Publishing
- Tiwari R, Manzar N, Bhatia V, Yadav A, Nengroo MA, Datta D, Carskadon S, Gupta N, Sigouros M, Khani F, *et al* (2020) Androgen deprivation upregulates SPINK1 expression and potentiates cellular plasticity in prostate cancer. *Nat Commun* 11: 384
- Toole BP (2009) Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 15: 7462–7468
- Trampert DC & Nathanson MH (2018) Regulation of bile secretion by calcium signaling in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1865: 1761–1770
- Truffi M, Sorrentino L & Corsi F (2020) Fibroblasts in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1234: 15–29
- Truty MJ & Urrutia R (2007) Basics of TGF-beta and pancreatic cancer. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol . [et al]* 7: 423–435
- Tsai L-L, Yu C-C, Chang Y-C, Yu C-H & Chou M-Y (2011) Markedly increased Oct4 and Nanog expression correlates with cisplatin resistance in oral squamous cell carcinoma. *J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol* 40: 621–628
- Tse JR & Engler AJ (2010) Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Curr Protoc cell Biol* Chapter 10: Unit 10.16
- Tseng Q, Wang I, Duchemin-Pelletier E, Azioune A, Carpi N, Gao J, Filhol O, Piel M, Théry M & Balland M (2011) A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab Chip* 11: 2231–2240
- Vaish U, Jain T, Are AC & Dudeja V (2021) Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Update on Heterogeneity and Therapeutic Targeting. *Int J Mol Sci* 22
- Vellino S, Oddou C, Rivier P, Boyault C, Hiriart-Bryant E, Kraut A, Martin R, Coute Y, Knölker HJ, Valverde MA, *et al* (2021) Cross-talk between the calcium channel TRPV4 and reactive oxygen species interlocks adhesive and degradative functions of invadosomes. *J Cell Biol* 220
- Vennin C, Murphy KJ, Morton JP, Cox TR, Pajic M & Timpson P (2018) Reshaping the Tumor Stroma for Treatment of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* 154: 820–838
- Verkhratsky A, Khananshvili D, Trebak M, Sekler I & Perocchi F (2018a) Crosslink between calcium and sodium signalling. *Exp Physiol* 103: 157–169
- Verkhratsky A, Trebak M, Perocchi F, Khananshvili D & Sekler I (2018b) Crosslink between calcium and sodium signalling. *Exp Physiol* 103: 157–169
- Verseemann L, Patil S, Steuber B, Zhang Z, Kopp W, Krawczyk HE, Kaulfuß S, Wollnik B, Ströbel P, Neesse A, *et al* (2022) TP53-Status-Dependent Oncogenic EZH2 Activity in Pancreatic Cancer. *Cancers (Basel)* 14: 3451
- Villalobo A & Berchtold MW (2020) The role of calmodulin in tumor cell migration, invasiveness, and metastasis. *Int J Mol Sci* 21

- Visvader JE & Lindeman GJ (2008) Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8: 755–768
- Vogelstein B, Lane D & Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307–310 doi:10.1038/35042675 [PREPRINT]
- Waddell N, Pajic M, Patch A-M, Chang DK, Kassahn KS, Bailey P, Johns AL, Miller D, Nones K, Quek K, *et al* (2015) Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 518: 495–501
- Wagner M, Kleeff J, Friess H, Büchler MW & Korc M (1999) Enhanced expression of the type II transforming growth factor-beta receptor is associated with decreased survival in human pancreatic cancer. *Pancreas* 19: 370–376
- Wagner M, Kleeff J, Lopez ME, Bockman I, Massaqué J & Korc M (1998) Transfection of the type I TGF-beta receptor restores TGF-beta responsiveness in pancreatic cancer. *Int J cancer* 78: 255–260
- Wang H & Ren D (2009a) UNC80 functions as a scaffold for Src kinases in NALCN channel function. *Channels* 3: 161–163
- Wang H & Ren D (2009b) UNC80 functions as a scaffold for Src kinases in NALCN channel function. *Channels* 3: 78–81
- Wang J, Ou S-W & Wang Y-J (2017) Distribution and function of voltage-gated sodium channels in the nervous system. *Channels (Austin)* 11: 534–554
- Wang J, Zhang C, He W & Gou X (2018) Construction and comprehensive analysis of dysregulated long non-coding RNA-associated competing endogenous RNA network in clear cell renal cell carcinoma. *J Cell Biochem*
- Wang K-S, Liu X-F & Aragam N (2010a) A genome-wide meta-analysis identifies novel loci associated with schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Res* 124: 192–199
- Wang Y, Deng X & Gill DL (2010b) Calcium signaling by STIM and Orai: intimate coupling details revealed. *Sci Signal* 3: pe42
- Watson AW, Grant AD, Parker SS, Hill S, Whalen MB, Chakrabarti J, Harman MW, Roman MR, Forte BL, Gowan CC, *et al* (2021) Breast tumor stiffness instructs bone metastasis via maintenance of mechanical conditioning. *Cell Rep* 35: 109293
- Wei B, Zhou X, Liang C, Zheng X, Lei P, Fang J, Han X, Wang L, Qi C & Wei H (2017) Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening. *Int J Biol Sci* 13: 1450–1457
- Whatcott CJ, Diep CH, Jiang P, Watanabe A, LoBello J, Sima C, Hostetter G, Shepard HM, Von Hoff DD & Han H (2015) Desmoplasia in Primary Tumors and Metastatic Lesions of Pancreatic Cancer. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 21: 3561–3568
- Wong KK, Banham AH, Yaacob NS & Nur Husna SM (2019) The oncogenic roles of TRPM ion channels in cancer. *J Cell Physiol* 234: 14556–14573
- Wu H, Hsieh J, Gleave M, Brown N, Pathak S & Chung W (1994) Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: Role of bone stromal cells. *Int J Cancer* 57: 406–412
- Xia J, Huang N, Huang H, Sun L, Dong S, Su J, Zhang J, Wang L, Lin L, Shi M, *et al* (2016) Voltage-gated sodium channel Na v 1.7 promotes gastric cancer progression through MACC1-mediated upregulation of NHE1. *Int J Cancer* 139: 2553–2569
- Xie L, Gao S, Alcaire SM, Aoyagi K, Wang Y, Griffin JK, Stagljar I, Nagamatsu S & Zhen M (2013) NLF-1 Delivers a Sodium Leak Channel to Regulate Neuronal Excitability and Modulate Rhythmic Locomotion. *Neuron* 77: 1069–1082
- Xu N, Wu Y-P, Yin H-B, Xue X-Y & Gou X (2018) Molecular network-based identification of

- competing endogenous RNAs and mRNA signatures that predict survival in prostate cancer. *J Transl Med* 16: 274
- Yanagishita M (1993) Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 43: 283–293
- Yang N, Chen T, Wang L, Liu R, Niu Y, Sun L, Yao B, Wang Y, Yang W, Liu Q, *et al* (2020) CXCR4 mediates matrix stiffness-induced downregulation of UBTD1 driving hepatocellular carcinoma progression via YAP signaling pathway. *Theranostics* 10: 5790–5801
- Yang N, Tang Y, Wang F, Zhang H, Xu D, Shen Y, Sun S & Yang G (2013) Blockade of store-operated Ca²⁺ entry inhibits hepatocarcinoma cell migration and invasion by regulating focal adhesion turnover. *Cancer Lett* 330: 163–169
- Yeh E, Ng S, Zhang M, Bouhours M, Wang Y, Wang M, Hung W, Aoyagi K, Melnik-Martinez K, Li M, *et al* (2008) A putative cation channel, NCA-1, and a novel protein, UNC-80, transmit neuronal activity in *C. elegans*. *PLoS Biol* 6: 0552–0567
- Yu J-L & Liao H-Y (2021) Piezo-type mechanosensitive ion channel component 1 (Piezo1) in human cancer. *Biomed Pharmacother* 140: 111692
- Zanconato F, Cordenonsi M & Piccolo S (2019) YAP and TAZ: a signalling hub of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 19: 454–464
- Zaric O, Pinker K, Zbyn S, Strasser B, Robinson S, Minarikova L, Gruber S, Farr A, Singer C, Helbich TH, *et al* (2016) Quantitative Sodium MR Imaging at 7 T: Initial Results and Comparison with Diffusion-weighted Imaging in Patients with Breast Tumors. *Radiology* 280: 39–48
- Zbinden M, Duquet A, Lorente-Trigos A, Ngwabyt S-N, Borges I & Ruiz i Altaba A (2010) NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J* 29: 2659–2674
- Zhan H, Jiang J, Sun Q, Ke A, Hu J, Hu Z, Zhu K, Luo C, Ren N, Fan J, *et al* (2017) Whole-Exome Sequencing-Based Mutational Profiling of Hepatitis B Virus-Related Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Res Pract* 2017: 2029315
- Zhang D, Zhao J, Han C, Liu X, Liu J & Yang H (2020a) Identification of hub genes related to prognosis in glioma. *Biosci Rep* 40
- Zhang H, Wu H, Guan J, Wang L, Ren X, Shi X, Liang Z & Liu T (2015) Paracrine SDF-1 α signaling mediates the effects of PSCs on GEM chemoresistance through an IL-6 autocrine loop in pancreatic cancer cells. *Oncotarget* 6: 3085–3097
- Zhang J, Xu W, Gui J & Huang X (2020b) [Genetic analysis of a case of chromosome 14q microdeletion]. *Zhonghua yi xue yi chuan xue za zhi = Zhonghua yixue yichuanxue zazhi = Chinese J Med Genet* 37: 178–181
- Zhang T, Zhu L, Ni T, Liu D, Chen G, Yan Z, Lin H, Guan F & Rice JP (2018) Voltage-gated calcium channel activity and complex related genes and schizophrenia: A systematic investigation based on Han Chinese population. *J Psychiatr Res* 106: 99–105
- Zhang X, Han B, Huang J, Zheng B, Geng Q, Aziz F & Dong Q (2010) Prognostic significance of OCT4 expression in adenocarcinoma of the lung. *Jpn J Clin Oncol* 40: 961–966
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, *et al* (2007) Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21: 2747–2761
- Zheng S, Wang X, Zhao D, Liu H & Hu Y (2022) Calcium homeostasis and cancer: insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications. *Trends Cell Biol*
- Zhou J, Zhan W, Chang C, Zhang X, Jia Y, Dong Y, Zhou C, Sun J & Grant EG (2014) Breast lesions: evaluation with shear wave elastography, with special emphasis on the 'stiff

- rim' sign. *Radiology* 272: 63–72
- Zhou Y, Wang X, Wang X, Loktionova NA, Cai X, Nwokonko RM, Vrana E, Wang Y, Rothberg BS & Gill DL (2015) STIM1 dimers undergo unimolecular coupling to activate Orai1 channels. *Nat Commun* 6: 8395
- Zhou Z, Flesken-Nikitin A, Corney DC, Wang W, Goodrich DW, Roy-Burman P & Nikitin AY (2006) Synergy of p53 and Rb deficiency in a conditional mouse model for metastatic prostate cancer. *Cancer Res* 66: 7889–7898
- Zhou Z, Flesken-Nikitin A & Nikitin AY (2007) Prostate cancer associated with p53 and Rb deficiency arises from the stem/progenitor cell-enriched proximal region of prostatic ducts. *Cancer Res* 67: 5683–5690
- Zhu GG, Risteli L, Mäkinen M, Risteli J, Kauppila A & Stenbäck F (1995) Immunohistochemical study of type I collagen and type I pN-collagen in benign and malignant ovarian neoplasms. *Cancer* 75: 1010–1017
- Zhu J, Feng Q & Stathopoulos PB (2017) The STIM-Orai Pathway: STIM-Orai Structures: Isolated and in Complex. In *Store-Operated Ca²⁺ Entry (SOCE) Pathways: Emerging Signaling Concepts in Human (Patho)physiology*, Groschner K Graier WF & Romanin C (eds) pp 15–38. Cham: Springer International Publishing

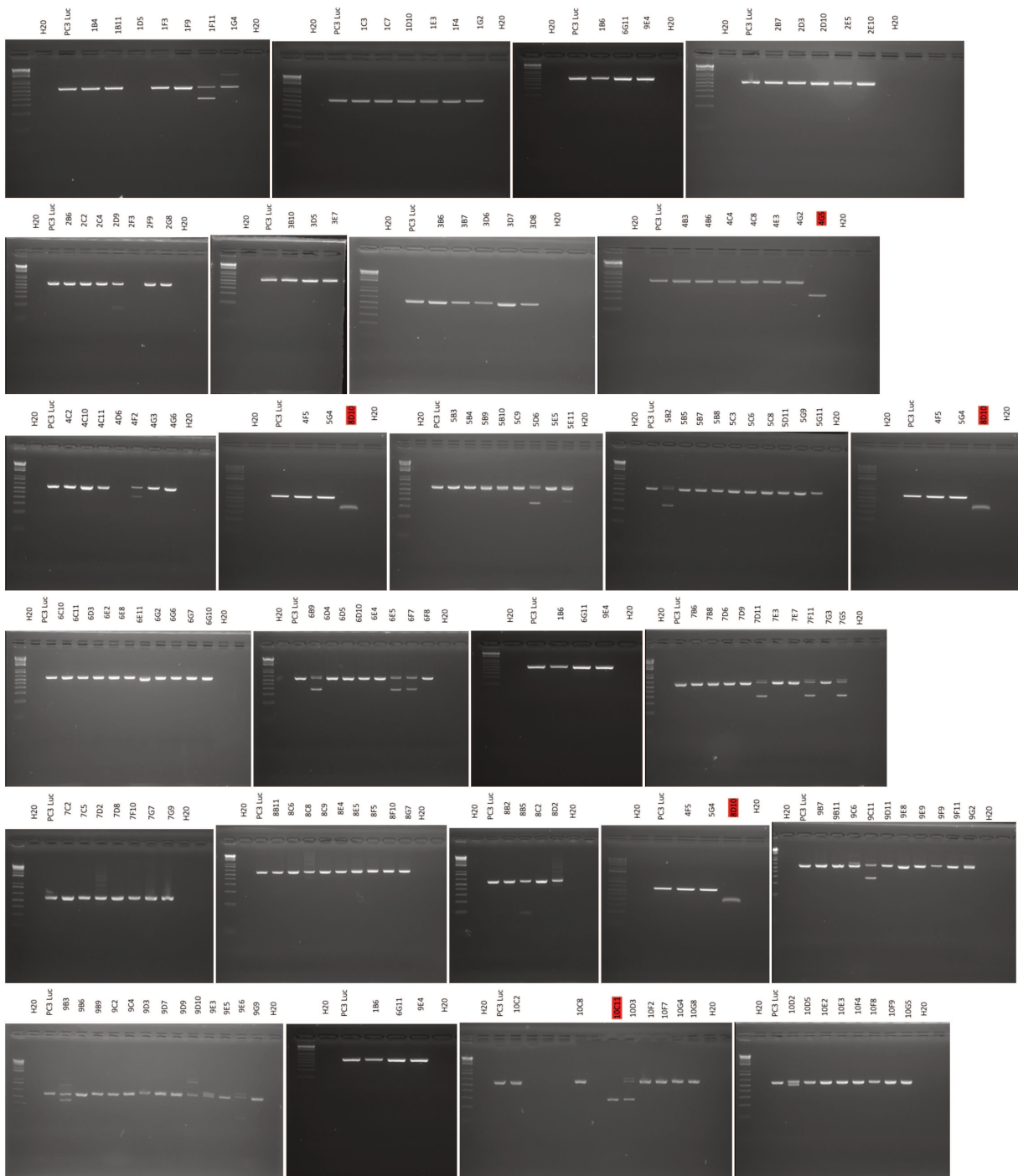


Annexes



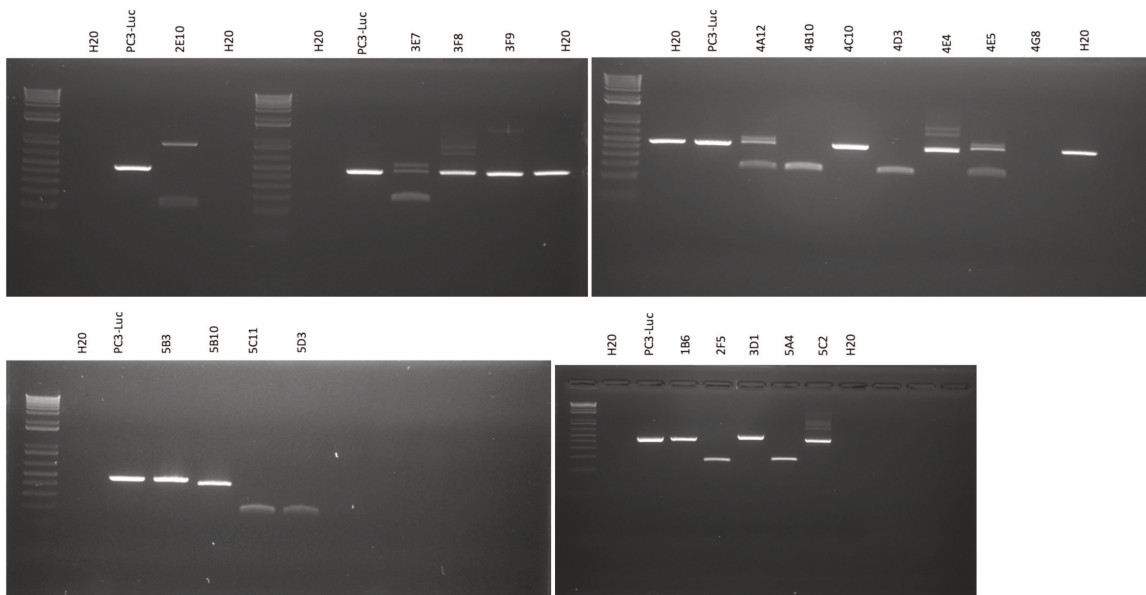
Annexe 1

Cible : Exon 5-6



Annexe 2

Cible : Exon 8-9



Annexe 3

Clone Details

Clone Name	Catalogue Number	SNB	HD Clone Number	Genotype	Mycoplasma test result
PC-3 luc parental	HD PAR-1983	41404	40231	NALCN (+/+)	Pass
2i19	HD 370-002	42827	40490	NALCN (-/-)	Pass
5J5	HD 370-002	43107	40558	NALCN (-/-)	Pass

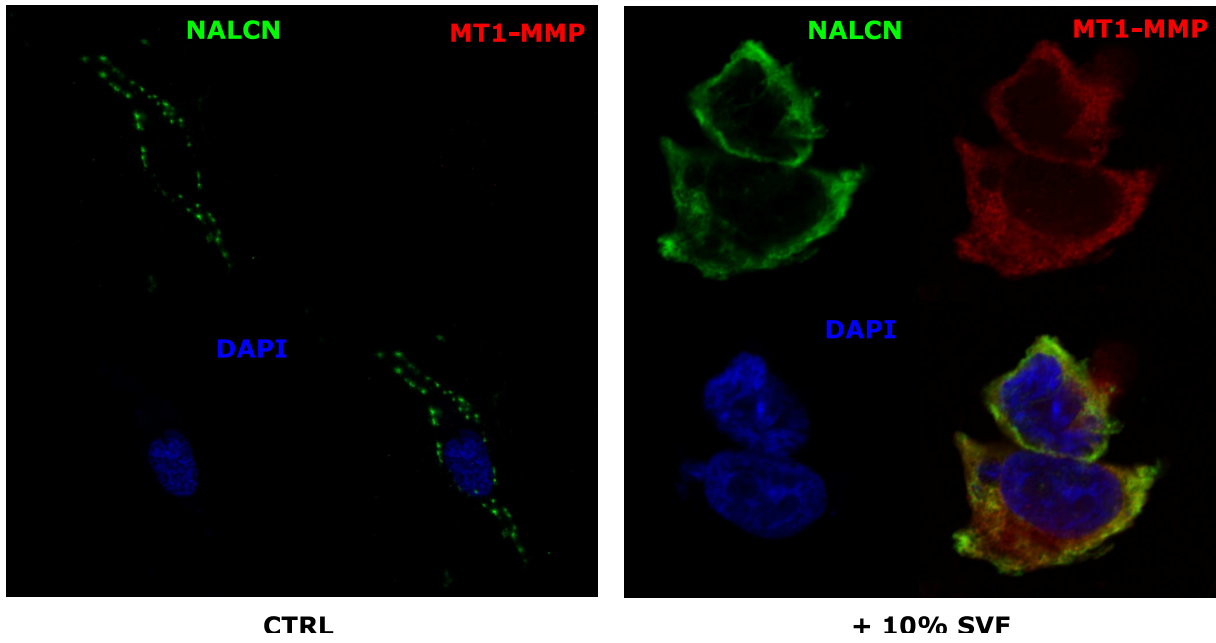
Reagent Details

gRNA	5'- GGGGCATGTTGCCGATTCCA -3'
gRNA orientation	Forward
Target exon	Exon 5

Clone Name	Genotype	Allele	gDNA modification
2i19	NALCN (-/-)	1	13 bp deletion
		2	1 bp insertion

Clone Name	Genotype	Allele	gDNA modification
5J5	NALCN (-/-)	1	1 bp insertion
		2	1 bp deletion

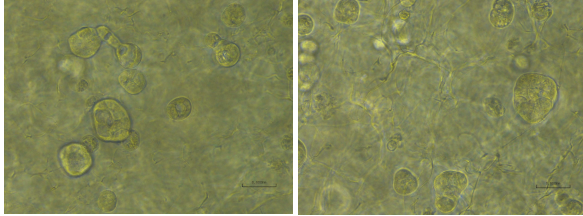
Annexe 4



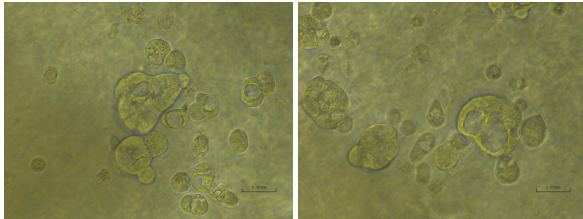
Annexe 5

CAPAN 1 Biomimesys Humain

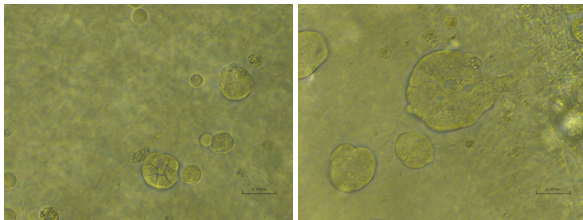
J5



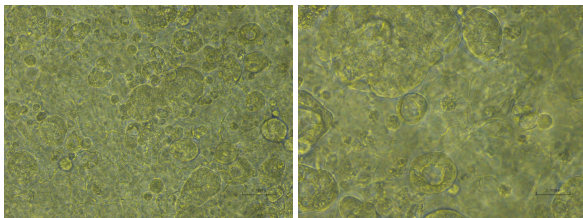
J7



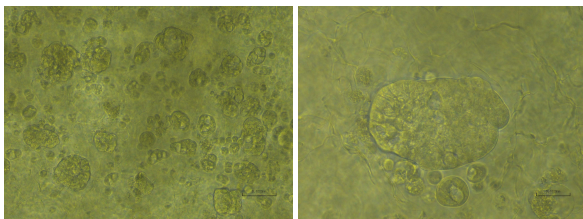
J10



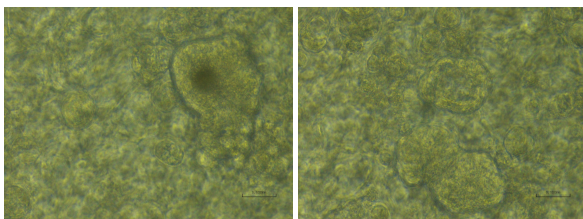
J12



J17

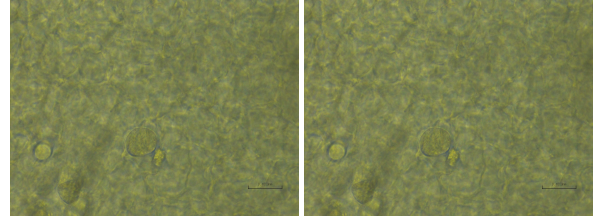


J24

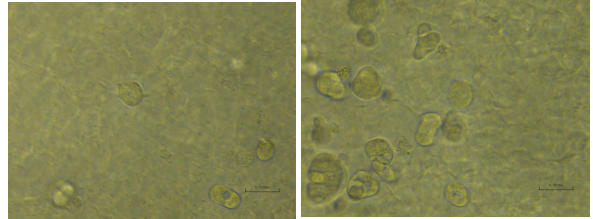


CAPAN 1 Biomimesys Rat

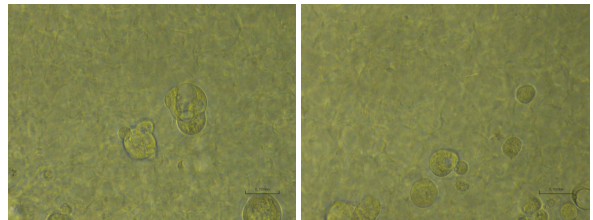
J5



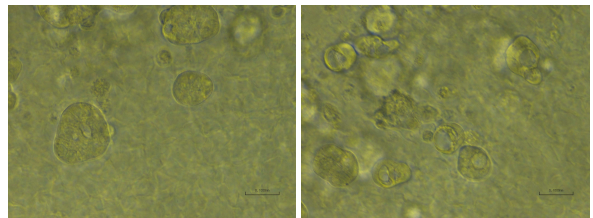
J7



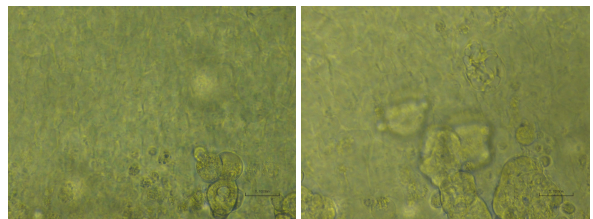
J10



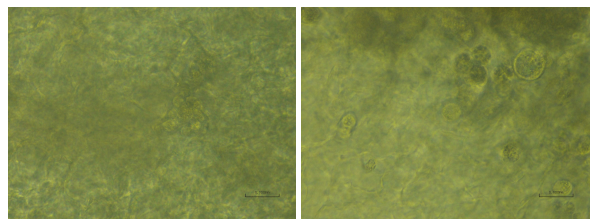
J12



J17



J24





Contributions et publications



Enseignement :

- 30h00 enseignement homéostasie chez les végétaux en parcours de Licence (Cours-TD + TPs) sous la tutelle du Pr Godfrey Neutelings
- Encadrement stagiaire en laboratoire Master 1
- Encadrement stagiaire en laboratoire Master 2

Formations école et collège doctorale :

- Organiser et développer ses enseignements dans le supérieur ! (21 novembre 2019)
- Bioéthique et Science (03 décembre 2019 - 3 décembre 2019)
- Organoïdes et nouveaux modèles in vitro (04 février 2020 - 4 février 2020) bioincubateur
- Déontologie des enseignants du supérieur (15 septembre 2020 - 15 septembre 2020)
- Ethique de la recherche (12 mars 2021 - 19 mars 2021)
- Intelligence économique et dynamique de l'innovation (15 mars 2021 - 31 mars 2021)
- La pandémie d'infection à SARS-COV-2 : de la science à l'action (06 avril 2021 - 15 avril 2021)
- Conférence Les réseaux sociaux professionnels, comment en faire bon usage? (21 septembre 2021 - 21 septembre 2021)
- Vendre sa thèse face à un recruteur (28 septembre 2021)
- Analyses bioinformatiques et biostatistiques de données de séquençage haut débit RNA-seq (14 mars 2022 - 17 mars 2022)
- Validation de MOOC _ Intégrité scientifique dans les métiers de la recherche

Conférence et congrès :

- 30st Ion channels meeting (8-11 septembre 2019, Sète)
- Colloque pHionic Summer School, Villeneuve d'Ascq
- Journée annuel axe 1 Cancéropole Nord Ouest (03 novembre 2020)
- Journée Scientifique de l'Association pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas (AFRCP) (03 novembre 2021)
- Journée André Verbert 2021 - Colloque des doctorants Faculté de médecine de Lille - Pôle Recherche
- 14eme journées scientifiques (04 mai 2022 - 6 mai 2022) Cancéropole Nord Ouest
- Journée Scientifique de l'Association pour la Recherche sur le Cancer du Pancréas (AFRCP) (21 octobre 2022)

Implications

- Élu commission mixte du département de biologie de l'université de Lille
- Élu conseil école doctorale biologie-santé de Lille

Article

Orai1 Channel Regulates Human-Activated Pancreatic Stellate Cell Proliferation and TGF β ₁ Secretion through the AKT Signaling Pathway

Silviya Radoslavova ^{1,2}, Antoine Folcher ², Thibaut Lefebvre ¹, Kateryna Kondratska ², Stéphanie Guénin ³, Isabelle Dhennin-Duthille ¹, Mathieu Gautier ¹, Natalia Prevarskaya ^{2,†} and Halima Oquadid-Ahidouch ^{1,*,†}

¹ Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, UR-UPJV 4667, University of Picardie Jules Verne, 80039 Amiens, France; silviya.radoslavova@etud.u-picardie.fr (S.R.); th.lefebvre27@gmail.com (T.L.); isabelle.dhennin@u-picardie.fr (I.D.-D.); mathieu.gautier@u-picardie.fr (M.G.)

² University of Lille, Inserm U1003-PHYCEL—Cellular Physiology, 59000 Lille, France; antoine.folcher@inserm.fr (A.F.); kateryna.kondratska@inserm.fr (K.K.); natacha.prevarskaya@univ-lille.fr (N.P.)

³ Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire, UFR des Sciences, 80039 Amiens, France; stephanie.vandecasteele@u-picardie.fr

* Correspondence: halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr; Tel.: +33-3-22-82-7646; Fax: +33-3-2282-7550

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Radoslavova, S.; Folcher, A.; Lefebvre, T.; Kondratska, K.; Guénin, S.; Dhennin-Duthille, I.; Gautier, M.; Prevarskaya, N.; Oquadid-Ahidouch, H. Orai1 Channel Regulates Human-Activated Pancreatic Stellate Cell Proliferation and TGF β ₁ Secretion through the AKT Signaling Pathway. *Cancers* **2021**, *13*, 2395. <https://doi.org/10.3390/cancers13102395>

Academic Editor: Alexander Arlt

Received: 30 March 2021

Accepted: 12 May 2021

Published: 15 May 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/>).

Simple Summary: Activated pancreatic stellate cells (aPSCs), the main source of cancer-associated fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), are well known as the key actor of the abundant fibrotic stroma development surrounding the tumor cells. In permanent communication with the tumor cells, they enhance PDAC early spreading and limit the drug delivery. However, the understanding of PSC activation mechanisms and the associated signaling pathways is still incomplete. In this study, we aimed to evaluate the role of Ca²⁺, and Orai1 Ca²⁺ channels, in two main PSC activation processes: cell proliferation and cytokine secretion. Indeed, Ca²⁺ is a versatile second messenger implicated in the regulation of numerous biological processes. We believe that a better comprehension of PSC Ca²⁺-dependent activation mechanisms will bring up new crucial PDAC early prognostic markers or new targeting approaches in PDAC treatment.

Abstract: Activated pancreatic stellate cells (aPSCs), the crucial mediator of pancreatic desmoplasia, are characterized, among others, by high proliferative potential and abundant transforming growth factor β ₁ (TGF β ₁) secretion. Over the past years, the involvement of Ca²⁺ channels in PSC pathophysiology has attracted great interest in pancreatic cancer research. We, thus, aimed to investigate the role of the Orai1 Ca²⁺ channel in these two PSC activation processes. Using the siRNA approach, we invalidated Orai1 expression and assessed the channel functionality by Ca²⁺ imaging, the effect on aPSC proliferation, and TGF β ₁ secretion. We demonstrated the functional expression of the Orai1 channel in human aPSCs and its implication in the store-operated Ca²⁺ entry (SOCE). Orai1 silencing led to a decrease in aPSC proliferation, TGF β ₁ secretion, and AKT activation. Interestingly, TGF β ₁ induced a higher SOCE response by increasing Orai1 mRNAs and proteins and promoted both AKT phosphorylation and cell proliferation, abolished by Orai1 silencing. Together, our results highlight the role of Orai1-mediated Ca²⁺ entry in human aPSC pathophysiology by controlling cell proliferation and TGF β ₁ secretion through the AKT signaling pathway. Moreover, we showed a TGF β ₁-induced autocrine positive feedback loop by promoting the Orai1/AKT-dependent proliferation via the stimulation of Orai1 expression and function.

Keywords: activated pancreatic stellate cells; Orai1 channel; TGF β ₁; cell proliferation; AKT activation

1. Introduction

Extensive desmoplastic stroma is the central pathological feature of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), responsible for the tumor's development, progression, metastasis, and treatment resistance. This fibrotic stroma is mainly composed of cancer-associated fibroblasts (CAFs), also called pancreatic stellate cells (PSCs). Indeed, activated PSCs are the orchestrators of fibrotic desmoplasia development and the major source of CAFs in PDAC [1–4].

In the healthy pancreas, PSCs are stromal vitamin A lipid-storing cells residing in an inactive-quiescent state that accounts for 4–7% of the organ. Quiescent PSCs are known to maintain pancreatic tissue architecture by sustaining the balance between extracellular matrix (ECM) secretion and degradation. However, in response to pancreatic injury, inflammation, or carcinogenic processes, PSCs undergo morphological and functional modifications to acquire a myofibroblast-like phenotype and become activated. This transition is followed by a loss of vitamin A-containing lipid droplets, an increase in alpha-smooth muscle actin (α SMA) expression, and ECM secretion, such as type I collagen. PSC activation induces the enhancement of their proliferative and migratory potentials, leading to the development of the dense fibrotic tissue surrounding the pancreatic cancer cells (PCCs) and disrupting the drug delivery [5–8]. Indeed, during PDAC, this desmoplastic reaction formed by the PSC-induced fibrotic tissue accounts for 80% of the tumor's total volume. In fact, it is well known that activated PSCs establish a dynamic dialogue with the PCCs, and profoundly affect the tumor cell behavior by promoting PCCs proliferation, migration, and invasion to enhance PDAC early spreading [4,9].

PSC activation is also characterized by abundant secretion of various cytokines, chemokines, and growth factors, such as the transforming growth factor β_1 (TGF β_1) [10,11]. TGF β_1 is well known now as the profibrotic critical regulator of pancreatic fibrosis, which drives PSC activation through the regulation of α SMA expression, cell proliferation, and ECM synthesis, mainly by type I collagen synthesis [12–14]. This TGF β_1 -mediated autocrine loop contributes to the sustained activation of PSCs [15–17].

All these cellular processes implicated in PSC activation are controlled by intracellular signal transduction pathways [10,18,19]. Among these pathways, the serine-threonine kinase AKT has been reported to regulate PSC proliferation and cell cycle progression. Schwer et al. have demonstrated that blockade of the PI3K/AKT pathway with carbon monoxide releasing molecule-2 (CORM-2) inhibited PSC proliferation and induced the cell cycle arrest in the G0/G1 phase [20]. Moreover, Zhang et al. highlighted the effect of the tumor suppressor PTEN (phosphatase and tensin homolog), known to reduce AKT phosphorylation, on the inhibition of PSC proliferation and apoptosis [21]. Furthermore, Nishida et al. have shown the involvement of PI3K/AKT in the regulation of platelet-derived growth factor-induced PSC migration [10,18].

Moreover, most of the biological processes, including cell proliferation, survival, migration, or protein secretion, are driven by intracellular Ca^{2+} , which acts as a universal second messenger. A few studies have revealed that intracellular Ca^{2+} signaling is also crucial for the regulation of PSC physiology. Won et al. were the first to demonstrate that Ca^{2+} signaling is different between quiescent and activated PSCs. Activated PSCs were characterized by transient elevations of intracellular Ca^{2+} in response to thrombin or trypsin, which were absent in quiescent PSCs. They have also reported that nuclear Ca^{2+} signals are essential for promoting activated PSC proliferation [22]. Therefore, one of the major Ca^{2+} entry pathways in non-excitable cells is the store-operated calcium channels (SOCs), also known as Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (CRAC) channels. SOCs are mainly composed of the pore-forming Orai1 protein and the Ca^{2+} -sensing stromal interaction molecule STIM1, and they become activated after endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} depletion [23]. A recent study has pharmacologically identified the presence of CRAC channels in mice PSCs [24]. These data were supported by Waldron et al., who demonstrated the expression of Orai1, Orai2, and STIM1 in mice PSCs [25].

Although many studies have been focused on the molecular and cellular mechanisms of PSC activation, a very limited number of data is available on the role of Ca^{2+} and SOCs channels in the regulation of PSC activation and the associated signaling pathways. In the present study, we focused on two principal PSC activation hallmarks, (i) cell proliferation and (ii) cytokine secretion, particularly $\text{TGF}\beta_1$ secretion. We aimed to investigate the role of Ca^{2+} entry through the Orai1 channel in the regulation of these two processes and the associated molecular mechanisms. We showed, for the first time, that the Orai1 channel is expressed and functional in human-activated PSCs. Moreover, we demonstrated that Orai1- Ca^{2+} entry is essential for human-activated PSC proliferation and $\text{TGF}\beta_1$ secretion by triggering the activation of the AKT signaling pathway. Interestingly, $\text{TGF}\beta_1$ treatment induced an autocrine positive feedback loop, which led to the enhancement of PSC Orai1 / AKT-dependent proliferation through the regulation of Orai1 activity and expression.

2. Results

2.1. Functional Expression of Orai1 Channel in PS-1 and RLT Human-Activated PSCs

At first, the activated state of PS-1 and RLT human immortalized PSCs was determined by the presence of αSMA expression, the main activation marker of PSCs, using Western blot experiments (Figure 1(Aa, Da), respectively). We, therefore, investigated Orai1 channel expression, also by Western blotting, which revealed its presence in the PS-1 (Figure 1(Ab)) and RLT (Figure 1(Db)) human-activated PSCs, and by immunofluorescence staining for PS-1 (Figure S1A).

To establish whether Orai1 channels are functional too in PS-1 and RLT cells, we performed Ca^{2+} - imaging experiments using Fura2/AM fluorescent probe. Since, it is well known that Orai1 is one of the key players of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) in the majority of cell types, we evaluated this possibility by using the siRNA approach. Orai1 protein expression was decreased by $60.54 \pm 4.40\%$ in PS-1 cells ($N = 3$, $p < 0.001$, Figure 1(Ba, Bb)), and by $38.38 \pm 13.26\%$ in RLT cells ($N = 3$, $p < 0.05$, Figure 1(Ea, Eb)), 72 h post-transfection. We then measured the SOCE after an endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} depletion induced by thapsigargin (Tg), which acts as an irreversible inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pump. Orai1 silencing reduced SOCE by 67.81% (siCtrl: $100 \pm 2.52\%$, siOrai1: $32.19 \pm 1.36\%$, $N = 5$, $p < 0.001$, Figure 1(Ca, Cb)) in PS-1 cells, and by 72.65% (siCtrl: $100 \pm 3.54\%$, siOrai1: $27.35 \pm 1.55\%$, $N = 3$, $p < 0.001$, Figure 1(Fa, Fb)) in RLT cells. Moreover, in both, PS-1 and RLT cells, Orai1 knocking down decreased the Ca^{2+} basal fluorescence ratio, by 5.93% (siCtrl: $100 \pm 1.25\%$, siOrai1: $94.07 \pm 0.84\%$, $N = 5$, $p < 0.001$, Figure S1(Ba)) and by 17.17% (siCtrl: $100 \pm 1.42\%$ siOrai1: $82.83 \pm 1.51\%$, $N = 3$, $p < 0.001$, Figure S1(Bb)), respectively. However, contrary to PS-1 cells (siCtrl: $100 \pm 4.21\%$, siOrai1: $101.35 \pm 3.53\%$, $N = 5$, Figure 1(Ca, Cc)), Orai1 inhibition led to 21.80% reduction in the Ca^{2+} ER depletion induced by Tg, in RLT cells (siCtrl: $100 \pm 2.61\%$, siOrai1: $78.20 \pm 5.60\%$, $p < 0.001$, $N = 3$, Figure 1(Fa, Fc)).

These results showed that the Orai1 channel is functionally expressed, and it participates in the SOCE as well as the regulation of Ca^{2+} basal concentration in human-activated PSCs.

To investigate whether SOCE is already induced by the PS-1 cell culture conditions (with cell medium containing 10% fetal bovine serum (FBS)), we performed Ca^{2+} imaging experiments after overnight FBS deprivation. Indeed, it is well known that FBS can induce a Ca^{2+} ER depletion by acting on the inositol triphosphate receptor, which will promote STIM1 translocation to the cell membrane in order to activate Orai1 protein and so permit the SOCE [26–29]. We so measured SOCE after perfusion of $1 \mu\text{M}$ Tg and 10% FBS, and we observed that both Tg and FBS-induced Ca^{2+} ER depletion triggering a SOCE. However, FBS stimulation led to a lower SOCE (30% decrease) compared to Tg stimulation (Tg: $100 \pm 2.94\%$, FBS: $73.41 \pm 2.37\%$, $N = 3$, $p < 0.001$, Figure S1(Ca, Cb)). These data revealed that, in our culture conditions, Orai1 is activated and leads to SOCE that regulates Ca^{2+} basal concentration.

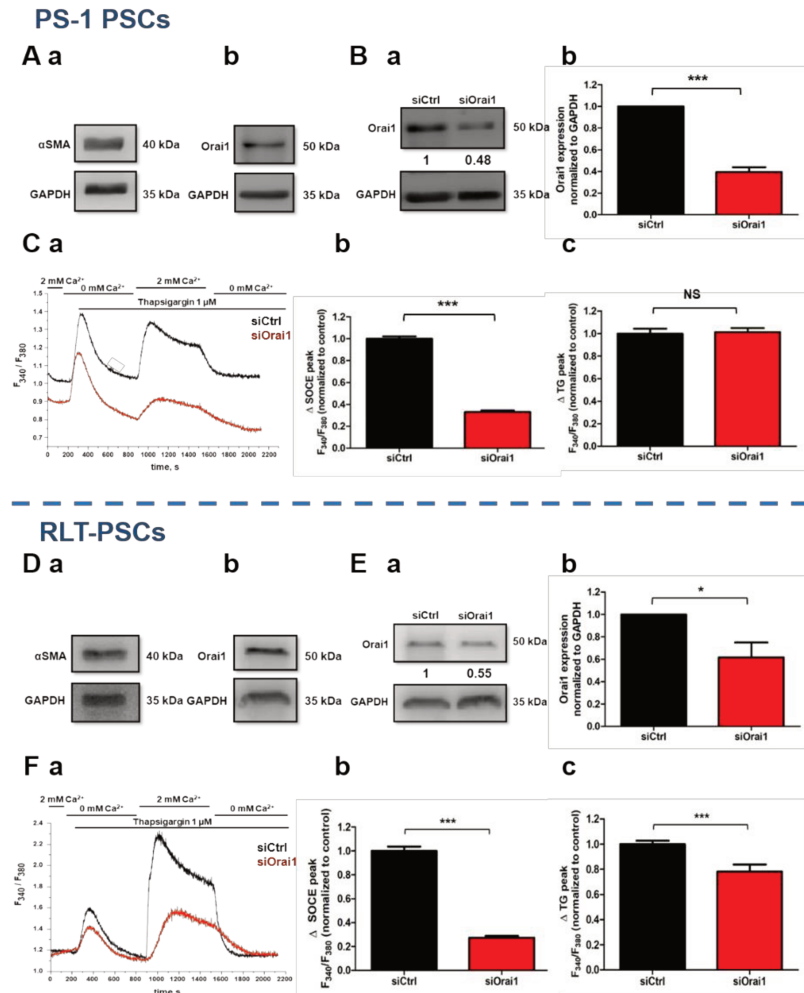


Figure 1. Orai1 channel is functionally expressed in human-activated PSCs by regulating the store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). (A,D) Protein expression of αSMA , the principal marker of PSC activation (Aa,Da), and Orai1 channel (Ab,Db), by Western blot, 72 h post-proliferation, in PS-1 (A) and RLT (D) human-activated PSCs. (B,E) Evaluation of Orai1 siRNA 72 h post-transfection efficiency by Western blot. Illustrative Western blot of Orai1 protein inhibition (Ba,Ea), with the quantification (Bb, Eb), in both PS-1 (B) and RLT (E) PSCs. Western blotting results were first normalized to the referent protein GAPDH and then to the control ($N = 3$, $* p < 0.05$, $*** p < 0.001$, Student's t -test). (C,F) Assessment of Orai1 channel's function in siOrai1 transfected PS-1 (C) and RLT (F) cells, using calcium imaging, 72 h post-transfection. SOCE was measured after endoplasmic reticulum release induced by $1 \mu\text{M}$ of thapsigargin, illustrated by representative traces (Ca,Fa) of SOCE measurements in both cell lines. All histograms are represented as the average \pm SEM normalized to the control, of SOCE (siCtrl: $n = 210$, siOrai1: $n = 189$, $N = 5$ for PS-1 cells, (Cb)) (siCtrl: $n = 91$, siOrai1: $n = 80$, $N = 3$ for RLT cells, (Fb)), and of endoplasmic reticulum release induced by $1 \mu\text{M}$ Thapsigargin (siCtrl: $n = 210$, siOrai1: $n = 184$, $N = 5$ for PS-1 cells, (Cc)) (siCtrl: $n = 91$, siOrai1: $n = 80$, $N = 3$ for RLT cells, (Fc)) ($* p < 0.001$, NS: no significant, Student's t -test, n : number of cells, N : number of passage).

2.2. *Orai1 Is Involved in Human-Activated PSC Proliferation and TGF β_1 Secretion*

We next wondered whether the Orai1 channel could drive some of PSCs activation processes. We chose to focus on PSC proliferation and cytokine secretion, which are two of the main activation hallmarks of PSCs. After 72h of Orai1 silencing, we assessed PS-1 and RLT's cell proliferation by MTT colorimetric assay and we found that Orai1 knock-down decreased by 37.12% PS-1's cell proliferation rate (siCtrl: $100 \pm 4.89\%$, siOrai1: $62.88 \pm 2.04\%$, $N = 4$, $p < 0.001$, Figure 2A), and by 31.39% RLT's cell proliferation (siCtrl: $100 \pm 3.80\%$, siOrai1: $68.61 \pm 6.21\%$, $N = 3$, $p < 0.001$, Figure 2A). We next performed cell cycle analysis on PS-1 cells using flow cytometry (Figure 2(Ba,Bb)). Orai1 silencing induced a cell cycle arrest in G0/G1 phase (siCtrl: $77.18 \pm 0.65\%$, siOrai1: $82.10 \pm 1.06\%$, $N = 3$, $p < 0.001$), followed by a decrease in cell number in S phase (siCtrl: $8.37 \pm 0.37\%$, siOrai1: $5.12 \pm 0.46\%$, $N = 3$, $p < 0.01$), without affecting the G2/M phase (siCtrl: $14.44 \pm 0.61\%$, siOrai1: $12.76 \pm 0.80\%$, $N = 3$, Figure 2(Ba,Bb)). Simultaneously, we checked if the observed effect may be caused by an increase of cell mortality, which was evaluated by Trypan blue colorimetric assay. In both PS-1 and RLT PSCs, we did not reveal any significant effect on cell mortality (Figure S2C,D). In accordance with this data, apoptosis analysis on PS-1 cells, using the Annexin V/IP staining, confirmed the absence of any effect on cell mortality (Figure S2(Ea,Eb)).

Another characteristic of PSC activation is the abundant secretion of TGF β_1 multifunctional cytokine [6,30]. To test whether Orai1 could be involved in the modulation of TGF β_1 expression and secretion, we first quantified TGF β_1 mRNA expression after 72 h of Orai1 protein inhibition in both PS-1 and RLT cells. Orai1 knock-down led to 69.71% TGF β_1 mRNA decrease in PS-1 cells (siCtrl: $100 \pm 24.45\%$, siOrai1: $30.29 \pm 10.25\%$, $N = 3$, $p < 0.05$, Figure 2(Ca)), and to 53.95% mRNA decrease in RLT cells (siCtrl: $100 \pm 16.87\%$, siOrai1: 46.05 ± 12.59 , $N = 3$, $p < 0.05$, Figure S2B). We then evaluated the impact of Orai1 in the TGF β_1 secretion process by ELISA assay (Figure 2D) in PS-1 cells. We observed no effect on TGF β_1 secretion 72 h after Orai1 silencing, but we found a 41.31% decrease in TGF β_1 secretion after 96 h of siOrai1 transfection (siCtrl: $100 \pm 9.49\%$, siOrai1: $58.69 \pm 12.30\%$, $N = 3$, $p < 0.05$, Figure 2D). Simultaneously, we have also looked at TGF β_1 mRNA expression to see whether the effect of Orai1 silencing persists 96 h post-transfection. However, even though we observed a tendency of TGF β_1 mRNA decrease, it remained no significant (siCtrl: $100 \pm 20.95\%$, siOrai1: $58.67 \pm 14.19\%$, $N = 3$, Figure 2(Cb)).

These results demonstrated the involvement of the Orai1 channel in human-activated PSC proliferation by regulating cell cycle progression in the G1 phase and G1/S transition and TGF β_1 secretion.

2.3. *Orai1 Regulates the Activation of AKT But Not of ERK1/2 and SMAD2 in Human-Activated PSCs*

Since the discovery of PSCs, accumulating studies have been focused on the investigation of the signal transduction pathways implicated in PSC activation [10,18]. AKT, ERK1/2, and SMAD2 phosphorylation have been reported to be three of the main signaling pathways involved in PSC activation processes [18,31–33]. Hence, we sought to determine whether Orai1 regulates one of these signaling pathways. We, therefore, evaluated AKT, ERK1/2, and SMAD2 phosphorylation levels after 72 h of siOrai1 transfection, by Western blotting, in both PS-1 (Figure 3) and RLT cells (Figure S4). Silencing of Orai1 induced a 61.4% decrease in AKT phosphorylation after 10% FBS stimulation (Figure 3(Aa,Ab)), without affecting the AKT total protein amount (Figure S3A) in PS-1 cells. Similar experiments performed on ERK1/2 and SMAD2 activation showed that Orai1 silencing failed to affect ERK1/2 (Figure 3(Ba,Bb)) and SMAD2 (Figure 3(Ca,Cb)) phosphorylation as well as ERK1/2 total protein amount (Figure S3B). However, under 0% FBS conditions, the SMAD2 total protein amount was decreased in the siOrai1 transfected cells, without any alteration in 10% FBS conditions (Figure S3C). Interestingly, 72 h Orai1 knocking down led to a 46.8% reduction of AKT phosphorylation, in RLT cells, without modifying ERK1/2 and SMAD2 activation, and either the total protein amount of each one (Figure S4A–C).

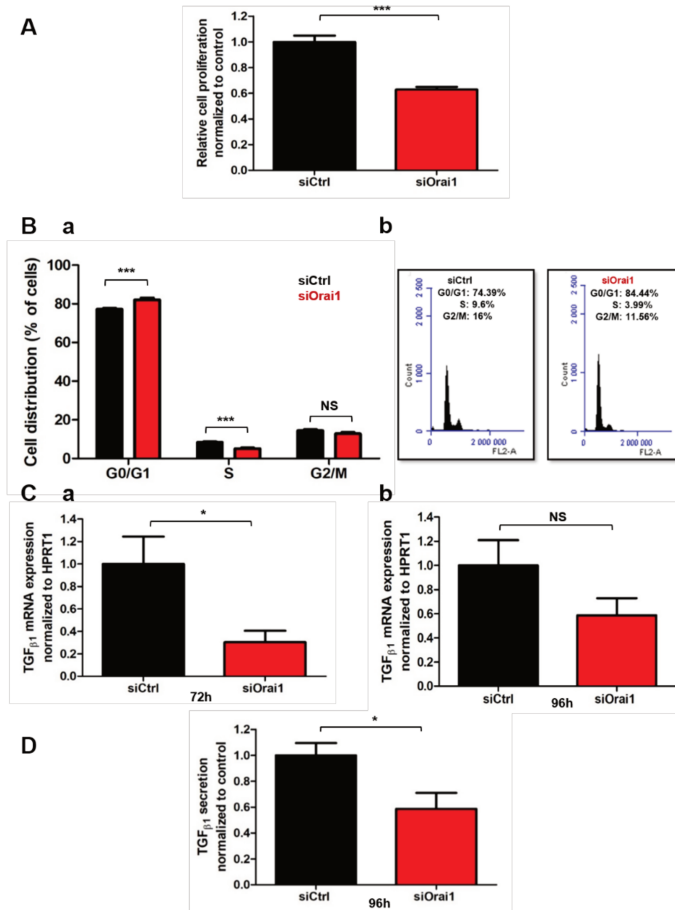


Figure 2. Orai1 modulates human-activated PSC proliferation and TGF β_1 secretion. (A) Effect of Orai1 silencing on PS-1 cell proliferation, assessed 72 h post-transfection by MTT assay (***p* < 0.001, *N* = 4, Student's *t*-test). (B) Implication of Orai1 in PS-1 cell cycle progression. Cell distribution (G0/G1, S and G2/M phase) was examined by flow cytometry 72 h after transfection, with propidium iodide staining (***p* < 0.001, NS: no significant, *N* = 3, two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, (Ba) and represented by an illustrative cell cycle profile 72 h after Orai1 inhibition (Bb). (C) Impact of Orai1 knocking down on TGF β_1 mRNA expression, evaluated by qPCR, 72 h (Ca) and 96 h (Cb) post-transfection. (D) Role of Orai1 inhibition on TGF β_1 secretion, assessed by ELISA assay, 96 h post-transfection (* *p* < 0.05, *N* = 3, Student *t*-test). Values were normalized to control and reported as mean \pm SEM.

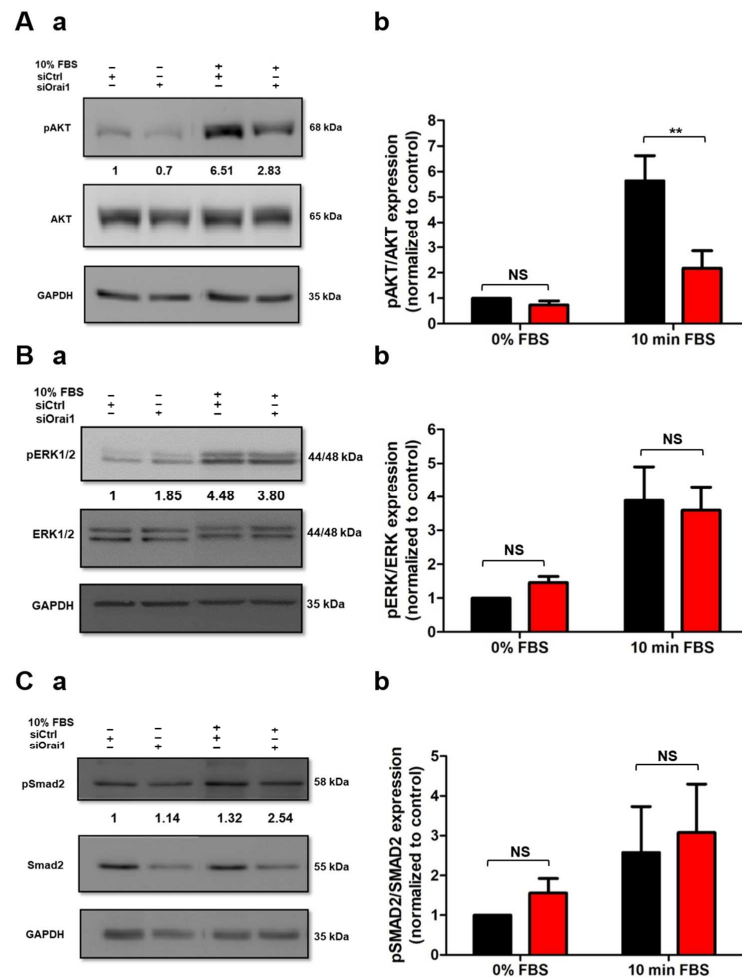


Figure 3. Orai1 mediates AKT activation but not ERK1/2 nor SMAD2 phosphorylation in human-activated PSCs. (A) Involvement of Orai1 in AKT phosphorylation in PS-1 cells. Representative Western blot showing the effect of Orai1 inhibition after FBS starvation of transfected cells overnight. Cells were then stimulated 10 min with FBS to evaluate the impact of Orai1 on AKT activation (Aa). AKT phosphorylation was quantified by the ratio of phosphorylated AKT form/total AKT protein (siCtrl + 10 min FBS: 5.63 ± 0.99 -fold, siOrai1 + 10 min FBS: 2.18 ± 0.69 -fold, (Ab). (B) Assessment of ERK1/2 activation after Orai1 knocking down in PS-1 cells. Representative Western blot showing the effect of Orai1 silencing on ERK1/2 activation, using the protocol described above (Ba). ERK1/2 phosphorylation was quantified by the ratio of phosphorylated ERK1/2 form/total ERK1/2 protein (Bb). (C) Evaluation of Orai1 silencing on SMAD2 phosphorylation. Representative Western blot showing the effect of siOrai1 transfected cells on SMAD2 activation (Ca), with the quantification using the ratio of phosphorylated SMAD2 form/total SMAD2 protein (Cb). All values were first normalized to the referent protein GAPDH and then to the 0% FBS control condition. All experiments were realized 72 h post-transfection. Values were reported as mean \pm SEM (** $p < 0.01$, NS, at least $N = 3$, two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test).

2.4. AKT Signaling Pathway Mediates Human-Activated PSC Proliferation and TGF β_1 Secretion

Up until now, very few studies have demonstrated the involvement of the PI3K/AKT signaling pathway in PSC proliferation, without showing a direct role in the regulation of this process [21]. We thus investigated the potential direct implication of the AKT pathway in the modulation of PS-1 proliferation. To determine this, we treated PS-1 for 72 h with the pharmacological inhibitor of PI3K/AKT pathway LY 294002 and evaluated the effect on both AKT phosphorylation and cell proliferation. LY 294002 treatment drastically reduced AKT activation by $83.68 \pm 3.20\%$ ($N = 3$, $p < 0.001$, Figure 4(Aa,Ab)). PS-1 treatment with LY 294002 induced a 59.58% decrease in the proliferation rate, revealing that AKT pathway mediates PS-1 cell proliferation (Ctrl: $100 \pm 4.60\%$, LY 294002: $40.42 \pm 2.06\%$, $N = 4$, $p < 0.001$, Figure 4B).

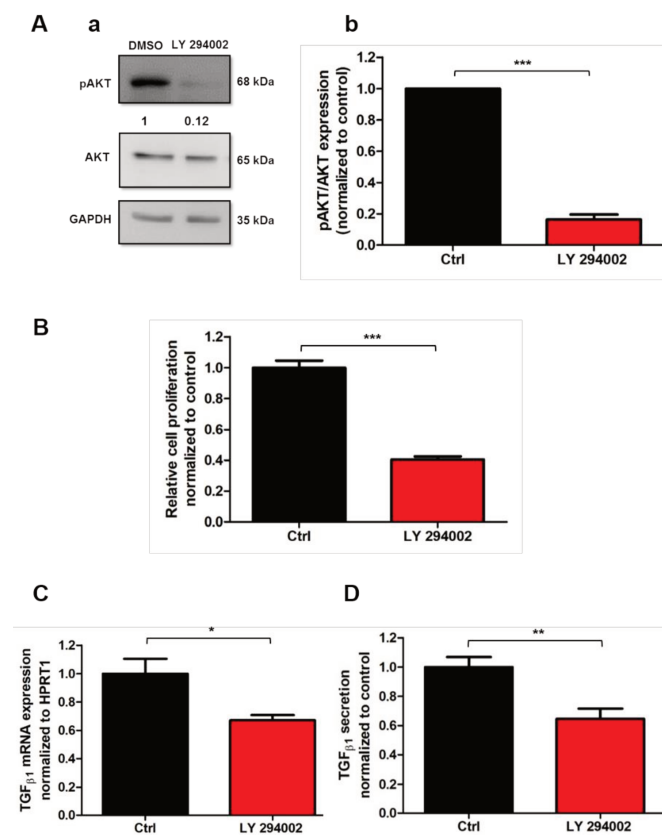


Figure 4. AKT signaling pathway controls PSC proliferation and TGF β_1 secretion. **(A,B)** Inhibition of AKT activation after 72 h cell treatment with the PI3K/AKT pharmacological inhibitor LY 294002 (20 μ M) decreased PS-1 cell proliferation. Representative Western blot of AKT reduced phosphorylation by LY 294002 treatment **(Aa)** and the quantification as previously described **(Ab)** ($N = 3$, $*** p < 0.001$, Student *t*-test). All values were first normalized to the referent protein GAPDH and then to the control condition, reported as mean \pm SEM. Cell proliferation was evaluated after 72 h of treatment by MTT assay ($N = 4$, $*** p < 0.001$, Student *t*-test) **(B)**. **(C,D)** Effect of AKT inhibition on TGF β_1 mRNA expression **(C)** and secretion **(D)** after 72 h LY 294002 treatment ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$, $N = 3$, Student *t*-test). Values were normalized to control and reported as mean \pm SEM.

Moreover, some studies established the involvement of the AKT pathway in TGF β_1 mRNA and protein expression in hepatic stellate cells, suggesting that TGF β_1 might be regulated by the AKT pathway [34]. However, there is no evidence yet of this mechanism in PSCs. We then assessed whether the AKT pathway plays a role in TGF β_1 mRNA expression and secretion using the pharmacological inhibitor LY 294002. We observed a 32.96% reduction in TGF β_1 mRNA (Ctrl: $100 \pm 10.44\%$, LY 294002: $67.04 \pm 3.75\%$, $N = 3$, $p < 0.05$) after the pharmacological inhibition of AKT pathway (Figure 4C). These results were completed with the evaluation of TGF β_1 secretion using the ELISA assay. In accordance with the mRNA transcripts, LY 294002 treatment induced 35.41% decrease in TGF β_1 secretion (Ctrl: $100 \pm 6.83\%$, LY 294002: $64.59 \pm 6.92\%$, $N = 3$, $p < 0.01$, Figure 4D).

Taken together, these data suggested that Orai1 regulates PSC proliferation and TGF β_1 secretion, probably through the activation of the AKT signaling pathway.

2.5. TGF β_1 Promotes Orai1-Mediated Ca $^{2+}$ Entry and Increases Both Orai1 mRNA and Protein Expression in Human-Activated PSCs

TGF β_1 has been reported to be involved in the fibrosis mediated by PSC activation [35] and the autocrine regulation of PSCs [15]. Several reports have already demonstrated the involvement of TGF β_1 in the regulation of some cell types' intracellular mechanisms, including lung, embryonic fibroblasts, and pancreatic cancer cells, through a Ca $^{2+}$ -dependent pathway [36–38]. Indeed, it has been shown for a long time that TGF β_1 can modulate Ca $^{2+}$ signaling by stimulating the Ca $^{2+}$ influx and thus by increasing the cytoplasmic Ca $^{2+}$ concentration [36]. According to these findings, we wondered whether TGF β_1 could also mediate the Ca $^{2+}$ influx in PS-1 human-activated PSCs by promoting Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry. To evaluate this hypothesis, we performed Ca $^{2+}$ imaging experiments where we perfused TGF β_1 on siCtrl and siOrai1 transfected cells and measure the SOCE response. Interestingly, we noted a 14% increase in SOCE after TGF β_1 perfusion on siCtrl transfected cells compared to the siCtrl non-perfused with TGF β_1 cells. However, we did not remark any difference in Orai1 knock-down cells, perfused and non-perfused with TGF β_1 , inferring an effect of TGF β_1 on Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry (siCtrl: $100 \pm 3.33\%$, siCtrl+ TGF β_1 : $114.14 \pm 3.07\%$, siOrai1: $21.74 \pm 1.19\%$, siOrai1+ TGF β_1 : $24.96 \pm 0.92\%$, $N = 3$, $p < 0.001$, $p > 0.05$, Figure 5(Aa,Ab)). We then supposed that the short-term effect of TGF β_1 on Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry might be due to a long-term effect of this cytokine on Orai1 mRNA and protein expression. We thus treated PS-1 cells for 48 h with TGF β_1 , in the presence of low-FBS conditions (1%), and we observed that both, Orai1 mRNA and protein expression were increased following TGF β_1 treatment. qPCR experiments revealed a 2.87-fold increase in Orai1 mRNA transcripts in TGF β_1 treated cells (Ctrl: 1 ± 0.36 -fold, TGF β_1 : 2.87 ± 0.66 -fold, $N = 3$, $p < 0.05$, Figure 5(Ba)). Furthermore, it is known that the store-operated Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry is promoted by the intracellular STIM1 protein. Consequently, we quantified in parallel the impact of TGF β_1 treatment on STIM1 mRNA expression, finding a comparable increase in STIM1 mRNAs as for Orai1 (Ctrl: 1 ± 0.34 -fold, TGF β_1 : 2.94 ± 0.68 -fold, $N = 3$, $p < 0.05$, Figure 5(Bb)). These data suggest that TGF β_1 stimulates store-operated Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry modulating the expression of both main SOCE actors, Orai1 and STIM1. Similarly, Western blotting experiments showed a 1.52 ± 0.15 -fold rise of Orai1 protein level in treated compared to non-treated with TGF β_1 cells ($N = 3$, $p < 0.05$ Figure 5(Ca,Cb)).

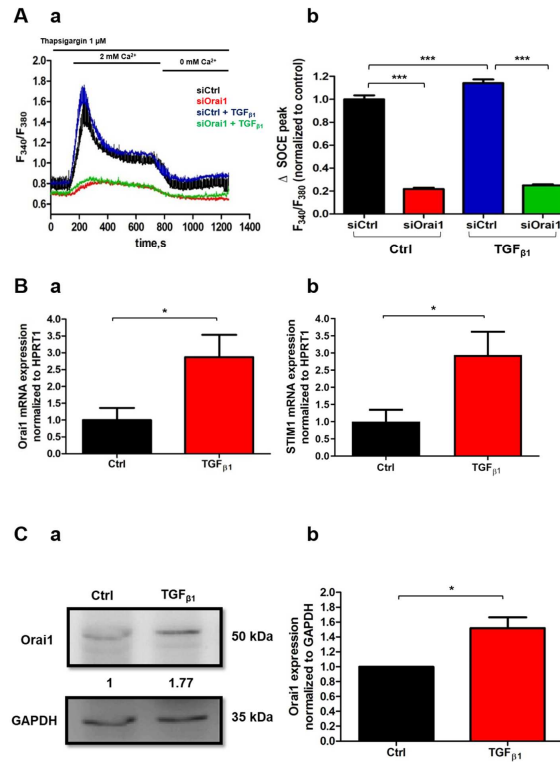


Figure 5. TGF_{β1} enhances Orai1-mediated Ca²⁺ entry and increases both Orai1 mRNA and protein expression. **(A)** TGF_{β1} (5 ng/mL) perfusion was applied to investigate the effect of TGF_{β1} on Orai1 activity. siCtrl and siOrai1 72 h-transfected cells were pre-treated for 5 min with 1 μM of Thapsigargin before use for SOCE measurements in Ca²⁺ - imaging. Illustrative traces of SOCE measurements **(Aa)** and the quantification of perfused and non-perfused siCtrl and siOrai1 transfected cells (siCtrl: n = 133, siCtrl + TGF_{β1}: n = 163, siOrai1: n = 102, siOrai1 + TGF_{β1}: n = 122, N = 3, *** p < 0.001, one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test, n: number of cells, N: number of passages, **(Ab)**). All values were normalized to siCtrl non-treated with TGF_{β1} condition and reported as mean ± SEM. **(B,C)** Impact of 48 h TGF_{β1} treatment (20 ng/mL) in the presence of low-FBS conditions (1%) on Orai1 and STIM1 **(B)** mRNA and Orai1 protein expression **(C)**. Quantification of Orai1 **(Ba)** and STIM1 **(Bb)** mRNA transcripts 48 h post-TGF_{β1} treatment (* p < 0.05, N = 3, Student t-test) **(B)**. Representative Western blot showing the effect of TGF_{β1} treatment on Orai1 expression **(Ca)** with the quantification **(Cb)** (* p < 0.05, N = 3, Student t-test). All values were first normalized to the referent protein GAPDH and then to the control condition, reported as mean ± SEM.

2.6. TGF_{β1} Enhances Orai1/AKT-Dependent Proliferation Through an Autocrine Positive Feedback Loop in Human-Activated PSCs

We thereafter wondered whether TGF_{β1} could also be involved in the promotion of the Orai1/AKT-dependent proliferation. Indeed, TGF_{β1} is known to have a dual role in cell proliferation, since according to the cell type, it can induce an inhibition or stimulation of cell proliferation. Furthermore, it has been shown to enhance the hepatic stellate cell's proliferation, known as counterparts of PSCs [34]. However, its role in PSC proliferation and proliferation-related signaling pathways remains little know. We hence started by assessing the impact of TGF_{β1} on Orai1-mediated AKT activation after inhibiting Orai1 expression. For that, we FBS-starved siCtrl and siOrai1 cells overnight and then stimulated

them 30 min with TGF β ₁ (Figure 6(Aa,Ab)). As expected, TGF β ₁ stimulation increased by 1.68 ± 0.23 -fold (N = 4, $p < 0.05$, Figure 6(Ab)) the AKT phosphorylation in the siCtrl cells compared to the no-stimulated siCtrl cells. Moreover, we revealed a 42.37% decrease in AKT activation in siOrai1 (0.97 ± 0.18 -fold) compared to siCtrl stimulated with TGF β ₁ cells (N = 4, $p < 0.05$, Figure 6(Ab)), whereas no significant effect was observed in siOrai1 stimulated and no-stimulated with TGF β ₁ cells. These results inferred the involvement of TGF β ₁ in the stimulation of Orai1-mediated AKT phosphorylation.

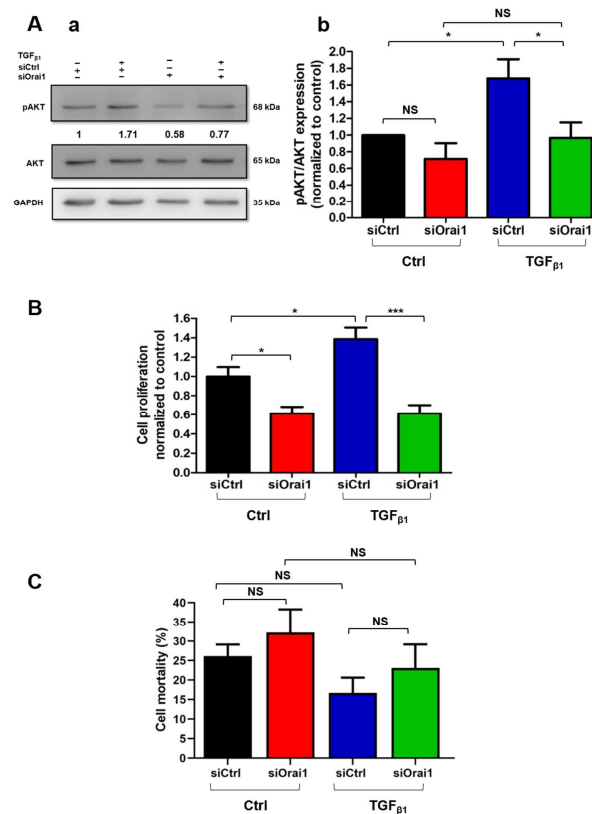


Figure 6. TGF β ₁ promotes Orai1 / AKT-dependent proliferation through an autocrine positive feedback loop in human-activated PSCs. (A) TGF β ₁ stimulation decreased AKT phosphorylation in Orai1 knocked-down cells. Orai1 knocked-down cells were FBS-starved overnight and then stimulated 30 min with TGF β ₁, 72 h post-transfection. Representative Western blot of TGF β ₁ stimulation on Orai1 knocked-down mediated AKT activation (Aa) and the quantification (* $p < 0.05$, at least N = 3, two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, (Ab)). All values were first normalized to the referent protein GAPDH and then to siCtrl non-treated with TGF β ₁ condition and reported as mean \pm SEM. (B,C) Involvement of TGF β ₁ in PS-1 cell proliferation and survival. Transfected cells were treated 48 h with TGF β ₁ (20 ng/mL) within an FBS-free medium, and the proliferation rate, as well as the mortality rate, were evaluated by Trypan blue assay, 72 h post-transfection (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, NS, N = 3, one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests). All values were normalized to siCtrl non-treated with TGF β ₁ condition and reported as mean \pm SEM. Cell mortality was calculated using the formula: % of cell death = number of dead cells/number of total cells, reported as mean \pm SEM for each condition.

Therefore, we wanted to evaluate if $TGF_{\beta 1}$ promotion of Orai1-mediated AKT activation regulates PS-1 cell proliferation or survival. After treating siCtrl and siOrai1 transfected cells 48 h with $TGF_{\beta 1}$, we found that $TGF_{\beta 1}$ enhanced by 38.55% the cell proliferation of siCtrl cells compared to the non-treated ones ($N = 3, p < 0.05$, Figure 6B). In addition, $TGF_{\beta 1}$ treatment did not reveal any effect on the proliferation rate of siOrai1 cells compared to the non-treated siOrai1 cells (siCtrl: $100 \pm 9.63\%$, siCtrl + $TGF_{\beta 1}$: $138.55 \pm 11.91\%$, siOrai1: $61.45 \pm 6.85\%$, siOrai1 + $TGF_{\beta 1}$: 61.45 ± 8.81 , $N = 3, p > 0.05$, Figure 6B). Simultaneously, the Trypan blue colorimetric assay showed the no involvement of $TGF_{\beta 1}$ in PS-1's cell mortality and so in cell survival (siCtrl: $26.18 \pm 2.97\%$, siCtrl + $TGF_{\beta 1}$: $16.70 \pm 3.92\%$, siOrai1: $32.22 \pm 6.05\%$, siOrai1 + $TGF_{\beta 1}$: 23.11 ± 6.07 , $N = 3, p > 0.05$, Figure 6C). It should be noted that the impact of $TGF_{\beta 1}$ on these two cellular processes was investigated under 0% FBS conditions since the 1% FBS was still preventing its action on cell proliferation and survival. Hence, 0% FBS conditions induced an elevation of the basal cell death.

$TGF_{\beta 1}$ is also known to be an important profibrotic factor due to its ability to regulate α SMA expression, the main activation marker of PSCs [15]. Furthermore, it has been shown that ion channels, particularly TRPC6, can regulate α SMA expression as well, in human-activated hepatic stellate cells, counterparts of PSCs [39], and human intestinal myofibroblasts [40]. In these later, TRPC6 interacts with α SMA, too, to form a protein complex. According to these data, we hypothesized that Orai1 could modulate α SMA expression or form a complex with it. However, Orai1 silencing failed to induce any significant decrease in α SMA protein expression ($p > 0.05$, $N = 3$, Figure S5(Aa,Ab)), and neither to interact with α SMA ($N = 3$, Figure S5(Ba,Bb)). To confirm these findings, we next investigated whether Orai1-mediated $TGF_{\beta 1}$ expression and secretion might be involved in the regulation of α SMA expression. We thereby treated siCtrl and siOrai1 transfected cells 48h with $TGF_{\beta 1}$, in the presence of low-FBS conditions. As expected, $TGF_{\beta 1}$ treatment of siCtrl cells induced a 3.82 ± 0.54 -fold increase in α SMA expression, as quantified by Western blotting, compared to siCtrl non-treated cells ($p < 0.05$, $N = 4$, Figure S5(Ca,Cb)). However, treatment of siOrai1 transfected cells with $TGF_{\beta 1}$ did not reveal any significant difference in α SMA expression compared to the siCtrl $TGF_{\beta 1}$ treated cells ($p > 0.05$, $N = 4$, Figure S5(Ca,Cb)), indicating that Orai1-induced $TGF_{\beta 1}$ expression and secretion is not implicated in the modulation of α SMA expression.

Based on these data, we can conclude that $TGF_{\beta 1}$ is involved in an autocrine positive feedback loop by the promotion of Orai1-dependent AKT phosphorylation, leading to PS-1 cell proliferation enhancement through the stimulation of Orai1-mediated Ca^{2+} entry and the increase in Orai1 mRNA and protein expression.

2.7. Ca^{2+} Entry Through Orai1 Regulates AKT-Dependent Proliferation and $TGF_{\beta 1}$ Secretion in PS-1 Human-Activated PSCs

It is well known that most of the signaling pathways are regulated by the Ca^{2+} second messenger. Moreover, it has been demonstrated that Ca^{2+} modulates a myriad of biological processes, including cell proliferation or cytokine secretion [41,42]. To determine whether Ca^{2+} and, more specifically, Ca^{2+} entry through Orai1 regulates AKT activation, as well as Orai1/AKT-dependent proliferation and $TGF_{\beta 1}$ secretion in PS-1 cells, we reduced the physiological extracellular Ca^{2+} concentration. We started by evaluating the impact of extracellular Ca^{2+} modification on AKT phosphorylation after overnight FBS starvation of PS-1 non-treated cells. As expected, 30 min treatment with low Ca^{2+} -conditions (0.1 mM Ca^{2+}) led to 65.60% decrease in AKT activation, compared to the physiological Ca^{2+} -conditions (1.4 mM Ca^{2+}) ($N = 3, p < 0.05$, Figure 7(Aa,Ab)).

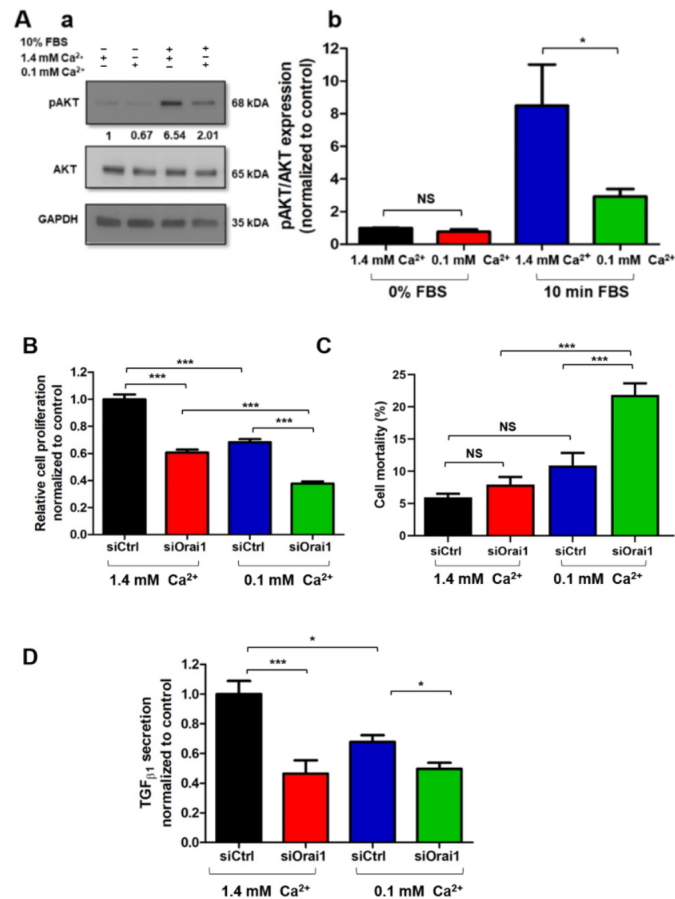


Figure 7. Ca²⁺ entry through Orai1 regulates AKT-dependent proliferation and TGF_{β1} secretion in PS-1 human-activated PSCs. (A) Effect of extracellular Ca²⁺ decrease on AKT activation, 72 h post-proliferation, after overnight FBS starvation of no transfected cells. Then PS-1 cells were pre-treated for 30 min with 1.3 mM EGTA in order to reduce the extracellular Ca²⁺ concentration (0.1 mM Ca²⁺), with (+) and without (-) 10 min of 10% FBS stimulation. Representative Western blot of low extracellular Ca²⁺ concentration impact on AKT phosphorylation (Aa). AKT activation was evaluated as described previously, by the ratio of phosphorylated AKT form/total AKT protein (1.4 mM Ca²⁺ + 10 min FBS: 8.5 ± 2.52-fold, 0.1 mM Ca²⁺ + 10 min FBS: 2.92 ± 0.46-fold, N = 3, * p < 0.05, NS, two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, (Ab). Values were first normalized to the referent protein GAPDH and then to the 0% FBS + 1.4 mM Ca²⁺ condition, reported as mean ± SEM. (B) Evaluation of siOrai1 transfected PS-1 cells' proliferation after 72 h of 1.3 mM EGTA treatment by MTT assay. (C) Impact of Orai1 knocked-down cells, treated with low Ca²⁺ condition, on cell survival, assessed by Trypan blue assay. Cell mortality was calculated using the formula: % of cell death = number of dead cells/number of total cells, reported as mean ± SEM for each condition. (D) Similarly, TGF_{β1} secretion was measured in Orai1 knocked-down PS-1 cells, in the presence of low-Ca²⁺ conditions, by ELISA assay. All values were normalized to 1.4 mM Ca²⁺ control condition (except for the mortality rate) and reported as mean ± SEM (*** p < 0.001, * p < 0.05, NS, N = 3, one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test).

We thereafter wanted to establish whether Orai1-mediated Ca^{2+} entry is involved in the modulation of PS-1 cell proliferation and $\text{TGF}\beta_1$ secretion. We thus incubated siCtrl and siOrai1 transfected cells for 72 h with low and physiological Ca^{2+} -conditions. Interestingly, we noticed a more important effect on the proliferation rate of siOrai1 cells treated with low Ca^{2+} -conditions compared to the ones in physiological Ca^{2+} -conditions (siCtrl 1.4 mM Ca^{2+} : $100 \pm 3.45\%$, siCtrl 0.1 mM Ca^{2+} : $68.29 \pm 2.27\%$, siOrai1 1.4 mM Ca^{2+} : $60.58 \pm 2.19\%$, siOrai1 0.1 mM Ca^{2+} : 37.69 ± 1.59 , $N = 3$, $p < 0.001$, Figure 7B). We could explain this result, in part, by the increased mortality, due to the low Ca^{2+} -conditions in the siOrai1 transfected cells, quantified by Trypan blue colorimetric assay (siCtrl 1.4 mM Ca^{2+} : $5.97 \pm 0.55\%$, siCtrl 0.1 mM Ca^{2+} : $10.91 \pm 1.93\%$, siOrai1 1.4 mM Ca^{2+} : $7.93 \pm 1.18\%$, siOrai1 0.1 mM Ca^{2+} : 21.84 ± 1.83 , $N = 3$, $p < 0.001$, Figure 7C). Moreover, $\text{TGF}\beta_1$ secretion remained similar, between Orai1 knocked-down cells treated with low Ca^{2+} -conditions and with physiological Ca^{2+} -conditions (siCtrl 1.4 mM Ca^{2+} : $100 \pm 8.77\%$, siCtrl 0.1 mM Ca^{2+} : $67.79 \pm 4.43\%$, siOrai1 1.4 mM Ca^{2+} : $46.43 \pm 8.91\%$, siOrai1 0.1 mM Ca^{2+} : $49.66 \pm 3.96\%$, $N = 3$, $p > 0.05$, Figure 7D).

Together, these data suggested that Ca^{2+} entry through Orai1 mediates AKT activation in order to regulate PS-1 cell proliferation and $\text{TGF}\beta_1$ secretion.

3. Discussion

Since, Won et al. first characterized the Ca^{2+} signaling events present in PSCs in 2011, relatively few reports have continued to investigate the importance of Ca^{2+} and Ca^{2+} channels in PSC activation hallmarks [22]. While it is well known that PSC activation mediates pancreatic tumor's desmoplastic reaction, this study is one of the first pieces of evidence showing the functional expression and role of the Orai1- Ca^{2+} channel in human PSCs' activation processes. We demonstrated, for the first time, that Ca^{2+} entry through the Orai1 channel promotes activated PSC proliferation by controlling cell cycle progression in G0/G1 phase, as well as G1/S transition and $\text{TGF}\beta_1$ secretion, via the activation of the AKT signaling pathway. Moreover, we found that $\text{TGF}\beta_1$ enhances PSC proliferation via an autocrine positive feedback loop, which involves $\text{TGF}\beta_1$ mediated Orai1-dependent AKT activation through the increase of Orai1 expression.

Whereas there is a very limited number of studies focusing on the importance of Orai1-CRAC channels in pancreatic cancer, we have previously demonstrated the functional expression of Orai1 in several pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines [43]. However, the Orai1-CRAC channel has only recently been identified in PSCs [24,25]. CRAC channels were initially discovered in mouse quiescent PSCs by Gryshchenko et al., using the 2APB and GSK-7975A SOC pharmacological inhibitors, where they have shown that SOCs mediate bradykinin-elicited Ca^{2+} signals [24]. The same authors have then investigated the effect of GSK-7975A inhibitor in mouse activated PSCs in acute pancreatitis conditions, which seemed to prevent the increased responsiveness of PSCs to trypsin, known to be involved in PSC activation [24]. A year later, Waldron et al. have highlighted the presence of CRAC channels in mouse immortalized activated PSC cell line by demonstrating a marked expression of Orai1 and STIM1, the key actors of SOCs [25]. Our study strengthened these data by using a more specific approach leading to Orai1 protein silencing by siRNA transfection, showing Orai1 channel involvement in SOCE but also in the regulation of the Ca^{2+} basal concentration in human-activated PSCs. Nevertheless, there is no direct evidence of Orai1 function in PSC activation hallmarks so far.

Our results demonstrated an essential role of Orai1-mediated Ca^{2+} entry in the regulation of human-activated PSC proliferation, known to be involved in fibrotic desmoplasia development. The relationship between Ca^{2+} entry through the SOCs and cell proliferation has been demonstrated for a long time in many cell types, such as neural progenitor cells, osteoblasts, kidney cells, endothelial cells, and cancer cells, but not in PSCs [41,44–47]. Indeed, a decrease in SOCE amplitude is related to cell cycle arrest [48–50]. However, although the involvement of the Orai1 channel in cell proliferation is well established, most of the research evidence has shown that Orai1 mediates the G2/S phase of the cell cycle,

especially in cancer cells [51–54]. Nevertheless, some other studies have proven that Orai1 can control G1/S transition in several cell types by downregulating the Cyclin E-CDK2 complex, known to be involved in this cell cycle phase transition, but not necessarily the G2/M transition [55]. These findings are in agreement with our data, showing that the knocking down of Orai1 in activated PSCs induced a cell number accumulation in G0/G1 phase and thus a decrease in G1/S transition, without affecting the G2/M phase.

Activated PSCs are also characterized by their ability to produce and secrete a variety of cytokines and growth factors, such as $TGF_{\beta 1}$, leading to the perpetuated activation of PSCs but also participating in the permanent dialogue with the pancreatic cancer cells [5]. Although the implication of Orai1-mediated Ca^{2+} entry has been well illustrated in immune cell's cytokine production and secretion, some other studies showed the involvement of Orai1 in cytokine synthesis in bronchial cells, spinal astrocytes, and microglia [42,56,57]. However, the first study of Orai1-mediated Ca^{2+} entry involvement in fibro-inflammatory gene expression in activated PSCs emerged only in 2019. In this report, the researchers used the SOCE inhibitor CM4620 (≥ 10 -fold selectivity for Orai1 vs. Orai2), providing novel data on SOCE mediated fibro-inflammatory gene expression, including $TGF_{\beta 1}$, within mouse activated PSCs, after lipopolysaccharide (LPS) stimulation [25]. This later is known to induce Orai1-mediated SOCE and cytokine production in mesenchymal cells. In agreement with these data, we demonstrated in the current work that Ca^{2+} entry through Orai1 mediates $TGF_{\beta 1}$ expression and secretion, the main profibrotic cytokine implicated in the desmoplastic reaction, in human-activated PSCs.

Furthermore, PSCs' activation and cell functions are under the control of multiple signaling pathways and molecules, entraining dynamic cellular modifications [18]. One of the key intracellular pathways shown to be crucially involved in the regulation of PSC activation processes is the PI3K/AKT pathway [31]. Indeed, AKT is a serine-threonine kinase, initiator of PI3K cascade, described to play an important role in the development of pancreatic fibrosis by modulating PSC proliferation, migration, collagen production as well as growth factors and cytokine secretion [58–60]. Schwer et al. have reported that inhibition of the AKT pathway, using carbon monoxide releasing molecule-2, disrupted PSC activation by inducing a translational inhibition. This phenomenon caused inhibition of PSC proliferation due to the down-regulation of cyclin D1 and E protein expression and the interruption of G1/S cell phase progression [20]. In addition, Zhang et al. have shown that reduction in AKT activity by the tumor suppressor PTEN led to cyclin D1 down-regulation and inhibition of cell proliferation in human and rodent activated PSCs [21].

Moreover, according to the literature, AKT pathway activation requires Ca^{2+} influx. It has been demonstrated that Ca^{2+} entry through Orai1 induces AKT phosphorylation in order to stimulate cell proliferation in several cell types, such as esophageal squamous cancer cells, colorectal and non-small lung cancer cells [46,61,62]. Furthermore, it has recently been established that Orai1 inhibition, using the RP4010 CRAC channel inhibitor, decreased pancreatic cancer cell proliferation through the down-regulation of the AKT/mTOR signaling pathway [63]. However, we were the first to illustrate activation of the AKT pathway via Orai1-mediated Ca^{2+} entry resulting in cell proliferation enhancement in human-activated PSCs. In our study, on the one hand, Orai1 silencing decreased AKT phosphorylation without affecting ERK1/2 and SMAD2 activation, which are two of the main pathways modulating PSC activation. On the other hand, low extracellular Ca^{2+} concentration led to an inhibition of AKT phosphorylation and PSC proliferation, suggesting that Orai1-mediated Ca^{2+} entry is indispensable for AKT activation in order to stimulate PSC proliferation. This data, on the primordial role of the AKT pathway in the regulation of PSC proliferation, was also confirmed using the known PI3K/AKT pharmacological inhibitor LY294002.

However, the high mitotic index of activated PSCs alone is insufficient to induce pancreatic fibrogenesis during chronic pancreatitis and pancreatic cancer, leading to dense fibrotic desmoplasia development. To date, the most potent fibrogenic factor involved in PSC-mediated fibrosis, as well as in the interaction with the pancreatic cancer cells, is the

TGF β_1 . This pleiotropic cytokine promotes PSC activation by regulating α -SMA expression, type I collagen synthesis, and cell proliferation in an autocrine manner. Indeed, in turn, activated PSCs trigger TGF β_1 auto-synthesis to maintain their activation. Ohnishi et al. have reported that TGF β_1 expression and secretion are mediated through the activation of the ERK1/2 pathway in rat-activated PSCs [32,64]. In contrast, TGF β_1 mRNA and protein expression are regulated by the PI3K/AKT pathway in human-activated hepatic stellate cells, counterparts of PSCs, which is in line with our findings in human-activated PSCs [34]. We have shown that PSC treatment with LY294002 significantly decreases TGF β_1 mRNA expression and secretion, suggesting that TGF β_1 synthesis and secretion in human-activated PSCs is AKT-dependent. Interspecies differences could explain TGF β_1 synthesis and secretion-dependent pathway discordance between rat and human-activated PSCs. Besides AKT-dependent TGF β_1 secretion, we have demonstrated that Ca $^{2+}$ is essential for this process since extracellular Ca $^{2+}$ reduction led to decreased-TGF β_1 secretion. In addition, we proposed in this study a mechanism by which Ca $^{2+}$ influx through Orai1 regulates TGF β_1 secretion via an AKT-dependent pathway. When we inhibited Orai1 expression under low extracellular Ca $^{2+}$ concentrations, we did not observe any additional effect on TGF β_1 secretion compared to Orai1 knocked-down cells under physiological extracellular Ca $^{2+}$ concentrations. These findings suggested that Ca $^{2+}$ entry through Orai1 induces AKT phosphorylation to promote TGF β_1 secretion in human-activated PSCs.

The most interesting finding in this report is the identification of a TGF β_1 -mediated autocrine positive feedback loop, promoting PSC Orai1/AKT-dependent proliferation through Orai1 activity and expression increase, leading to a perpetuated PSC activation. A link between TGF β_1 and Orai1 has previously been reported in airway smooth muscle cells, showing a SOCE stimulation due to Orai1 mRNA expression increase, promoted by TGF β_1 long-term exposure [65]. Following these findings, we were the first to illustrate that TGF β_1 treatment induced a rise of Orai1 mRNA and protein amounts in human-activated PSCs, leading to Orai1-mediated Ca $^{2+}$ entry promotion. Indeed, the TGF β_1 effect on Orai1 activity was observed only by TGF β_1 perfusion in our cellular model. Furthermore, several studies have demonstrated a stimulatory role of TGF β_1 on Ca $^{2+}$ entry in a context-dependent manner. For example, TGF β_1 long- but not short-term treatment has been shown to increase voltage-operated channel-mediated Ca $^{2+}$ entry in hepatic stellate cells [66], whereas TGF β_1 short treatment was sufficient to promote Ca $^{2+}$ influx through TRPC6 in intestinal myofibroblasts [40]. Additionally, TGF β_1 perfusion raised Ca $^{2+}$ release from the endoplasmic reticulum and so the SOCE in pancreatic cancer cells, suggesting its crucial involvement in pancreatic cancer as well [38]. Furthermore, we have provided evidence that TGF β_1 -mediated Orai1-Ca $^{2+}$ entry and expression stimulate Orai1/AKT activation and proliferation. Cell treatment with exogenous TGF β_1 increased AKT phosphorylation in siCtrl transfected cells, while this rise of AKT activity was partially absent in Orai1-knocked-down cells under TGF β_1 treatment. It has already been established by Tsang et al. that TGF β_1 can activate the AKT pathway by increasing its phosphorylation in rat-activated PSCs [67], and these data were confirmed here in human-activated PSCs. Moreover, we have reported a role of TGF β_1 in the promotion of PSC proliferation through Orai1-mediated AKT activation. Indeed, PSC proliferation increased after TGF β_1 treatment compared to non-treated cells, while Orai1 silencing abolished the stimulatory effect of TGF β_1 on PSC proliferation. Unlike our results, most of the studies conducted on PSCs have shown an inhibitory effect of TGF β_1 on PSC proliferation. These reports have been realized on rat-activated PSCs, demonstrating that TGF β_1 inhibits PSC proliferation through a Smad3-dependent pathway and by an accumulation of the G1 phase inhibitors p21 and p27, inducing G0/G1 cell cycle arrest [68]. TGF β_1 has been shown to induce both growth promotion and inhibition within the same cell type, depending on the context but also on the abundance or activity of extracellular TGF β_1 ligands, which could partly explain TGF β_1 promoted proliferation in our human-activated PSCs [13,69,70]. Elsner et al. have reported an indirect stimulatory effect of TGF β_1 on rat-activated PSC proliferation through the AKT pathway, using the multi-kinase inhibitor sorafenib [71]. TGF β_1 has been

shown to regulate cell growth through a Smad-dependent and Smad-independent pathway. The latter consisted of AKT activation [17]. Indeed, it has been reported that $TGF_{\beta 1}$ -induced AKT phosphorylation inhibits Smad3-mediated growth inhibition by binding to and sequestering Smad3 in the cytosol, leading to growth promotion, a mechanism that could justify our present results [72,73].

4. Conclusions

Taken together, this is the first study revealing the important role of the Orai1 channel in PSC physiology, suggesting a role in fibrotic desmoplasia development, the main feature of PDAC. We suggest in this report that Orai1 can be involved in maintaining PSC activation to perpetuate pancreatic fibrosis by promoting PSC proliferation and $TGF_{\beta 1}$ expression and secretion through an AKT-dependent pathway. More importantly, we show that secreted $TGF_{\beta 1}$ from activated PSCs induces an autocrine positive feedback loop by stimulating Orai1-mediated Ca^{2+} entry and increasing Orai1 expression. This later results in the promotion of Orai1-dependent AKT phosphorylation and thus to PSC proliferation enhancement to exacerbate pancreatic fibrosis development (Figure 8). Therefore, compounds that inhibit PSC proliferation by targeting Orai1 activity directly or the downstream effectors by inhibiting PI3K/AKT pathway or $TGF_{\beta 1}$ synthesis and/or secretion may have the potential to become a new approach for PDAC treatment or limit the drug resistance.

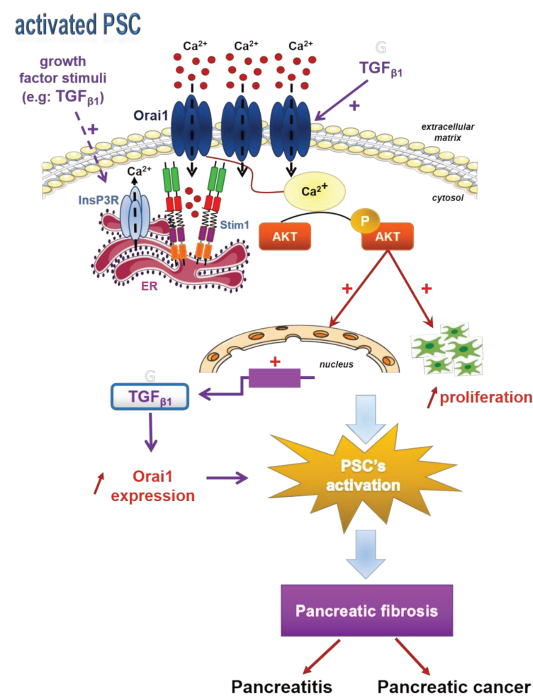


Figure 8. Conclusive scheme: Endoplasmic reticulum Ca^{2+} store depletion activates Orai1 channel permitting SOCE. Ca^{2+} entry through Orai1 activates AKT phosphorylation, which stimulates human-activated PSC proliferation and $TGF_{\beta 1}$ expression and secretion, enhancing PSC activation to promote pancreatic fibrosis, and so pancreatitis and pancreatic cancer. In turn, $TGF_{\beta 1}$ secretion stimulates Orai1-mediated Ca^{2+} entry by simultaneously increasing Orai1 mRNA and protein expression in order to stimulate Orai1/AKT-dependent proliferation, maintaining PSC activation.

5. Materials and Methods

5.1. Cell Culture

The PS-1 pancreatic human stellate cell line was generously given by Pr Hemant M. Kocher from the Queen Mary University of London. PS-1 cells were isolated from a healthy donated human pancreas and immortalized with retroviruses containing cDNA encoding human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and selected with puromycin, as previously described [74]. RLT PSCs were established from a chronic pancreatic tissue resection and immortalized with SV40 large T antigen and the catalytic subunit of hTERT, as previously described [75]. PS-1 and RLT PSCs were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco, Thermo Fischer Scientific, Illkirch, France) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Pan Biotech, Dominique Dutscher, Brumath, France). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, and the cell culture medium was changed every 48 h.

5.2. Cell Transfection and RNA Interference

Cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) by electroporation, using the nucleofection technology (Amaxa Biosystems, Lonza, Aubergenville, France). PS-1 and RLT cells (10⁶) were transiently nucleofected according to the manufacturer's protocol with 4 µg of scrambled siRNA as a control (siCtrl: duplex negative control, Eurogentec) or with siRNA directed against Orai1 (siOrai1: 5'-CGUGCACAAUCUCAACUCG-3', Eurogentec). All the experiments were performed 72 h after the siRNA transfection.

5.3. Chemicals and Reagents

Pharmacological inhibitors and cytokines used to study the signaling pathways were the following: LY-294002 (20 µM, 72 h, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France), and transforming growth factor-β₁ human (20 ng/mL for 48 h treatment and 30 min stimulation, 5 ng/mL for perfusion, Sigma-Aldrich). The chemical ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA, 1.3 mM, 72 h treatment and 30 min stimulation, Sigma-Aldrich) was used to chelate extracellular Ca²⁺. The optimal EGTA concentration in order to reach 0.1 mM of extracellular Ca²⁺ was determined using the max-chelator software (<https://somapp.ucdmc.ucdavis.edu/pharmacology/bers/maxchelator/CaMgATPEGTA-TS.htm>, accessed on 10 October 2019)

5.4. Cell Proliferation Assay

PS-1 and RLT cells were seeded in 6-well plates (8 × 10⁴ cells per well for PS-1, 6 × 10⁴ cells per well for RLT), and cell proliferation was assessed 72 h after siRNA transfection or treatment with pharmacological inhibitors or TGFβ₁ cytokine, as described above, by MTT assay. Cells were incubated with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Inc.) solubilized in culture medium (0.5 mg/mL), for 45 min at 37 °C in the dark, to be converted to an insoluble formazan. To dissolve the formazan crystals, the culture medium was replaced by dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Inc.), and the absorbance was measured at 550 nm using an Infinite[®] 200 Pro reader (Tecan Trading AG, Männedorf, Switzerland).

5.5. Cell Cycle Analysis

DNA cellular content quantitation by flow cytometry was used for cell cycle evaluation. Cells transfected (1 × 10⁶) with siOrai1 or siCtrl, were firstly fixed with cold absolute ethanol (≥99.8%, Sigma-Aldrich) for at least 6 h at 4 °C. Then, cells were pelleted, resuspended in PBS-5 mM EDTA, treated with 20 mg/mL RNaseA (Sigma-Aldrich) for 30 min at ambient temperature, and stained with 50 mg/mL of propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Samples were then analyzed by flow cytometer (Accuri[®], Dominique Dutscher, Brumath, France), and the cell percentage in different phases was calculated using Cyflogic software.

5.6. Cell Mortality

PS-1 cells were grown in 35 mm Petri-dishes at a density of 8×10^4 cells, and RLT cells at a density of 6×10^4 , for 72 h, after siRNA transfection, and then cell death was measured by trypan blue assay. Cells were removed by trypsinization, diluted in trypan blue solution (Sigma-Aldrich), and counted six times using the standard Malassez cell method. The number of cell mortality was obtained using the formula: rate of cell death = number of dead cells/number of total cells, normalized to control. This colorimetric assay also provided us the number of cell proliferation, obtained using the formula: rate of cell proliferation = number of alive cells * 4 * 1900, normalized to control.

5.7. Apoptosis Analysis

The apoptosis process was assessed by studying the cell surface of phosphatidylserine exposure on the outer leaflet of the plasma membrane, an early marker of apoptotic cell death. Both detached and adherent cells were collected, washed twice in ice-cold PBS, and resuspended in $1 \times$ binding buffer (BD Biosciences Pharmingen, Le Pont de Claix, France). Apoptotic cells were determined using a PE Annexin V Apoptosis Detection Kit staining (BD Biosciences Pharmingen), which consisted of adding FITC Annexin V and propidium iodide (PI) to the cell preparations and incubating them for 15 min at 25 °C in the dark. Binding buffer was then added to each tube, and the samples were analyzed by a flow cytometer (Accuri®). Compensation and quadrants were set up using the following controls: unstained cells, cells stained only with FITC Annexin V, and cells stained only with PI.

5.8. Calcium Imaging

Store-operated calcium entry (SOCE) was measured by calcium imaging using the ratiometric probe Fura-2/AM. Transfected cells (8×10^4 for PS-1 and 6×10^4 for RLT) were plated on glass coverslips in 35 mm Petri-dishes and loaded with 3 μ M Fura-2/AM (Sigma-Aldrich) in extracellular saline solution for 45 min at 37 °C before Ca^{2+} measurement. After Fura-2 incubation, cells were washed three times and kept in the extracellular saline solution containing 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 5 mM glucose, 2 mM CaCl_2 , and 1 mM MgCl_2 , at pH 7.4. The coverslip was transferred onto a perfusion chamber on a Zeiss microscope equipped for fluorescence. Fura-2 fluorescence was excited alternatively at 340 and 380 nm using a monochromator (polychrome IV, TILL Photonics, Planegg, Germany) and captured by a Cool SNAPHQ camera (Princeton Instruments, Evry, France) after filtration through a long-pass filter (510 nm emission wavelength). Signal acquisition and analysis were obtained with Metafluor software (version 7.1.7.0, Molecular Devices, St. Grégoire, France). The intracellular Ca^{2+} concentration was derived from the ratio of the fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths (F_{340}/F_{380}). Cells were continuously perfused with the saline solution, and all recordings were performed at room temperature. SOCE was induced after 1 μ M Thapsigargin (Sigma-Aldrich) stimulation in Ca^{2+} -free solution for 11 min, followed by 2 mM Ca^{2+} perfusion for 10 min. The flow rate of the whole-cell chamber perfusion system was set to 1 mL/min, and the chamber volume was 700 μ L.

5.9. qRT-PCR

Total cellular RNA was extracted by the standard Trizol reagent (Sigma-Aldrich) method, and RNA concentration and purity were determined by using a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Wilmington, NC, USA). Then, cDNA was synthesized with a MultiScribe™ Reverse Transcriptase kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) from 2 μ g of RNA. For the real-time PCR, sense, and antisense PCR primers specific to Orai1 (forward 5'-AGGTGATGAGCCTCAACGAG-3' and reverse 5'-CTGATCATGAGCGCAAACAG-3'), $\text{TGF}\beta_1$ (forward 5'-ACATCAACGCAGGGTTCCT-3' and reverse 5'-GAAGTTGGCATGGTAGCCCT-3'), and HPRT1 (forward 5'-AGTTCTGTGGCCATCTGCCT-3' and reverse 5'-CAATCCGCCAAAGGGAAGT-3') were used. Real-time PCR was performed on a

LightCycler System (Roche, Basel, Switzerland) using LightCycler 480 SYBR Green I PCR master mix (Life Science, Roche). Orai1 and TGF β ₁ mRNA expression were normalized to the endogenous gene control (HPRT1) and compared to the siCtrl sample, using the Pfaffl method [76].

5.10. TGF β ₁ Dosage Assay

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay kit for TGF β ₁ quantitative measurement from cell culture supernatant was realized according to the technical protocol provided by the supplier (Sigma-Aldrich). All samples dosed for TGF β ₁ were treated 10 min with 1 N HCl at room temperature to activate latent TGF β ₁ to the immunoreactive form and then neutralized with 1.2 N NaOH/0.5 N HEPES. The absorbance from the colorimetric reaction corresponding to the TGF β ₁ quantity contained in the supernatant was read at 450 nm.

5.11. Western Blotting and Co-Immunoprecipitation

Cells were lysed in RIPA buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 10 mM PO₄Na₂/K, pH = 7.4) containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), 5 mM sodium orthovanadate and 2 mM EDTA. Protein concentration was determined by the Bicinchoninic Acid protein assay (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France). For standard Western blotting, 30 μ g of denatured protein lysate from each sample was loaded in SDS-PAGE, separated by the denaturing SDS-PAGE, and transferred onto a nitrocellulose membrane (Dominique Dutscher, Brumath, France). The primary antibodies used were: anti-Orai1 (1:250, Sigma-Aldrich), anti- α SMA (1:1000, Abcam), anti-GAPDH (1:4000, Abcam), anti-SMAD2 (1:1000, Abcam), anti-p-SMAD2 (phospho S255) (1:1000, Abcam), anti-ERK1/2 (1:500, Cell Signaling), anti-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:500, Cell Signaling), anti-Akt (1:500, Cell Signaling) and anti-p-Akt (Ser473) (1:500, Cell Signaling). The secondary antibodies used were coupled to horseradish peroxidase, which permitted protein band detection through an enhanced chemiluminescence kit (Ozyme). Protein bands were quantified using the densitometric analysis option in the Bio-Rad image acquisition software (Quantity One), and all experiments results were normalized to the GAPDH, used as a control referent protein.

Co-immunoprecipitation experiments were realized with 500 μ g of protein lysates, precleared for 1 h 30 with proteins A sepharose magnetic beads (Millipore, PureProteome™) and then incubated overnight with the primary antibody. The dilution of primary antibodies used for the co-immunoprecipitation experiments was anti-Orai1 1:100 (Sigma-Aldrich) and anti- α SMA 1:200 (Abcam). Then, the antigen-antibody complex was precipitated with protein A sepharose magnetic beads (Millipore, PureProteome™) for 1 h. After denaturation, proteins were used for a standard Western blot, as described above.

5.12. Statistical Analysis

All data are presented as mean \pm SEM (standard error of the mean), n corresponds to the number of cells, and N refers to the number of cell passages. All experiments were performed at least with three different cell passages. Statistically significant differences were determined with paired or unpaired *t*-test or with one-way or two-way ANOVA and post hoc Bonferroni test for multiple comparisons, depending on the compared conditions, using GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences between the values were considered significant when $p < 0.05$. The p -values < 0.05 , < 0.01 , and < 0.001 are represented as *, **, and ***, respectively.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers13102395/s1>, Figure S1: (A) Localization of Orai1 channel in PS-1 visualized by confocal microscopy, 72h post-proliferation. (B) Orai1 channel mediates the Ca²⁺ basal concentration in both, PS-1 and RLT human activated PSC cell lines. (C) SOCs channels are opened in cell culture conditions due to the permanent ER-Ca²⁺ depletion induced by FBS. Figure S3: Orai1 knocking-down impacts SMAD2 total protein expression without affecting AKT and ERK1/2 in PS-1 human activated PSCs, Figure S4: Orai1 modulates AKT activation but not ERK1/2 nor SMAD2 phosphorylation in RLT

human activated PSCs, without affecting their total protein amount. Figure S5: Orai1 channel neither regulates α SMA expression nor colocalizes with α SMA in human activated PSCs.

Author Contributions: S.R.: experiment's performance (cell culture, treatments, cell proliferation, and mortality, cytometry, qPCR, ELISA assay, calcium imaging, Western blot, co-immunoprecipitation, and immunofluorescence), interpretation of data, statistical analysis, and manuscript preparation. A.F.: calcium imaging and qPCR experiments. T.L.: cell culture and cytometry experiments. K.K.: confocal microscopy experiments. S.G.: qPCR experiments. I.D.-D. and M.G.: interpretation of data. N.P.: design and supervised the project, interpretation of data and manuscript preparation. H.O.-A.: design and supervised the project, interpretation of data and manuscript preparation. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Cancéropôle Nord-Ouest (CNO) for the project entitled "SICASTE", 2016-2018.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article or supplementary material.

Acknowledgments: We acknowledge the Région Hauts-de-France (Picardie), the FEDER (Fonds Européen de Développement Économique Régional), the Université Picardie Jules Verne, and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche for supporting this study. We thank the H.M. Kocher and his laboratory members from the Queen Mary University of London, for kindly providing us the PS-1 cell line, used for this study. We also thank the platform of Centre de Ressources Régionales en Biologie Moléculaire for the equipment availability.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no interest of any kind affecting this study.

References

1. Jaster, R.; Emmrich, J. Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2008**, *22*, 17–29. [[CrossRef](#)]
2. Apte, M.V.; Pirola, R.C.; Wilson, J.S. Pancreatic stellate cells: A starring role in normal and diseased pancreas. *Front. Physiol.* **2012**, *3*, 344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Norton, J.; Foster, D.; Chinta, M.; Titan, A.; Longaker, M. Pancreatic Cancer Associated Fibroblasts (CAF): Under-Explored Target for Pancreatic Cancer Treatment. *Cancers* **2020**, *12*, 1347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Thomas, D.; Radhakrishnan, P. Pancreatic Stellate Cells: The Key Orchestrator of the Pancreatic Tumor Microenvironment. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Birbrair, A., Ed.; Springer Science and Business Media LLC: Berlin/Heidelberg, Germany, 2020; Volume 1234, pp. 57–70.
5. Ferdek, P.E.; Jakubowska, M.A. Biology of pancreatic stellate cells—more than just pancreatic cancer. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2017**, *469*, 1039–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Masamune, A.; Shimosegawa, T. Pancreatic stellate cells—Multi-functional cells in the pancreas. *Pancreatology* **2013**, *13*, 102–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Bynigeri, R.R.; Jakkampudi, A.; Jangala, R.; Subramanyam, C.; Sasikala, M.; Rao, G.V.; Reddy, D.N.; Talukdar, R. Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 382–405. [[CrossRef](#)]
8. Masamune, A.; Watanabe, T.; Kikuta, K.; Shimosegawa, T. Roles of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Inflammation and Fibrosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *7*, S48–S54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Pereira, B.A.; Vennin, C.; Papanicolaou, M.; Chambers, C.R.; Herrmann, D.; Morton, J.P.; Cox, T.R.; Timpson, P. CAF Subpopulations: A New Reservoir of Stromal Targets in Pancreatic Cancer. *Trends Cancer* **2019**, *5*, 724–741. [[CrossRef](#)]
10. Jin, G.; Hong, W.; Guo, Y.; Bai, Y.; Chen, B. Molecular Mechanism of Pancreatic Stellate Cells Activation in Chronic Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *J. Cancer* **2020**, *11*, 1505–1515. [[CrossRef](#)]
11. Schneider, E.; Schmid-Kotsas, A.; Zhao, J.; Weidenbach, H.; Schmid, R.M.; Menke, A.; Adler, G.; Waltenberger, J.; Grünert, A.; Bachem, M.G. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2001**, *281*, C532–C543. [[CrossRef](#)]
12. Kulkarni, A.A.; Thatcher, T.H.; Olsen, K.C.; Maggjarwar, S.B.; Phipps, R.P.; Sime, P.J. PPAR- γ Ligands Repress TGF β -Induced Myofibroblast Differentiation by Targeting the PI3K/Akt Pathway: Implications for Therapy of Fibrosis. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e15909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Kim, K.K.; Sheppard, D.; Chapman, H.A. TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a022293. [[CrossRef](#)]
14. Omary, M.B.; Lugea, A.; Lowe, A.W.; Pandolfi, S.J. The pancreatic stellate cell: A star on the rise in pancreatic diseases. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 50–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Apte, M.V.; Haber, P.S.; Darby, S.J.; Rodgers, S.C.; McCaughan, G.W.; Korsten, M.; Pirola, R.C.; Wilson, J.S. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: Implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* **1999**, *44*, 534–541. [[CrossRef](#)]
16. Kruse, M.-L.; Hildebrand, P.B.; Timke, C.; Fölsch, U.R.; E Schmidt, W. TGF β 1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells in vitro. *Regul. Pept.* **2000**, *90*, 47–52. [[CrossRef](#)]
17. Finsson, K.W.; Almadani, Y.; Philip, A. Non-canonical (non-SMAD2/3) TGF- β signaling in fibrosis: Mechanisms and targets. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2020**, *101*, 115–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Masamune, A.; Shimosegawa, T. Signal transduction in pancreatic stellate cells. *J. Gastroenterol.* **2009**, *44*, 249–260. [[CrossRef](#)]
19. Kusiak, A.A.; Szopa, M.D.; Jakubowska, M.A.; Ferdek, P.E. Signaling in the Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Stellate Cells—A Brief Review of Recent Advances. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 78. [[CrossRef](#)]
20. Schwer, C.L.; Stoll, P.; Rospert, S.; Fitzke, E.; Schallner, N.; Bürkle, H.; Schmidt, R.; Humar, M. Carbon monoxide releasing molecule-2 CORM-2 represses global protein synthesis by inhibition of eukaryotic elongation factor eEF2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2013**, *45*, 201–212. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, X.; Jin, T.; Huang, X.; Liu, X.; Liu, Z.; Jia, Y.; Hao, J. Effects of the tumor suppressor PTEN on biological behaviors of activated pancreatic stellate cells in pancreatic fibrosis. *Exp. Cell Res.* **2018**, *373*, 132–144. [[CrossRef](#)]
22. Won, J.H.; Zhang, Y.; Ji, B.; Logsdon, C.D.; Yule, D.I. Phenotypic changes in mouse pancreatic stellate cell Ca²⁺ signaling events following activation in culture and in a disease model of pancreatitis. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 421–436. [[CrossRef](#)]
23. Son, A.; Park, S.; Shin, D.M.; Muallem, S. Orai1 and STIM1 in ER/PM junctions: Roles in pancreatic cell function and dysfunction. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2016**, *310*, C414–C422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gryshchenko, O.; Gerasimenko, J.V.; Gerasimenko, O.V.; Petersen, O.H. Ca²⁺ signals mediated by bradykinin type 2 receptors in normal pancreatic stellate cells can be inhibited by specific Ca²⁺-channel blockade. *J. Physiol.* **2015**, *594*, 281–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Waldron, R.T.; Chen, Y.; Pham, H.; Go, A.; Su, H.; Hu, C.; Wen, L.; Husain, S.Z.; Sugar, C.A.; Roos, J.; et al. The Orai Ca²⁺ channel inhibitor CM4620 targets both parenchymal and immune cells to reduce inflammation in experimental acute pancreatitis. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 3085–3105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fu, T.; Xu, Y.; Jiang, W.; Zhang, H.; Zhu, P.; Wu, J. EGF receptor-mediated intracellular calcium increase in human hepatoma BEL-7404 cells. *Cell Res.* **1994**, *4*, 145–153. [[CrossRef](#)]
27. Wang, L.; Wormstone, I.M.; Reddan, J.R.; Duncan, G. Growth factor receptor signalling in human lens cells: Role of the calcium store. *Exp. Eye Res.* **2005**, *80*, 885–895. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Davis, F.M.; Peters, A.A.; Grice, D.M.; Cabot, P.J.; Parat, M.-O.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Non-Stimulated, Agonist-Stimulated and Store-Operated Ca²⁺ Influx in MDA-MB-468 Breast Cancer Cells and the Effect of EGF-Induced EMT on Calcium Entry. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Azimi, I.; Bong, A.H.; Poo, G.X.H.; Armitage, K.; Lok, D.; Roberts-Thomson, S.J.; Monteith, G.R. Pharmacological inhibition of store-operated calcium entry in MDA-MB-468 basal A breast cancer cells: Consequences on calcium signalling, cell migration and proliferation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 4525–4537. [[CrossRef](#)]
30. Aoki, H.; Ohnishi, H.; Hama, K.; Shinozaki, S.; Kita, H.; Yamamoto, H.; Osawa, H.; Sato, K.; Tamada, K.; Sugano, K. Existence of autocrine loop between interleukin-6 and transforming growth factor- β 1 in activated rat pancreatic stellate cells. *J. Cell. Biochem.* **2006**, *99*, 221–228. [[CrossRef](#)]
31. Masamune, A.; Kikuta, K.; Satoh, M.; Kume, K.; Shimosegawa, T. Differential Roles of Signaling Pathways for Proliferation and Migration of Rat Pancreatic Stellate Cells. *Tohoku J. Exp. Med.* **2003**, *199*, 69–84. [[CrossRef](#)]
32. Ohnishi, H.; Miyata, T.; Yasuda, H.; Satoh, Y.; Hanatsuka, K.; Kita, H.; Ohashi, A.; Tamada, K.; Makita, N.; Iiri, T.; et al. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor- β 1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 8873–8878. [[CrossRef](#)]
33. Jaster, R.; Sparmann, G.; Emmrich, J.; Liebe, S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* **2002**, *51*, 579–584. [[CrossRef](#)]
34. Yu, D.-K.; Zhang, C.-X.; Zhao, S.-S.; Zhang, S.-H.; Zhang, H.; Cai, S.-Y.; Shao, R.-G.; He, H.-W. The anti-fibrotic effects of epigallocatechin-3-gallate in bile duct-ligated cholestatic rats and human hepatic stellate LX-2 cells are mediated by the PI3K/Akt/Smad pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* **2015**, *36*, 473–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Xu, M.; Wang, G.; Zhou, H.; Cai, J.; Li, P.; Zhou, M.; Lu, Y.; Jiang, X.; Huang, H.; Zhang, Y.; et al. TGF- β 1-miR-200a-PTEN induces epithelial-mesenchymal transition and fibrosis of pancreatic stellate cells. *Mol. Cell. Biochem.* **2017**, *431*, 161–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Alevizopoulos, A.; Dusserre, Y.; Rüegg, U.; Mermod, N. Regulation of the Transforming Growth Factor β -responsive Transcription Factor CTF-1 by Calcineurin and Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase IV. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23597–23605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chow, J.Y.C.; Dong, H.; Quach, K.T.; Van Nguyen, P.N.; Chen, K.; Carethers, J.M. TGF- β mediates PTEN suppression and cell motility through calcium-dependent PKC- α activation in pancreatic cancer cells. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* **2008**, *294*, G899–G905. [[CrossRef](#)]
38. Dong, H.; Shim, K.-N.; Li, J.M.J.; Estrema, C.; Ornelas, T.A.; Nguyen, F.; Liu, S.; Ramamoorthy, S.L.; Ho, S.; Carethers, J.M.; et al. Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-mediated motility of human pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* **2010**, *299*, C1493–C1503. [[CrossRef](#)]

39. Iyer, S.C.; Kannan, A.; Gopal, A.; Devaraj, N.; Halagowder, D. Receptor channel TRPC6 orchestrate the activation of human hepatic stellate cell under hypoxia condition. *Exp. Cell Res.* **2015**, *336*, 66–75. [\[CrossRef\]](#)
40. Kurahara, L.H.; Sumiyoshi, M.; Aoyagi, K.; Hiraishi, K.; Nakajima, K.; Nakagawa, M.; Hu, Y.; Inoue, R. Intestinal Myofibroblast TRPC6 Channel May Contribute to Stenotic Fibrosis in Crohn's Disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **2015**, *21*, 496–506. [\[CrossRef\]](#)
41. Hodeify, R.; Yu, F.; Courjaret, R.; Nader, N.; Dib, M.; Sun, L.; Adap, E.; Hubrack, S.; Machaca, K.; Kozak, J.A.; et al. Regulation and Role of Store-Operated Ca²⁺ Entry in Cellular Proliferation. In *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells*; Kozak, J.A., Putney, J.W., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; pp. 215–240.
42. Gao, X.; Xia, J.; Munoz, F.M.; Manners, M.T.; Pan, R.; Meucci, O.; Dai, Y.; Hu, H. STIMs and Orai1 regulate cytokine production in spinal astrocytes. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 126. [\[CrossRef\]](#)
43. 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 (BBA) Bioenerg.* **2014**, *1843*, 2263–2269. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Somasundaram, A.; Shum, A.K.; McBride, H.J.; Kessler, J.A.; Feske, S.; Miller, R.J.; Prakriya, M. Store-Operated CRAC Channels Regulate Gene Expression and Proliferation in Neural Progenitor Cells. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 9107–9123. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Liu, H.; Hughes, J.D.; Rollins, S.; Chen, B.; Perkins, E. Calcium entry via Orai1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* **2011**, *91*, 753–760. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Zhu, H.; Zhang, H.; Jin, F.; Fang, M.; Huang, M.; Yang, C.S.; Chen, T.; Fu, L.; Pan, Z. Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca²⁺ oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **2014**, *5*, 3455–3471. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Choi, D.; Park, E.; Jung, E.; Seong, Y.J.; Hong, M.; Lee, S.; Burford, J.; Gyarmati, G.; Peti-Peterdi, J.; Srikanth, S.; et al. Orai1 Activates Proliferation of Lymphatic Endothelial Cells in Response to Laminar Flow through Krüppel-Like Factors 2 and 4. *Circ. Res.* **2017**, *120*, 1426–1439. [\[CrossRef\]](#)
48. Capiod, T. Cell proliferation, calcium influx and calcium channels. *Biochimie* **2011**, *93*, 2075–2079. [\[CrossRef\]](#)
49. Kim, J.-H.; Lkhagvadorj, S.; Lee, M.-R.; Hwang, K.-H.; Chung, H.C.; Jung, J.H.; Cha, S.-K.; Eom, M. Orai1 and STIM1 are critical for cell migration and proliferation of clear cell renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *448*, 76–82. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Capiod, T. The Need for Calcium Channels in Cell Proliferation. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2012**, *8*, 4–17. [\[CrossRef\]](#)
51. El Boustany, C.; Katsogiannou, M.; Delcourt, P.; Dewailly, E.; Prevarskaya, N.; Borowiec, A.-S.; Capiod, T. Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. *Cell Calcium* **2010**, *47*, 350–359. [\[CrossRef\]](#)
52. Abdullaev, I.F.; Bisailon, J.M.; Potier, M.; Gonzalez, J.C.; Motiani, R.K.; Trebak, M. Stim1 and Orai1 Mediate CRAC Currents and Store-Operated Calcium Entry Important for Endothelial Cell Proliferation. *Circ. Res.* **2008**, *103*, 1289–1299. [\[CrossRef\]](#)
53. Borowiec, A.-S.; Bidaux, G.; Tacine, R.; Dubar, P.; Pigat, N.; Delcourt, P.; Mignen, O.; Capiod, T. Are Orai1 and Orai3 channels more important than calcium influx for cell proliferation? *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 464–472. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. 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 Ca²⁺ entry in human gastrointestinal stromal tumors via c-KIT and the extracellular signal-regulated kinase pathway. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317691426. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Chen, Y.-W.; Chen, Y.-F.; Chen, Y.-T.; Chiu, W.-T.; Shen, M.-R. The STIM1-Orai1 pathway of store-operated Ca²⁺ entry controls the checkpoint in cell cycle G1/S transition. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
56. Jairaman, A.; Yamashita, M.; Schleimer, R.P.; Prakriya, M. Store-Operated Ca²⁺ Release-Activated Ca²⁺ Channels Regulate PAR2-Activated Ca²⁺ Signaling and Cytokine Production in Airway Epithelial Cells. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 2122–2133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Heo, D.K.; Lim, H.M.; Nam, J.H.; Lee, M.G.; Kim, J.Y. Regulation of phagocytosis and cytokine secretion by store-operated calcium entry in primary isolated murine microglia. *Cell. Signal.* **2015**, *27*, 177–186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Murthy, D.; Attri, K.S.; Singh, P.K. Phosphoinositide 3-Kinase Signaling Pathway in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Progression, Pathogenesis, and Therapeutics. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 335. [\[CrossRef\]](#)
59. Cui, L.-H.; Li, C.-X.; Zhuo, Y.-Z.; Yang, L.; Cui, N.-Q.; Zhang, S.-K. Saikosaponin d ameliorates pancreatic fibrosis by inhibiting autophagy of pancreatic stellate cells via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Chem. Interact.* **2019**, *300*, 18–26. [\[CrossRef\]](#)
60. Ramakrishnan, P.; Loh, W.M.; Gopinath, S.C.B.; Bonam, S.R.; Fareez, I.M.; Mac Guad, R.; Sim, M.S.; Wu, Y.S. Selective phytochemicals targeting pancreatic stellate cells as new anti-fibrotic agents for chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Acta Pharm. Sin. B* **2020**, *10*, 399–413. [\[CrossRef\]](#)
61. Deng, W.; Wang, J.; Zhang, J.; Cai, J.; Bai, Z.; Zhang, Z. Orai1, a Direct Target of microRNA-519, Promotes Progression of Colorectal Cancer via Akt/GSK3 β Signaling Pathway. *Dig. Dis. Sci.* **2016**, *61*, 1553–1560. [\[CrossRef\]](#)
62. Zhan, Z.-Y.; Zhong, L.-X.; Feng, M.; Wang, J.-F.; Liu, D.-B.; Xiong, J.-P. Over-expression of Orai1 mediates cell proliferation and associates with poor prognosis in human non-small cell lung carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 5080–5088.
63. Khan, H.Y.; Mpillá, G.B.; Sexton, R.; Viswanadha, S.; Penmetsa, K.V.; Aboukameel, A.; Diab, M.; Kamgar, M.; Al-Hallak, M.N.; Szlaczky, M.; et al. Calcium Release-Activated Calcium (CRAC) Channel Inhibition Suppresses Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Proliferation and Patient-Derived Tumor Growth. *Cancers* **2020**, *12*, 750. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

64. Xu, X.-F.; Liu, F.; Xin, J.-Q.; Fan, J.-W.; Wu, N.; Zhu, L.-J.; Duan, L.-F.; Li, Y.-Y.; Zhang, H. Respective roles of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members in pancreatic stellate cell activation induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *501*, 365–373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Gao, Y.-D.; Zheng, J.-W.; Li, P.; Cheng, M.; Yang, J. Store-Operated Ca²⁺ Entry is Involved in Transforming Growth Factor- β 1 Facilitated Proliferation of Rat Airway Smooth Muscle Cells. *J. Asthma* **2013**, *50*, 439–448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Roth-Eichhorn, S.; Eberheim, A.; Bode, H.-P.; Gressner, A.M. Transformation-dependent calcium influx by voltage-operated calcium channels in stellate cells of rat liver. *J. Hepatol.* **1999**, *30*, 612–620. [[CrossRef](#)]
67. Tsang, S.W.; Bian, Z.-X. Anti-fibrotic and Anti-tumorigenic Effects of Rhein, a Natural Anthraquinone Derivative, in Mammalian Stellate and Carcinoma Cells. *Phytother. Res.* **2014**, *29*, 407–414. [[CrossRef](#)]
68. Berna, M.J.; Seiz, O.; Nast, J.F.; Bente, D.; Bläker, M.; Koch, J.; Lohse, A.W.; Pace, A. CCK1 and CCK2 Receptors Are Expressed on Pancreatic Stellate Cells and Induce Collagen Production. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 38905–38914. [[CrossRef](#)]
69. Morikawa, M.; Derynck, R.; Miyazono, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *8*, a021873. [[CrossRef](#)]
70. Zhang, Y.; Alexander, P.B.; Wang, X.-F. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *9*, a022145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Elsner, A.; Lange, F.; Fitzner, B.; Heuschkel, M.; Krause, B.J.; Jaster, R. Distinct antifibrogenic effects of erlotinib, sunitinib and sorafenib on rat pancreatic stellate cells. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 7914–7925. [[CrossRef](#)]
72. Zhang, Y.E. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2016**, *9*, a022129. [[CrossRef](#)]
73. Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Res.* **2009**, *19*, 128–139. [[CrossRef](#)]
74. Froeling, F.E.; Mirza, T.A.; Feakins, R.M.; Seedhar, A.; Elia, G.; Hart, I.R.; Kocher, H.M. Organotypic Culture Model of Pancreatic Cancer Demonstrates that Stromal Cells Modulate E-Cadherin, β -Catenin, and Ezrin Expression in Tumor Cells. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 636–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Jesnowski, R.; Fürst, D.; Ringel, J.; Chen, Y.; Schrödel, A.; Kleeff, J.; Kolb, A.; Schareck, W.D.; Löhr, M. Immortalization of pancreatic stellate cells as an in vitro model of pancreatic fibrosis: Deactivation is induced by matrigel and N-acetylcysteine. *Lab. Invest.* **2005**, *85*, 1276–1291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. 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](#)]



Contents lists available at ScienceDirect

Cell Calcium

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceca

TRPC1 channels regulate the activation of pancreatic stellate cells through ERK1/2 and SMAD2 pathways and perpetuate their pressure-mediated activation

Silviya Radoslavova^{a,b,§}, Benedikt Fels^{c,f,§}, Zoltan Pethö^d, Matthias Gruner^d, Tobias Ruck^e, Sven G. Meuth^e, Antoine Folcher^b, Natalia Prevarskaya^{b,§}, Albrecht Schwab^{d,*,§}, Halima Ouadid-Ahidouch^{a,*}

^a Laboratory of Cellular and Molecular Physiology, UR-UPJV 4667, University of Picardie Jules Verne, 80039 Amiens, France

^b University of Lille, Inserm U1003 - PHYCEL - Cellular Physiology, F-59000 Lille, France

^c Institute of Physiology, University Lübeck, Lübeck, Germany

^d Institute of Physiology II, University Münster, Münster, Germany

^e Klinik für Neurologie, Medical Faculty, Universitätsklinikum Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

^f DZHK (German Research Centre for Cardiovascular Research), Partner Site Hamburg/Lübeck/Kiel, Lübeck, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

TRPC1 channels
Pancreatic stellate cells
Activation
Pancreatic ductal adenocarcinoma
High-pressure

ABSTRACT

Pancreatic stellate cell (PSC) activation is a major event occurring during pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) development. Up to now mechanisms underlying their activation by mechanical cues such as the elevated tissue pressure in PDAC remain poorly understood. Here we investigate the role of one potential mechano-transducer, TRPC1 ion channel, in PSC activation. Using pre-activated human siTRPC1 and murine TRPC1-KO PSCs, we show that TRPC1 promotes α SMA (α -smooth muscle actin) expression, the main activation marker, in cooperation with the phosphorylated SMAD2, under normal and elevated pressure. Functional studies following TRPC1 silencing demonstrate the dual role of TRPC1 in the modulation of PSC proliferation and IL-6 secretion through the activation of ERK1/2 and SMAD2 pathways. Moreover, pressurization changes the mechanical behavior of PSCs by increasing their cellular stiffness and emitted traction forces in a TRPC1-dependent manner. In summary, these results point to a role of TRPC1 channels in sensing and transducing the characteristic mechanical properties of the PDAC microenvironment in PSCs.

1. Introduction

Activated pancreatic stellate cells (PSCs) are the main source of the extensive fibrotic stroma that characterizes pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). It accounts for up to 90% of the total tumor mass [1–3]. Therefore, PSCs have become the subject of intensive research in order to elucidate their therapeutic potential in the improvement of PDAC treatment.

In the healthy pancreas, PSCs exist in a quiescent vitamin-A lipid-storing state. They are involved in the maintenance of pancreatic tissue architecture by regulating the extracellular matrix (ECM) turnover [4]. However, during PDAC development PSCs become activated which

leads to a change of their phenotypical and functional properties. They transform to a more myofibroblast-like phenotype, defined by a high expression of α -smooth muscle actin (α SMA) and loss of Vitamin A-containing lipid droplets [5]. Activated PSCs are also characterized by increased proliferative and migratory activity as well as by enhanced secretion of cytokines, growth factors and ECM proteins [5–7]. PSCs can maintain their activation through autocrine positive feedback loops and paracrine interactions with the pancreatic cancer cells [3,8,9]. The intense mutual communication between PSCs and pancreatic cancer cells leads to the perpetuation of PSC activation as well as to the promotion of the tumorigenic potential of the cancer cells [3,10,11].

PSCs can also be activated by the PDAC microenvironment which

* Corresponding authors.

E-mail addresses: natacha.prevarskaya@univ-lille.fr (N. Prevarskaya), aschwab@uni-muenster.de (A. Schwab), halima.ahidouch-ouadid@u-picardie.fr (H. Ouadid-Ahidouch).

§ Co-first authors

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102621>

Received 25 May 2022; Received in revised form 4 July 2022; Accepted 5 July 2022

Available online 9 July 2022

0143-4160/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

contains an abundant amount of cytokines and growth factors secreted from stromal cells including PSCs as well as from cancer cells [12–14]. Among these, interleukin-6 (IL-6) has been shown to be overexpressed in PDAC microenvironment [15]. IL-6 levels correlate with patients' poor survival rate [16]. In addition, the altered mechanical properties of the PDAC microenvironment strongly contribute to PSC activation. This includes the elevated tissue pressure which is up to 10 times higher than

in the healthy pancreas [17–19].

However, the activation of PSCs by mechanical cues is not yet well understood. There is evidence that ion channels implicated in mechanosensation may be involved in the activation cascade of PSCs [20]. These ion channels are sensors that transduce mechanical forces into intracellular biochemical signals, mainly via the conduction of Ca^{2+} ions. This results in different cellular responses including cell

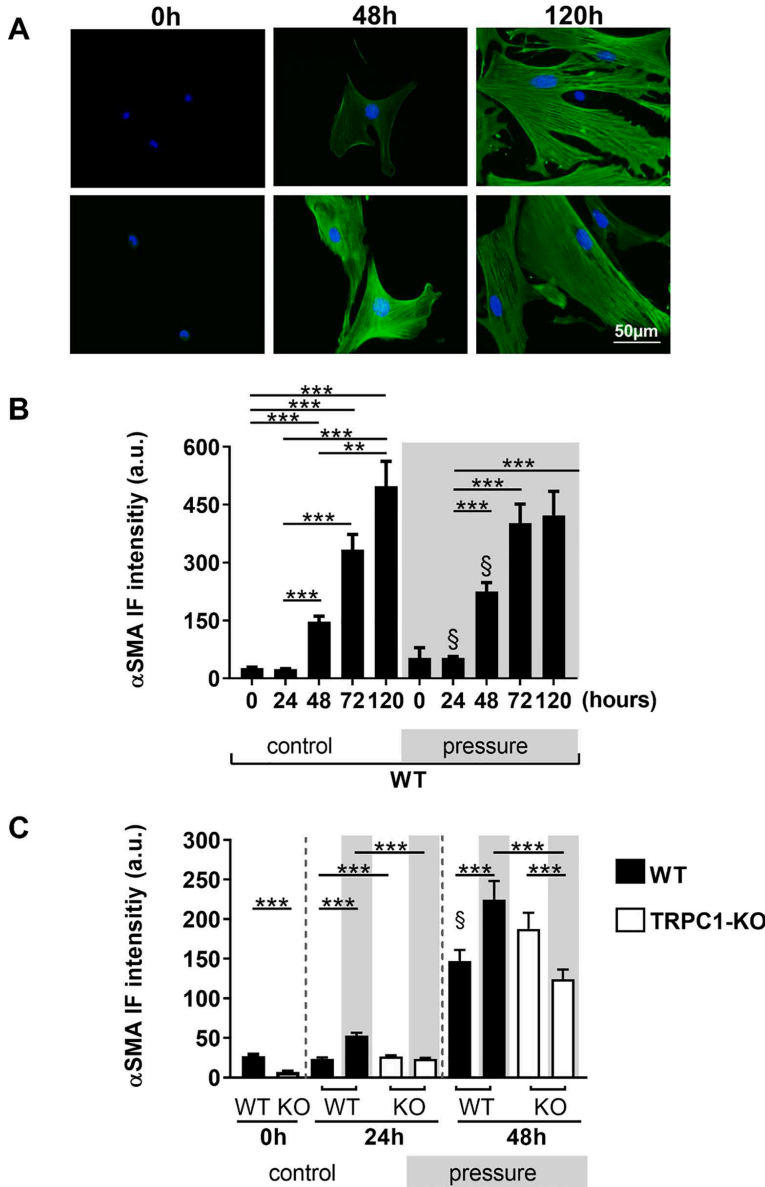


Fig. 1. Pressure accelerates mouse PSC activation TRPC1-dependently. **A)** Typical α SMA staining in freshly isolated, quiescent WT-PSCs directly after isolation ($t = 0h$), at $t = 48h$ and $t = 120h$. Upper panel: control conditions; lower panel: pressure ($\Delta +100$ mmHg). Pressure incubation leads to earlier and more pronounced α SMA expression. **B)** Quantification of the time course of α SMA expression in PSCs under control conditions and upon culturing them at an elevated ambient pressure. PSC activation is accelerated by an increased ambient pressure during the first 48h after isolation (indicated by §; $N(0-48h) = 4-5$, $N(72-120h) = 3$, $n = 104-347$; §, $*p < 0.05$, control vs. pressure). **C)** Pressurization (indicated by the grey shading) accelerates the increase of α SMA in WT but not in TRPC1-KO PSCs within the first 48h ($N(WT) = 4-5$, $N(KO) = 3$; $n = 183-347$; $*p < 0.05$, control vs. pressure).

proliferation, migration, apoptosis or protein expression, and secretion [21]. One of the candidate channels involved in mechanosensation is TRPC1 (canonical transient receptor potential), a member of the large family of TRP channels [22]. We have previously demonstrated that mechanical forces generated by high pressure augment Ca^{2+} influx into murine PSCs via TRPC1 activation. This in turn leads to the increase of migration which reflects PSC activation [19].

Several signal transduction pathways such as the extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) or the mothers against decapentaplegic homolog 2 (SMAD2) pathway have been linked to PSC activation in response to environmental stimuli [17,23–25]. However, so far, the role of mechanical forces transduced by TRPC1 into intracellular signals in the modulation of PSC activation as well as the underlying mechanisms are by and large unknown.

Here we demonstrate the role of TRPC1-dependent mechanisms in PSC activation by an elevated pressure. We identify signaling pathways by which TRPC1 channels regulate α SMA expression, cell proliferation, IL-6 secretion and shape the mechanical properties of PSCs themselves.

2. Results

2.1. Pressure accelerates initial activation of murine PSCs

The transition of PSCs from a quiescent to an activated state is triggered among others by mechanical stimuli such as pressure [17,19]. We, therefore, first started by using primary PSCs from murine WT and TRPC1-KO PSCs and tested whether increased pressure is able to accelerate the initial activation of freshly isolated, quiescent PSCs. PSC activation can be monitored by an increase of α SMA expression (Fig. 1 A). When PSCs are cultured in the presence of an elevated ambient pressure, α SMA expression rises faster than under control conditions (24h: Ctr 23.7 ± 1.8 a.u. vs. pressure 53.1 ± 3.5 a.u.; 48h: Ctr 147.3 ± 13.7 a.u. vs. pressure 225.0 ± 23.4 a.u., Fig. 1 B). PSCs under pressurization remain activated when cultured for a time period of 5 days as evidenced by an increased α SMA expression at $t = 120$ h (Fig. 1 A-B). However, the accelerated activation in response to an elevated ambient pressure is absent in TRPC1-KO PSCs after 24h (TRPC1-KO control 26.4 ± 1.8 a.u. vs pressure 23.7 ± 1.1 a.u.; Fig. 1 C). It is strongly attenuated after 48h (TRPC1-KO control 188.0 ± 20.2 a.u. vs pressure 124.3 ± 12.0 a.u.). These data suggest that pressure-induced PSC activation is in part TRPC1-dependent.

During activation PSCs typically lose Vitamin A-containing lipid droplets, which can be stained with NileRed [1]. Activation of quiescent freshly isolated PSCs is at least in part due to culturing them on unphysiologically stiff tissue culture plastic [26]. This activation leads to a steady decrease of NileRed positive cells within the first days of culture (Supplementary Figure 1 A). Their relative number is reduced from 60.5 ± 5.0 % ($t = 24$ h) to 27.5 ± 2.8 % ($t = 120$ h, Supplementary Figure 1 A). When PSCs are cultured at an increased atmospheric pressure, the decrease of NileRed positive cells is markedly accelerated during the first 24h ($t = 24$ h: 42.2 ± 5.2 %). It reaches the same low level as control cells after 120h (27.6 ± 3.2 %).

Furthermore, the mechanical properties of the PDAC microenvironment are modulated by the excessive ECM deposition resulting in the increase of PDAC tissue stiffness, which consequently leads to the increase of PDAC tissue pressure [27]. Such an unphysiologically high stiffness is also observed on the cell culture plastic support. This phenomenon induces and maintains PSCs in an activated state [26]. We therefore wondered whether TRPC1 silencing could also influence α SMA expression in already pre-activated human PSC cell line (PS-1) when they are cultured in cell culture plastic dishes. Indeed, knocking down of TRPC1 for 72h leads to a decrease of α SMA expression by 58.4 ± 10.8 % (Supplementary Figure 1 B-D). This finding suggests that α SMA expression is also partly TRPC1-dependent in pre-activated human PSCs.

2.2. Physical association and colocalization between TRPC1, α SMA and pSMAD2 in pre-activated human PSCs

After showing a link between TRPC1 and α SMA expression in pressure-induced activation of murine PSCs and pre-activated human PSCs, we wondered whether TRPC1 channels could be colocalized with α SMA. Furthermore, knowing that α SMA expression is mediated by the SMAD2 pathway [25], we simultaneously sought to know whether TRPC1 channels could be linked to α SMA through the phosphorylated active form of SMAD2 (pSMAD2). To determine this, we used the pre-activated human PSC cell line PS-1 and analyzed the colocalization of TRPC1, α SMA and pSMAD2 by immunofluorescence. We quantified the colocalization degree of these three proteins with Pearson's correlation coefficient using Fiji ImageJ software. Indeed, when the coefficient value lies between 1 and 0.5, this reflects an important colocalization between the two proteins. According to this and as shown in Fig. 2 A-C we noted a "partial" colocalization between TRPC1, α SMA and pSMAD2, suggesting that they might be interacting with each other. To confirm this hypothesis, we performed co-immunoprecipitation followed by Western blot experiments using anti-TRPC1, anti- α SMA and anti-pSMAD2 antibodies to evaluate the interaction between the three partners. We found that TRPC1, α SMA and pSMAD2 form a direct or indirect physical interaction network within pre-activated human PSCs (Fig. 2 D).

2.3. Mutual regulation between TRPC1, α SMA and pSMAD2 within the formed protein complex in pre-activated human PSCs

We then wanted to determine whether TRPC1- α SMA-pSMAD2 association in pre-activated human PSCs depends on the protein expression level of each partner. To this end, we silenced each actor independently for 72h, using the siRNA approach and evaluated the interaction level between the two other partners by co-immunoprecipitation and Western blot experiments. 72h of TRPC1 silencing decreases the interaction between α SMA and pSMAD2 by 41.8 ± 14.9 % (Fig. 3 A) and by 40.7 ± 16.3 % (Fig. 3 B), when immunoprecipitated with pSMAD2 and α SMA antibodies, respectively. The influence of knocking-down SMAD2 on the protein complex is more prominent since it induces a 60.8 ± 8.6 % (Fig. 3 C) and 52.4 ± 16.1 % (Fig. 3 D) diminution of α SMA and TRPC1 association, using TRPC1 and α SMA immunoprecipitation (IP) antibodies, respectively. Contrary to SMAD2, the effect of α SMA inhibition is less pronounced, leading to 38.8 ± 12.8 % (Fig. 3 E, with pSMAD2 IP antibody) and 22 ± 4.1 % (Fig. 3 F, with TRPC1 IP antibody) decrease of TRPC1-pSMAD2 interplay. This heterogeneous influence of each partner on the complex constitution shows that TRPC1, α SMA and pSMAD2 participate at different degrees in the complex assembly, in pre-activated human PSCs. In parallel, we assessed the 72h siRNA transfection efficiency of each protein by Western blotting. TRPC1 protein expression was diminished by 84.3 ± 5.4 % (Supplementary Figure 1 B-C), SMAD2 expression by 61.9 ± 9.4 % (Supplementary Figure 2 A), and α SMA by 98.6 ± 0.6 % (Supplementary Figure 2 B). Thus, the decrease in the complex formation is not directly proportional to the degree of knock-down of any of the three proteins which argues for a more complex interaction of them. Taken together these data reveal a strong regulatory link between TRPC1, α SMA and pSMAD2 within the formed protein complex.

2.4. Elevated external pressure increases TRPC1 channel function in pre-activated human PSCs

We have previously demonstrated that elevated pressure drives Ca^{2+} influx through TRPC1 channel activation in mouse PSCs [19]. According to these findings, we wondered whether an elevated external pressure would rise α SMA and TRPC1 expression in pre-activated human PSCs. This would then lead to an increased TRPC1-mediated Ca^{2+} influx and to an extended PSC activation. To investigate this hypothesis, we

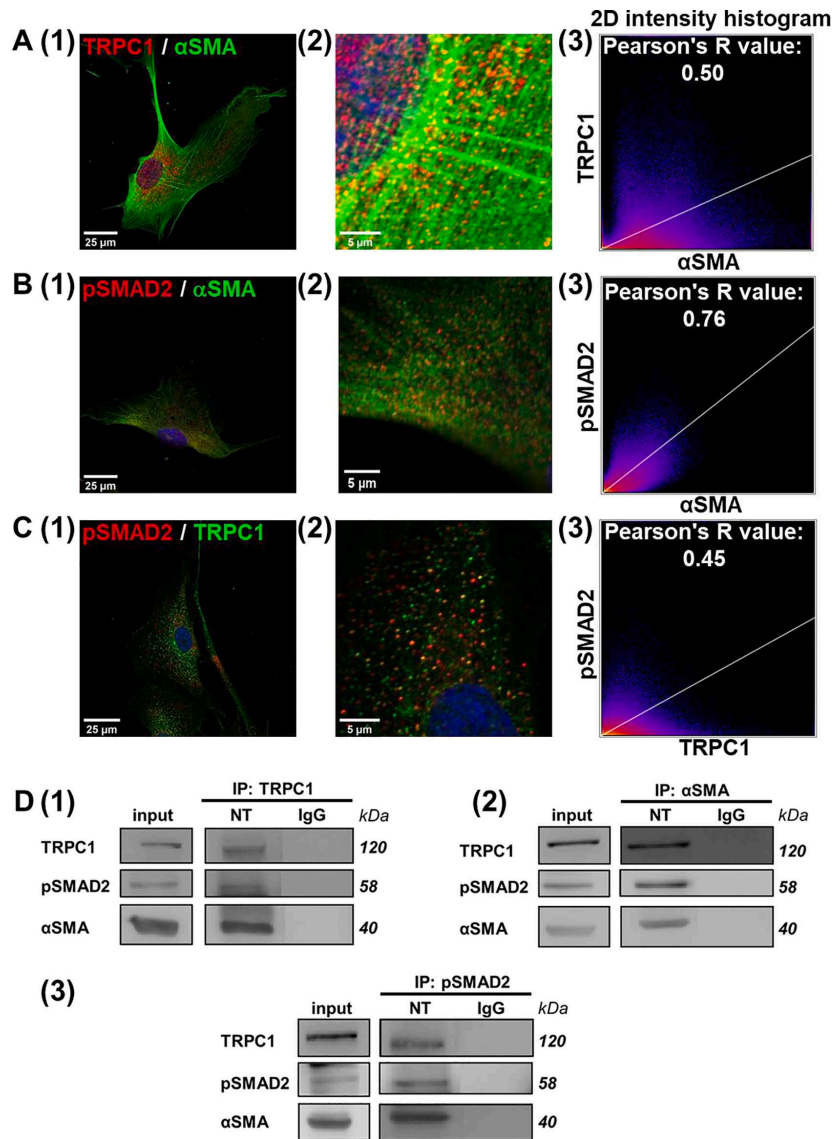


Fig. 2. TRPC1 co-localizes and interacts with αSMA and the phosphorylated form of SMAD2 (pSMAD2) in pre-activated human PSCs. A1-2) Immunofluorescence staining of TRPC1 (red), αSMA (green) and their merge in PS-1 cells. A3) The colocalization intensity was measured using Pearson's correlation coefficient with Fiji ImageJ software. Each immunofluorescence image was displayed as an intensity-scatter plot, where the x-axis represents the green labeled protein and the y-axis the red labeled protein, both related by the white linear regression line in the scatter plot. The closer Pearson's R value is to 1, the stronger the positive linear relationship, and thus the colocalization between the two proteins is. B1-3) The same experiments were performed to visualize pSMAD2 (red) and αSMA (green) colocalization as well as C1-3) TRPC1 (green) and pSMAD2 (red) colocalization. All image acquisitions were performed by confocal microscopy. D) Representative Western blot of TRPC1, pSMAD2 and αSMA expression after immunoprecipitation with D1) anti-pSMAD2, D2) anti-αSMA and D3) anti-TRPC1 antibodies (NT: no-treated cells, at least N=3).

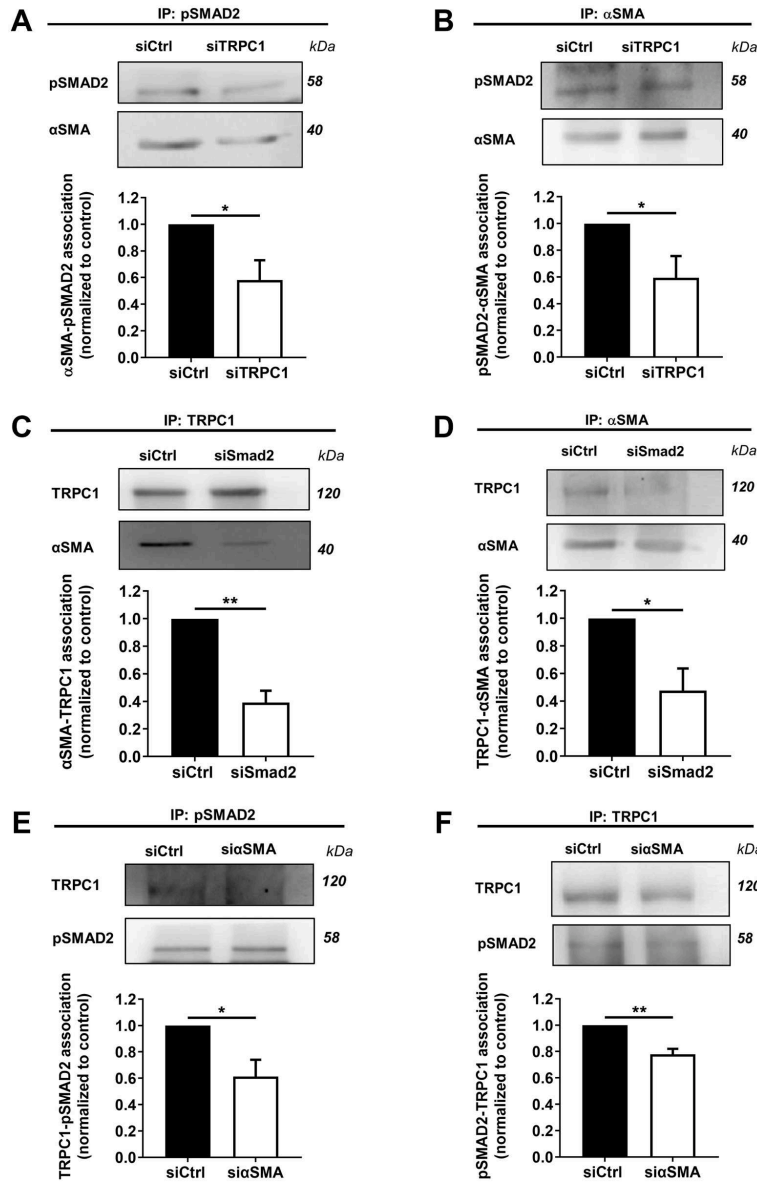


Fig. 3. Silencing one of the partners disrupts the protein complex interaction within pre-activated human PSCs. A-B) TRPC1 knock-down impairs the αSMA-pSMAD2 interaction. A) Representative Western blot of αSMA-pSMAD2 interaction after 72h of TRPC1 silencing, using anti-pSMAD2 immunoprecipitation antibody with the quantification. B) Similarly, pSMAD2-αSMA interaction was evaluated in TRPC1 knocked-down PS-1 cells using anti-αSMA immunoprecipitation antibody as illustrated by the representative Western blot and quantification. C-D) SMAD2 knock-down perturbs the interaction between αSMA and TRPC1. C) Representative Western blot of αSMA-TRPC1 interaction after 72h of SMAD2 knock-down using anti-TRPC1 immunoprecipitation antibody with the quantification. D) TRPC1-αSMA interaction was also quantified using anti-αSMA immunoprecipitation antibody as demonstrated in 3 D. E-F) αSMA knocking down disrupts the TRPC1-pSMAD2 complex. Representative Western blot illustrating the effect of 72h αSMA knock-down on TRPC1-pSMAD2 interaction, using E) anti-pSMAD2 and F) anti-TRPC1 immunoprecipitation antibodies, respectively. All values were normalized to the siCtrl condition and reported as mean ± SEM (*p<0.05, **p<0.01, at least N = 3, Student's t-test).

pre-incubated PS-1 cells under high pressure ($\Delta+100$ mmHg) for 24 and 48 hours and evaluated TRPC1 and αSMA expression by Western blotting. 24h of elevated pressure raises TRPC1 protein level 1.4 ± 0.1 -fold (Fig. 4 A-B). However, after 48h of stimulation, pressurization drastically reduces TRPC1 expression by 0.5 ± 0.1 -fold (Fig. 4 A-B), suggesting the existence of an autoprotective cellular mechanism. Simultaneously, we noticed a trend of αSMA expression to rise at 24h post-pressurization (1.4 ± 0.03 -fold) which becomes significant at 48h

(4.2 ± 0.3 -fold, Fig. 4 A/C). Interestingly, the rise of αSMA expression occurs only after that of TRPC1 (Fig. 4 A/C).

We next sought to know whether the pressure-induced increase of TRPC1 expression is correlated with an augmentation of its channel activity. As TRPC1 proteins are non-selective Ca^{2+} -permeable cation channels, we performed Mn^{2+} quenching experiments to measure the Ca^{2+} influx after TRPC1 silencing. We compared Ca^{2+} influx under control conditions with that following pressurization ($\Delta+100$ mmHg).

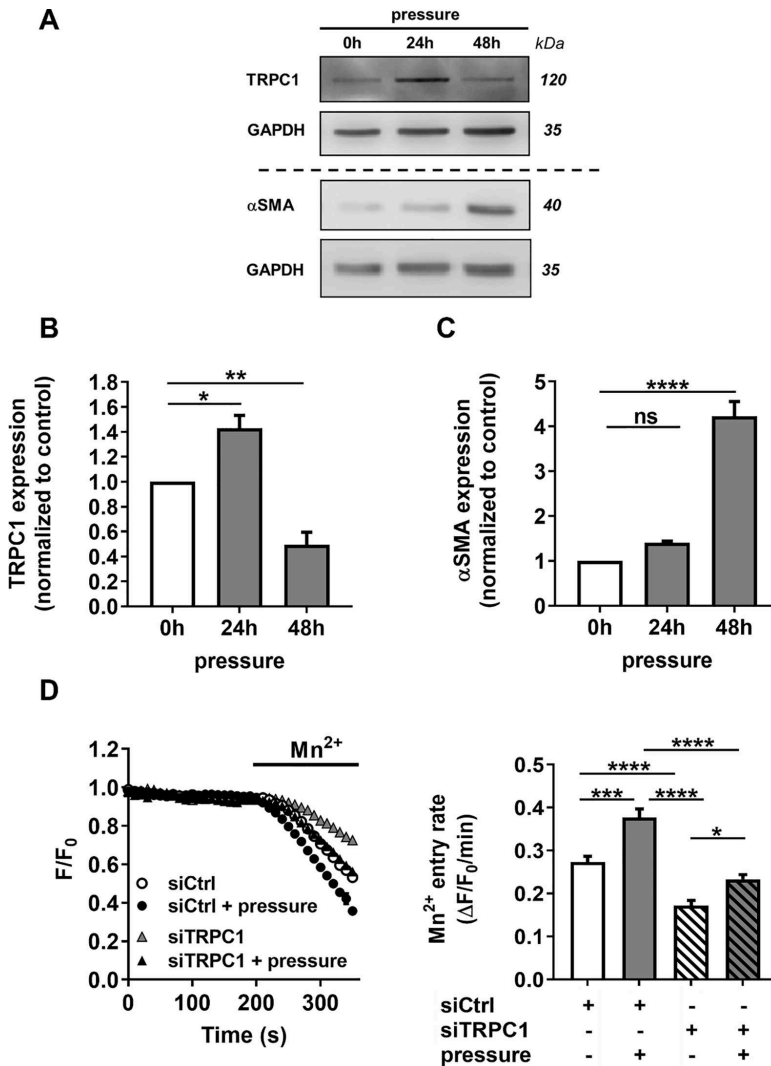


Fig. 4. Elevated pressure stimulates the functional expression of TRPC1 channels as well as αSMA expression in pre-activated human PSCs. A-C) 24h and 48h of pressurization (Δ+100 mmHg) increase both TRPC1 and αSMA expression, respectively in PS-1 cells. A) Representative Western blot of the effect of pressurization and its quantification for B) TRPC1 and C) αSMA expression, respectively (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.0001, ns: no significant, at least N = 3, one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test). All values were first normalized to the reference protein GAPDH and then to the non-pressurized control condition (0h) and reported as mean ± SEM. D) Pressurization for 24h promotes TRPC1-mediated Ca²⁺ influx, which was measured by Mn²⁺ quenching of the fluorescent Ca²⁺ indicator Fura-2 AM in siCtrl and siTRPC1 transfected PS-1 cells. Representative Mn²⁺ quench traces and the quantification of Mn²⁺ entry in siCtrl and siTRPC1 cells under control and pressurized conditions (siCtrl: n = 64, siCtrl + pressure: n = 46, siTRPC1: n = 46, siTRPC1 + pressure: n = 52, N = 3, *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001, one-way ANOVA followed by Kruskal-Wallis multiple comparison test, n: number of cells, N: number of passage). All values were reported as mean ± SEM.

Under control conditions the Mn²⁺ entry rate is reduced from 0.27 ± 0.01 ΔF/F₀/min in siCtrl transfected cells to 0.17 ± 0.01 ΔF/F₀/min in siTRPC1 transfected cells (Fig. 4 D). Elevated external pressure enhances Ca²⁺ influx in siCtrl cells inducing an increase of Mn²⁺ entry rate to 0.38 ± 0.02 ΔF/F₀/min (Fig. 4 D). However, the Mn²⁺ entry rate of pressurized siTRPC1 PSCs is at the same low level (0.23 ± 0.01 ΔF/F₀/min, Fig. 4 D) as in non-pressurized siCtrl cells under control conditions. These results suggest that TRPC1 channels contribute to the pressure-induced Ca²⁺ entry into pre-activated human PSCs.

Based on these results, we can conclude that elevated external pressure increases the functional expression of TRPC1 channels, which in turn stimulates TRPC1-dependent αSMA expression and leads to an enhanced TRPC1-dependent Ca²⁺ entry.

2.5. TRPC1 mediates the activation of SMAD2 and ERK1/2 pathways in pre-activated human PSCs

PSC activation is a dynamic mechanism that is coordinated and triggered by several intracellular signaling pathways [28]. Hence, we speculated that except being involved in αSMA and pSMAD2 interplay, TRPC1 might increase αSMA expression through the activation of one of these signaling pathways in pre-activated human PSCs. We therefore investigated whether the phosphorylation of ERK1/2 and SMAD2 modulates human PSC activation through the regulation of the main activation marker αSMA. We treated PS-1 cells with an inhibitor of ERK1/2 (U 0126; 10 μM) or SMAD2 (SB 431542; 80 μM) activity for 72h. We first evaluated the efficiency of the inhibitors by Western blot.

Treatment with U 0126 reduces ERK1/2 phosphorylation by $31.9 \pm 6\%$ (Supplementary Figure 3 A), whereas SB 431542 treatment induces a $37.4 \pm 9.3\%$ decrease of SMAD2 phosphorylation (Supplementary Figure 3 B). We revealed that SMAD2 inhibition with SB 431542 reduces α SMA protein expression by $76.9 \pm 5.5\%$ (Fig. 5 B). In contrast, the inhibition of ERK1/2 phosphorylation with U 0126 fails to affect α SMA expression (Fig. 5 A).

We then wanted to know whether TRPC1 is able to activate one of the above-cited signaling pathways in order to regulate α SMA expression. We therefore inhibited TRPC1 expression for 72h and assessed SMAD2, ERK1/2 as well as AKT phosphorylation levels by Western blotting. PS-1 cells were kept in FBS(Fetal Bovine Serum)-free media

overnight and then stimulated with 10 % FBS for 10 min. As expected, TRPC1 silencing leads to a decrease of SMAD2 phosphorylation by 57.8 % (siCtrl + 10 min FBS: 1.6 ± 0.1 -fold, siTRPC1 + 10 min FBS: 0.7 ± 0.2 -fold, Fig. 5 C), suggesting that TRPC1 might be involved in this process through its interaction with pSMAD2. Interestingly, knocking-down TRPC1 channels also induces a diminution of ERK1/2 activation by 38.7 % (siCtrl + 10 min FBS: 6.4 ± 0.4 -fold, siTRPC1 + 10 min FBS: 4.0 ± 0.7 -fold, Fig. 5 D). However, it fails to affect AKT phosphorylation (Fig. 5 E). Importantly, for none of the three signaling pathways, TRPC1 silencing influences the total amount of the respective unphosphorylated protein (Fig. 5 C, D & E, right panels). These results demonstrate that TRPC1 channels stimulate the

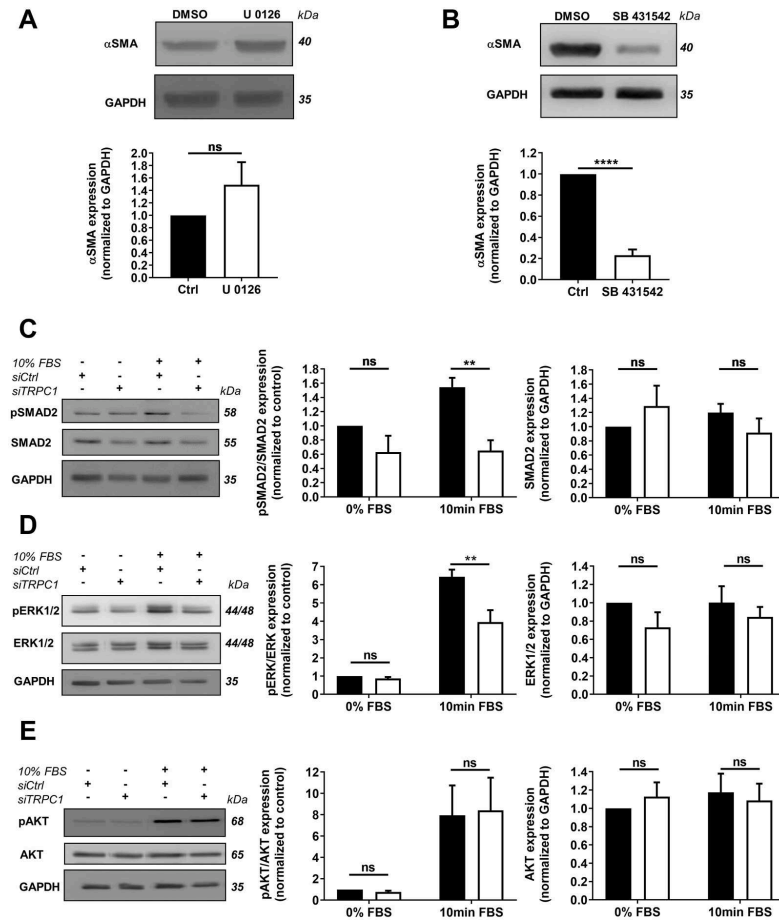


Fig. 5. TRPC1 channels drive human PSC activation through the phosphorylation of SMAD2 and ERK1/2 pathways. A-B) α SMA expression is regulated by the SMAD2 pathway but not ERK1/2 pathway in pre-activated human PSCs. A) Pharmacological inhibition of the ERK1/2 pathway with U 0126 (10 μ M) for 72h does not affect α SMA expression. Representative Western blot of α SMA after U 0126 treatment and its quantification. B) SMAD2 pathway inhibition with the SB 431542 (80 μ M) decreases α SMA expression. Representative Western blot of α SMA after SB 431542 treatment for 72h and its quantification. All values were firstly normalized to the reference protein (GAPDH) and then to the control condition, reported as mean \pm SEM (**** p <0.001, ** p <0.01, ns: no significant, at least N = 3, Student's t-test). C-E) TRPC1 channels promote SMAD2 and ERK1/2 activation but not AKT phosphorylation in pre-activated human PSCs. C) Involvement of TRPC1 in SMAD2 phosphorylation in PS-1 cells. Representative Western blot showing the effect of TRPC1 silencing after overnight FBS(Fetal Bovine Serum) starvation of transfected cells. Cells were then stimulated with FBS for 10 min to evaluate the effect of TRPC1 on SMAD2 phosphorylation which was quantified by the ratio of phosphorylated SMAD2 / total SMAD2 protein. In parallel, the impact of TRPC1 silencing on total SMAD2 protein expression was also evaluated. D) Assessment of ERK1/2 activation after TRPC1 knock-down in PS-1 cells. Representative Western blot showing the effect of TRPC1 knock-down using the phosphorylation protocol described above. ERK1/2 phosphorylation was quantified by the ratio of phosphorylated ERK1/2 / total ERK1/2 protein. E) Impact of TRPC1 knock-down on AKT phosphorylation. Representative Western blot showing the effect of TRPC1 knock-down on AKT phosphorylation using the protocol described above. AKT phosphorylation was quantified by the ratio of phosphorylated AKT / total AKT protein. All

values were firstly normalized to the reference protein (GAPDH) and then to the 0 % FBS control condition. siCtrl conditions are represented in black and siTRPC1 conditions are represented in white. All the experiments were performed 72h post-transfection. Values were reported as mean \pm SEM (* p <0.05, ns: no significant, at least N = 3, two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test).

activation of SMAD2 and ERK1/2 signaling pathways, and that they probably mediate α SMA expression through the SMAD2 pathway in pre-activated human PSCs.

2.6. TRPC1 channels regulate pre-activated human PSC proliferation through an ERK1/2- and SMAD2- dependent pathway

We next sought to know whether TRPC1 channels are involved in typical features of activated PSCs, namely in the proliferation and secretion of growth factors and cytokines [4,5]. We found that TRPC1 silencing inhibits cell proliferation by ~60 % (siCtrl: 100 ± 2.3 %, siTRPC1: 43 ± 1.5 %, Fig. 6 A). We then assessed in which cell cycle phase TRPC1 channels are mostly involved in order to modulate PSC proliferation. Using flow cytometry we noted an increase of cells in G0/G1 phase (siCtrl: 77.2 ± 0.7 %, siTRPC1: 86.1 ± 0.6 %) and a decrease of cells in S phase (siCtrl: 8.4 ± 0.4 %, siTRPC1: 3.9 ± 0.6 %) as well as G2/M phase of the cell cycle phases (siCtrl: 14.4 ± 0.6 %, siTRPC1: 10 ± 0.6 %, Fig. 6 B-C). This points to a cell cycle arrest in

G0/G1 phase. To rule out an effect of silencing TRPC1 channels on cell death, we used Trypan Blue colorimetric assay and an Annexin V / Propidium Iodide apoptosis assay. Both techniques reveal no significant effect of TRPC1 silencing on cell death (siCtrl: 100.0 ± 13.9 %, siTRPC1: 87.2 ± 19 %, Supplementary Figure 4 A) or apoptosis (siCtrl: 3.3 ± 0.5 %, siTRPC1: 6.5 ± 1.8 %, Supplementary Figure 4 B-C).

In parallel we evaluated whether one of the TRPC1-mediated signaling pathways, namely SMAD2 and ERK1/2 is involved in the regulation of PSC proliferation. Inhibition of either ERK1/2 or SMAD2 pathways using the pharmacological inhibitors U 0216 and SB 431542, respectively, produces a comparable effect on PS-1 cell proliferation. Blocking ERK1/2 or SMAD2 activity decreases the proliferation rate by approximately one third (ERK1/2: Ctrl: 100 ± 4.6 %, U 0126: 66.3 ± 2.2 %, Fig. 6 D, and SMAD2: Ctrl: 100 ± 4.7 %, SB 431542: 61.2 ± 1.2 %, Fig. 6 E).

Taken together, these data show the involvement of TRPC1 in the modulation of pre-activated human PSC proliferation by driving the cell cycle progression in G1 phase and G1/S transition, probably through

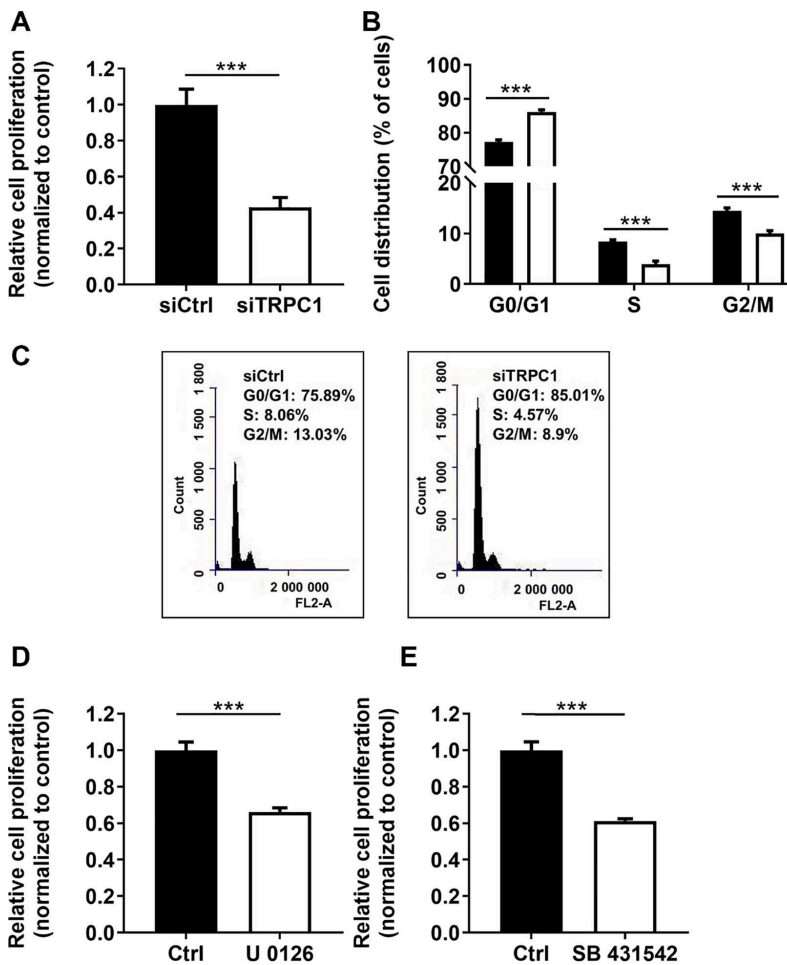


Fig. 6. Role of TRPC1 channels, ERK1/2 and SMAD2 pathways in the regulation of pre-activated human PSC proliferation. A-C) TRPC1 channels regulate pre-activated human PSC proliferation. A) Effect of TRPC1 knock-down on PS-1 cell proliferation, assessed 72h post-transfection by MTT assay ($***p < 0.001$, $N = 4$, Student's *t*-test). B) Impact of TRPC1 on PS-1 cell cycle progression. Cell cycle distribution (G0/G1, S and G2/M) was examined by flow cytometry with propidium iodide staining 72h after transfection ($***p < 0.001$, $N = 3$, two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test). C) Illustrative representation of cell cycle profile 72h after TRPC1 inhibition. Values are reported as mean \pm SEM, each experiment was performed in triplicate. D-E) Both ERK1/2 and SMAD2 pathways are involved in regulating the proliferation of human PSCs. D) Role of ERK1/2 pathway in PS-1 cell proliferation. Cells were treated with the ERK1/2 inhibitor U 0126 (10 μ M) for 72h. The inhibition of ERK1/2 pathway decreases PS-1 proliferation which was assessed with an MTT assay. E) Involvement of SMAD2 pathway in PS-1 cell proliferation. Cells were treated with the SMAD2 inhibitor SB 431542 (80 μ M) for 72h. The impact of SMAD2 inhibition on PS-1 proliferation was evaluated with an MTT assay. All values were normalized to the respective control values after 72h and reported as mean \pm SEM ($***p < 0.001$, $N = 3$ and all MTT experiments were performed in triplicate for each passage, Student's *t*-test).

both ERK1/2 and SMAD2 pathways.

2.7. TRPC1 channels regulate IL-6 secretion through the ERK1/2 and SMAD2 pathways in pre-activated human PSCs

We focused on IL-6 which is one of the most abundantly secreted cytokines by activated PSCs [29]. We measured the cytokine secretion by ELISA assay after 72h of TRPC1 silencing. TRPC1 knock-down causes a diminution of IL-6 secretion by more than 50 % (siCtrl: 100.0 ± 13.5

%, siTRPC1: 42.6 ± 4.7 %, Fig. 7 A).

Subsequently, we also studied the impact of ERK1/2 and SMAD2 inhibition on IL-6 secretion. Inhibition of the two pathways independently elicits similar effects on IL-6 secretion. PS-1 treatment with the ERK1/2 blocker U 0126 leads to 40.1 % diminution of IL-6 secretion (Ctrl: 100.0 ± 15.7 %, U 0126: 59.9 ± 5.7 %, Fig. 7 B), and the SMAD2 blocker SB 431542 elicits a decrease of IL-6 secretion by 67.9 % (Ctrl: 100.0 ± 12.4 %, SB 431542: 32.1 ± 10.6 %, Fig. 7 C).

Together these data suggest that TRPC1 channels regulate IL-6

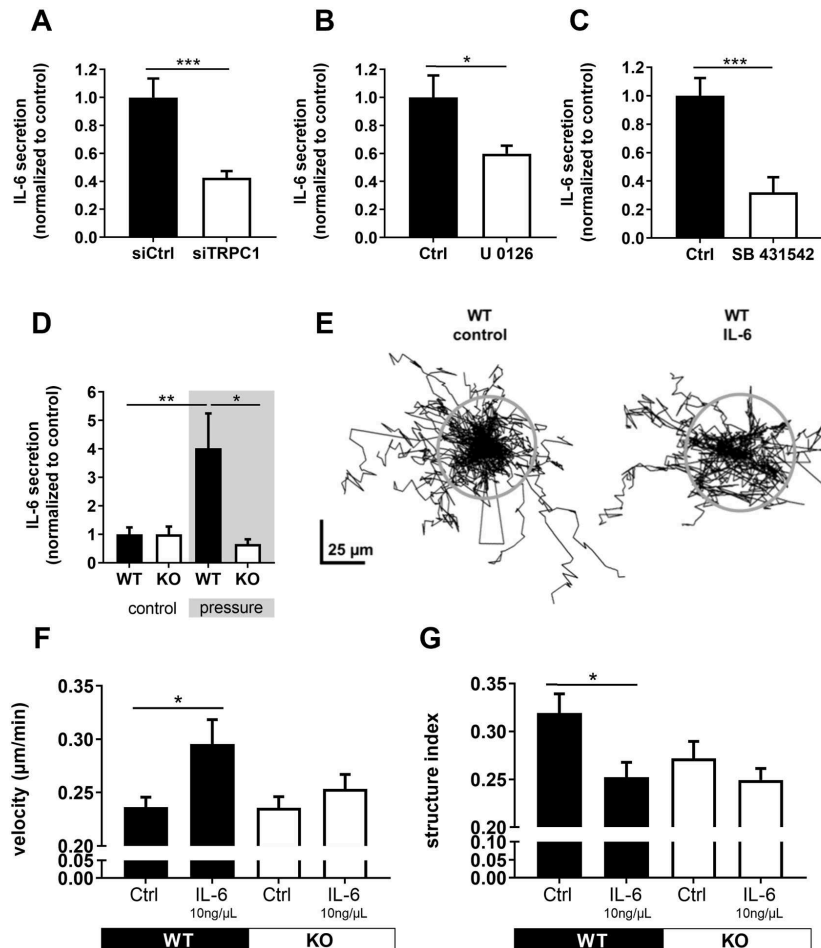


Fig. 7. TRPC1 channels regulate IL-6 secretion probably through both ERK1/2- and SMAD2-dependent pathways. In turn, the secreted IL-6 promotes PSC migration via an autocrine feedback loop. A) Silencing of TRPC1 decreases IL-6 secretion. Pharmacological inhibition of B) ERK1/2 pathway with U 0126 (10 µM) and of C) SMAD2 activity using the SB 431542 inhibitor (80 µM) decreases IL-6 secretion. All values were normalized to the control condition and reported as mean ± SEM (**p<0.001, *p<0.05, N = 3, each experiment was performed at least in triplicate, Student's t-test). D-E) Pressurizing PSCs stimulates TRPC1-dependent IL-6 secretion. D) IL-6 secretion was analyzed after PSCs were cultured at increased ambient pressure (Δ+100 mmHg) for 24h. IL-6 secretion was normalized to the respective control groups. Secretion of IL-6 is markedly increased in pressurized WT PSCs. In contrast, TRPC1-KO PSCs do not respond to increased pressure with elevated cytokine secretion (N = 6; *p<0.05 WT vs. TRPC1-KO, control vs. pressure). E) Autocrine effects of IL-6 on PSCs migration were analyzed in the absence (control) or presence of IL-6 for a 6h period. Trajectories of individual WT PSCs normalized to common starting points are shown. The grey circles represent the mean translocation of the cells covered during the course of the experiment. F) IL-6 (10 ng/µL) increases the migration velocity of WT PSCs, but not of TRPC1-KO PSCs. G) Structure index of WT but not of TRPC1-KO PSCs is reduced after stimulation with IL-6 indicating a more extended morphology of the PSCs (N = 4, n = 50-63; *p<0.05, control vs. cytokine).

secretion of pre-activated human PSCs probably through both, ERK1/2 and SMAD2 signaling pathways.

2.8. Autocrine effects of IL-6 on murine PSC migration

We next studied whether pressure-induced activation of PSCs also leads to altered secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 in a TRPC1-dependent way. IL-6 secretion of WT PSCs increases following 24h of pressurization. Notably, TRPC1-KO PSCs do not respond to the pressure treatment with an increased cytokine secretion (Fig. 7 D). Thus, IL-6 secretion of pressurized WT PSCs is significantly higher than that of the PSCs from TRPC1-KO littermates.

To evaluate the autocrine effect of pressure-induced cytokine secretion on PSCs, we performed migration experiments in the absence and presence of IL-6 (10 ng/μL). Stimulation with IL-6 leads to increased PSC migration. The trajectories of individual PSCs are depicted in Fig. 7 E. IL-6 accelerates the migration velocity of WT PSCs (Ctrl: 0.23 ± 0.01 μm/min vs. IL-6: 0.29 ± 0.02 μm/min), but not of TRPC1-KO PSCs (Ctrl: 0.24 ± 0.01 μm/min vs. IL-6: 0.25 ± 0.01 μm/min, Fig. 7 F). Accelerated migration is accompanied by changes of PSC morphology. IL-6-treated WT PSCs acquire a more elongated shape as evidenced by a decrease

of the structure index (Ctrl: 0.32 ± 0.02 vs. IL-6: 0.25 ± 0.02). This is not the case in TRPC1-KO PSCs (Ctrl: 0.27 ± 0.02 vs. IL-6: 0.25 ± 0.01, Fig. 7 G).

2.9. Impact of TRPC1 channels on murine PSC function under pressure

Finally, we determined the mechanical properties of PSCs themselves and analyzed the elasticity of PSC lamellipodia using the nano-indentation method (Fig. 8 A). Bulk stiffness of WT PSCs rises upon pressure treatment from 1.25 ± 0.12 kPa to 1.75 ± 0.15 kPa (Fig. 8 A-B). In TRPC1-KO cells there is no change in bulk stiffness following pressurization (1.38 ± 0.11 vs. 1.1 ± 0.09 kPa). Thus, WT PSCs are ~30 % stiffer (Δ +0.68 kPa) than TRPC1-KO PSCs after culturing them at an elevated pressure.

Increase in cell stiffness of pressurized WT PSCs is accompanied by an increased traction force exerted onto the surrounding matrix. We analyzed this by traction force microscopy (Fig. 8 C). Pressure leads to an increase of force exerted by each PSC by 61.5 % (WT Ctrl 179.4 ± 17.3 pPa per cell; pressure 291.5 ± 25.9 pPa per cell). This effect cannot be observed in TRPC1-KO PSCs (Fig. 8 D; Ctrl: 212.0 ± 22.8 pPa per cell; pressure 153.0 ± 27.6 pPa per cell).

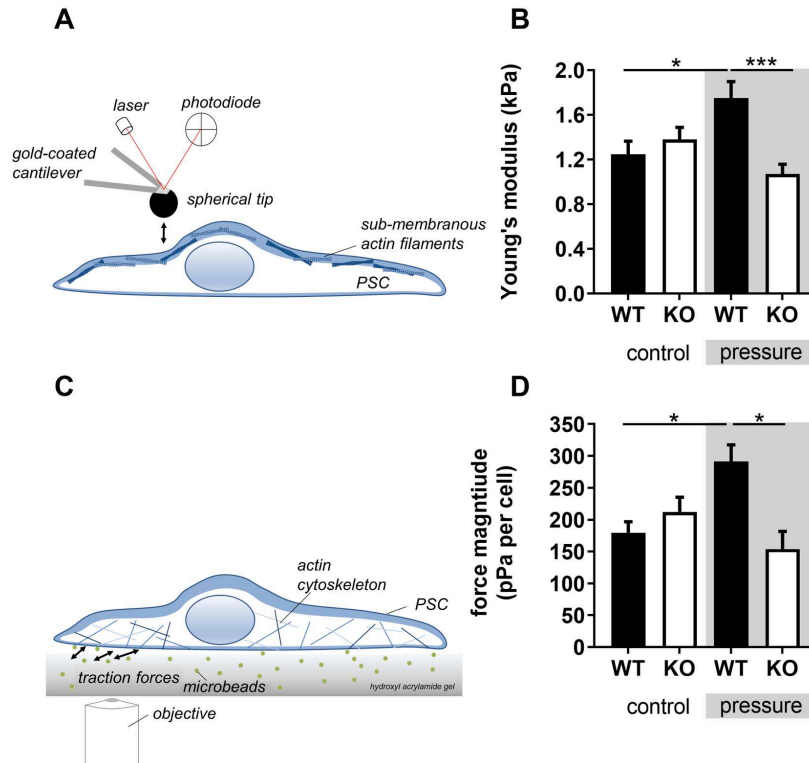


Fig. 8. Pressure incubation increases stiffness and traction forces TRPC1-dependently. A) Scheme of AFM measurements. After approaching the cell surface the flexible cantilever encounters the cortical actin layer. The bending of the cantilever is detected by a reflected laser beam on a photodiode. Analysis of force-distance curves evaluates distinct slopes, indicating cell mechanics. B) AFM-based measurements of cell stiffness reveal increased cortical stiffness in pressure-treated WT PSCs, but not in TRPC1-KO cells (N = 4-5, n = 45-60, *p<0.05, WT vs. TRPC1-KO). C) Scheme of traction force microscopy. Traction forces are measured by quantifying the displacement of microbeads embedded in the underlying hydrogel. Cell traction on the gel is assessed by acquiring images of the gel/microbeads before and after removing the cell. D) Pressure-stimulated WT cells exert higher forces onto the underlying matrix than under control conditions. Traction forces of TRPC1-KO PSCs are not affected by pressurization (N = 3, n = 8-11, *p<0.05, WT vs. TRPC1-KO).

The results shown in Fig. 8 clearly demonstrate that TRPC1 channels do not only contribute to sensing mechanical cues from the microenvironment. They also modulate the mechanical output of PSCs.

3. Discussion

PSC activation plays a crucial role in PDAC development and progression since the dense PSC-derived fibrotic stroma encloses the cancer cells and provides them with essential cytokines, growth factors, and nutrients indispensable for their early spreading [6,30]. This PSC-driven encapsulation is in part responsible for the 10-fold increased tissue pressure observed in PDAC which in turn activates and/or maintains PSC activation through a positive mechanical feedback cycle [31]. Therefore, it seems that interrupting the mechanical activation of PSCs might be a potential route in the battle against PDAC.

In the current study we highlighted the importance of TRPC1 channels in PSC activation and function. We focused especially on the impact of an elevated pressure which is a characteristic mechanical feature of PDAC microenvironment. We showed that TRPC1 channels mediate in part PSC activation under high pressure by promoting α SMA expression in mouse and human PSCs (Figs. 1 & 4). In turn, the elevated pressure changes the mechanical behavior of PSCs themselves by increasing their stiffness and the emitted traction forces in a TRPC1-dependent manner (Fig. 8). We also reported for the first time that TRPC1 channels regulate α SMA expression by cooperating with the phosphorylated form of SMAD2 (Figs. 2 & 3). Moreover, we demonstrated that TRPC1 modulates i) PSC proliferation via the G1/S and S/G2 cell cycle phase transition, and ii) IL-6 secretion, through an ERK1/2- and SMAD2-dependent pathway (Figs. 5, 6 & 7).

TRPC1 channels belong to the large family of TRP channels. They are non-selective cation channels that play among others a significant role in Ca^{2+} homeostasis, notably by regulating the Store-Operated Calcium Entry (SOCE) in association with Orai1 and STIM1 proteins, and they are relevant in the metastatic cascade in cancer [32–34]. However controversial debate evidence shows that TRPC1 mediates Ca^{2+} influx not only following an endoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion promoting SOCE but also in response to mechanical stimulation in several cell types [35–39]. Indeed, more recently we showed that SOCE through Orai1 channels plays a crucial role in the modulation of PSC activation in PDAC [40]. In addition, we previously demonstrated that TRPC1 drives Ca^{2+} influx into murine PSCs in response to an elevated ambient pressure supporting the evidence that TRPC1 is involved in mechanosensation [19]. We confirmed these data for pre-activated human PSCs, showing the increased functional expression of TRPC1 under elevated pressure conditions (Fig. 4). Nevertheless, it will be interesting to evaluate in future studies whether TRPC1 channels could have a dual role in PSC by participating also in the SOCE through their interaction with Orai1 and/or STIM1 proteins leading to the regulation of PSC activation.

More importantly, we revealed that TRPC1 channels contribute to the altered cell functions in response to the pressure stimulus. The increased hydrostatic pressure renders WT-PSCs stiffer in a TRPC1-dependent manner. Such cell stiffening in response to elevated hydrostatic pressure has also been shown in endothelial cells. This was linked to Ca^{2+} -mediated myosin activation and increased actin polymerization driven by mechanosensitive ion channels. The molecular nature of these channels, however, remained elusive [41]. Furthermore, we demonstrated that this TRPC1-mediated PSC stiffening following pressurization is accompanied by higher tension forces exerted by PSCs to the surrounding extracellular matrix (ECM) (Fig. 8). These changes of PSC mechanics might lead to mechanical reorganization of the PDAC microenvironment, and thus further promote PDAC progression. This idea is supported by previous observations from our laboratory. Activation of Piezo1, a mechanosensitive channel, leads also to increased PSC-induced tension on the surrounding ECM that facilitates PSC migration and detachment [42]. Our present study provides mechanistic

insight into how TRPC1 channels mediate these cellular mechanical changes in PSCs in response to pressure.

We observed that the increasing hydrostatic pressure clearly accelerates the initial activation of murine PSCs within the first 48h as evidenced by the increasing expression of α SMA, which is considered as the main activation marker of PSCs [6]. At later time points the effect of elevated pressure levels off so that control and pressurized PSCs reach the same level of activation (Fig. 1). This can be explained by the *ex vivo* activation of freshly isolated PSCs that is triggered by the stiff substrate of cell culture dishes and the ensuing positive autocrine feedback stimulation of activated PSCs [26,43]. Notably, the pressure-induced acceleration of the activation is absent in TRPC1-KO PSCs. So far, there is few evidence of which mechanosensory proteins play a role in the activation of quiescent PSCs [44]. Based on our results, TRPC1 channels are also one of the mechanosensory proteins driving at least in part the transdifferentiation of quiescent to activated PSCs in response to altered mechanical conditions. Moreover, TRPC1-mediated PSC activation through the expression of α SMA might also participate in the reorganization of α SMA into stress fibers, which could explain in part how TRPC1 channels mediate PSC stiffening and -increased traction forces in response to pressurization.

TRPC1 channels regulate α SMA expression in human PSCs by physically interacting with α SMA. This protein network is supported by the phosphorylated (= active) form of SMAD2 that colocalizes and physically associates with both TRPC1 and α SMA. Interestingly, the knock-down of one of these three proteins each has a varying effect on the interaction of the remaining 2 partners. This argues for a different degree of participation of each partner within the complex. Consequently, TRPC1 silencing leads to a reduction of SMAD2 phosphorylation as well, suggesting that it acts as a positive upstream regulator of the SMAD2 pathway (Fig. 2 & 3). This latter is one of the major signaling pathways that control PSC activation, mainly through the regulation of α SMA expression [25]. Thus, we revealed for the first time that TRPC1 mediates/maintains PSC activation by regulating α SMA expression through its interaction with the TRPC1-dependently phosphorylated form of SMAD2.

Besides the high α SMA expression, activated PSCs are characterized by an increased proliferative and secretory potential [1,3]. In the present work, we revealed that inhibition of TRPC1 channels results in a decrease of PSC proliferation. The involvement of TRPC1 in the regulation of cancer cell proliferation is well described [45,46]. Knowledge on its role in cancer-associated fibroblasts, i.e. also in PSCs has been missing so far. We showed that TRPC1 channels regulate the proliferation of PSCs by controlling the cell cycle progression in G1 and G2 phases (Fig. 6).

Furthermore, we noted that TRPC1 knock-down in human PSCs decreases IL-6 secretion. The impact on IL-6 secretion by TRPC1 channels is even more pronounced when mouse PSCs are exposed to increased pressure. IL-6 is a very important pro-inflammatory cytokine in PDAC. High IL-6 concentrations have been found in PDAC cell lines but also in the serum of patients with PDAC. The elevated IL-6 serum level is correlated with PDAC severity [16,47,48]. In addition, secretion of IL-6 by the activated PSCs promotes pancreatic cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition [49,50]. Here, we showed that the secreted IL-6 can also impact PSC activation through an IL-6-mediated positive autocrine feedback loop. Treatment with IL-6 augments TRPC1-dependently PSC migration velocity which is accompanied by the acquisition of a more elongated cell shape (Fig. 7).

All these PSC activation processes are coordinated and controlled by multiple dynamic intracellular signaling pathways [28]. According to our results, TRPC1 channels are crucial for the activation of two of the major signaling pathways underlying PSC activation: the ERK1/2 and SMAD2 pathways. Our data highlight the involvement of TRPC1 in the regulation of PSC proliferation and IL-6 secretion through the activation of both ERK1/2 and SMAD2 pathways (Fig. 5, 6 & 7). Such a role of TRPC1-mediated ERK1/2 and SMAD2 pathways has not been known in

the modulation of IL-6 secretion.

4. Conclusion

In conclusion, our study discloses the importance of TRPC1 channels through their mechanosensing ability in PSC activation. Many of the TRPC1-dependent effects appear to involve ERK1/2 and SMAD2-dependent pathways. We suppose that TRPC1 might regulate these two pathways in a Ca²⁺-dependent and/or a Ca²⁺-independent manner. The ERK1/2 pathway is often activated by the Ca²⁺/calmodulin complex, whereas the SMAD2 pathway has been shown to be inactivated by this complex [51]. Furthermore, we showed that TRPC1 channels colocalize and interact physically with αSMA and the phosphorylated active form of SMAD2, resulting in the regulation of αSMA expression. More importantly, we demonstrated that high pressure increases transiently TRPC1 expression leading to a further promotion of PSC proliferation, αSMA expression and IL-6 secretion in the sense of a positive feedback. This positive feedback cycle also involves the TRPC1-dependent mechanical output of PSCs (Fig. 9). Although not shown in the current study it is conceivable that increased tension exerted by PSCs onto the extracellular matrix contributes to maintaining their mechanical activation. Finally, the increased tension could ease the migration and invasion of pancreatic cancer cells along the straightened matrix fibers. In such a scenario TRPC1 channels in PSCs would ultimately contribute to PDAC progression.

5. Materials and methods

5.1. Animals

Experiments were performed with primary murine pancreatic stellate cells (PSCs). PSCs were isolated from 8-12 weeks old male/female 129Sv/C57BL/6J WT and TRPC1-KO mice [52]. Experimental protocols

were approved by the local committee for animal care (ref no. 84-02.05.50.15.010).

5.2. Isolation of murine PSCs

Primary murine pancreatic stellate cells were isolated as described previously [19,53]. Mice were anaesthetized with isoflurane and sacrificed by subsequent cervical dislocation. The pancreata were removed and briefly washed in cold balanced salt solution (GBSS, Pan-Biotech GmbH) before homogenization. Homogenates were then transferred to 3 mL GBSS with 0.1 % collagenase P (Roche Applied Science) and incubated at 37°C for 25 min on a shaker. After re-suspending and adding GBSS to a final volume of 8 mL cells were centrifuged (8 min, 220 x g), re-suspended in pre-warmed cell culture media (DMEM/F12, Sigma Aldrich; 10 % Fetal Calf Serum-Gold, GE-Healthcare; 1 % penicillin/streptomycin, Biochrom) and seeded onto a FCS-Gold-coated tissue culture dish. Cells were incubated for 2h in the incubator, with subsequent forceful washing steps with warm culture media. After each washing step cells were observed under the microscope to ensure optimal purity. Freshly isolated PSCs were incubated for 5-6 days until first passaging. Cells were used for experiments after two passages. Experiments analyzing the pressure effect on the initial activation of PSCs were done with freshly isolated PSCs within 6h after the isolation.

5.3. PSC cell lines

Activated human pancreatic stellate cell line, PS-1 was obtained from a healthy donated human pancreas and immortalized as previously described [54]. PS-1 cells were kindly provided by Pr Hemant M. Kocher, from the Queen Mary University of London. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12, Gibco, Thermo Fischer Scientific, France) supplemented with 10 % of Fetal Bovine Serum (FBS, Pan Biotech, Dominique

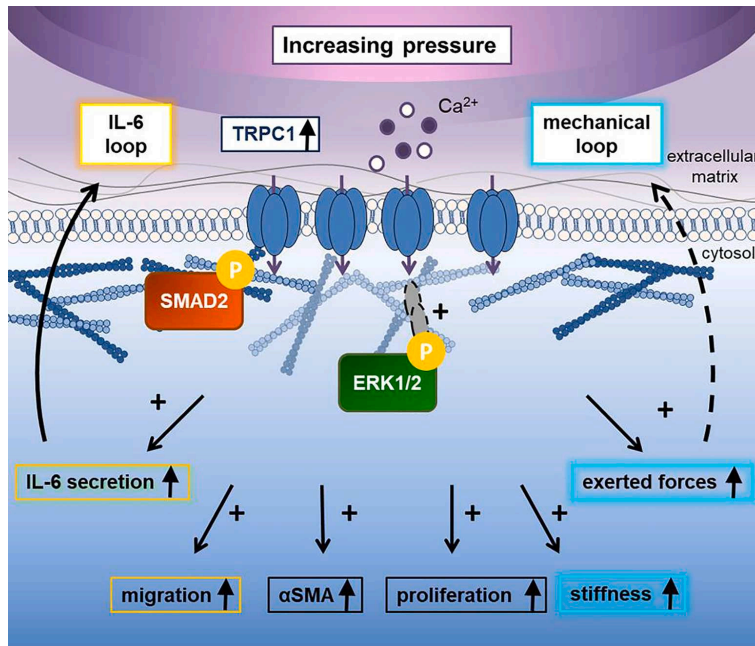


Fig. 9. Conclusive scheme: Increased hydrostatic pressure enhances TRPC1 channel expression and activation resulting in an increased Ca²⁺ influx into PSCs. Pressure-mediated TRPC1 activation modulates PSC activation by promoting αSMA expression and PSC proliferation in cooperation with the phosphorylated form of SMAD2. Moreover, the increased pressure promotes TRPC1-mediated IL-6 secretion through an ERK1/2 and SMAD2-dependent pathway, which in turn accelerates PSC migration forming an IL-6 mediated autocrine feedback loop. Furthermore, PSCs increase their cellular stiffness, migratory capacities, and exerted tension forces in response to the elevated pressure in a TRPC1-dependent manner, forming a mechanical feedback loop.

Dutscher, France). PS-1 were kept at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and cell culture medium was changed every 48 hours.

5.4. Cell transfection and RNA interference

Small interfering RNAs (siRNA) were introduced into cells by electroporation, using the nucleofection technology (Amaxa Biosystems, Lonza, Aubergenville, France). 10⁶ cells were transfected according to the manufacturer's protocol with 4 µg of scrambled siRNA as control (siCtrl: duplex negative control, Eurogentec), or with siRNA directed against *TRPC1* (siTRPC1, ON-TARGET plus SMART pool siRNA, Dharmacon Research, Chicago, IL), *α-SMA* (siαSMA: 5'-GGGCU-GUUUCCCAUCCAU-3', Eurogentec) or *Smad2* (siSmad2: 5'-GUCCCAUGAAAAGACUUA-3', Eurogentec). Cells were used for the experiments 72h after the siRNA transfection.

5.5. Chemical reagents

Pharmacological inhibitors used to study the signaling pathways, after 72h of treatment, were the following: U 0126 monoethanolate (10 µM, 72h, Sigma-Aldrich) and SB 431542 (80 µM, 72h, Sigma-Aldrich).

5.6. Pressure incubation

Pressure incubation of WT and TRPC1-KO PSCs was performed in a custom-made pressure chamber at +100 mmHg / +13.3 kPa above ambient atmospheric pressure (760 mmHg / 101.3 kPa) for at least 24h and up to 120h. A 29lexiglas chamber, fitting into a standard cell culture incubator, was pressurized with a humidified atmosphere using an air pump system and monitored continuously with a digital barometer. For control experiments, cells were incubated in the same chambers at atmospheric pressure (760 mmHg / 101.3 kPa). Increasing the ambient pressure in the chamber by 13 % (with respect to the atmospheric pressure) produces no measurable changes of the medium pH [19].

5.7. Cell proliferation assay

MTT colorimetric assay was used to assess the cell proliferation using 6-well plates (8 × 10⁴ seeded PS-1 cells per well), 72 hours post siRNA transfection or post pharmacological treatment with inhibitors. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, Inc.) was solubilized in culture medium (0.5 mg/mL), before cell incubation at 37°C in the dark for 45 min. Once entered in the cells, MTT is converted to formazan crystals, which are thereafter dissolved by culture medium replacement with dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Inc.) giving a violet staining. The absorbance was read at 550 nm using the Infinite® 200 Pro reader (Tecan Trading AG).

5.8. Cell cycle analysis

Cell cycle evaluation was performed by quantifying the cellular DNA content by means of flow cytometry. 72h siTRPC1 or siCtrl transfected cells (1 × 10⁶) were fixed with cold absolute ethanol (≥ 99.8%, Sigma-Aldrich) at 4°C for a minimum of 6h. Then they were pelleted, resuspended in 5 mM EDTA / PBS, treated with 20 mg/mL RNase A (Sigma-Aldrich) at room temperature for 30 min, and stained with propidium iodide (50 mg/mL, Sigma-Aldrich). Thereafter, samples were directly analyzed by flow cytometer (Accuri®) and the cell percentage in each cell cycle phase was determined using the Cyflog software.

5.9. Cell mortality

Trypan Blue exclusion assay was used to evaluate PS-1 cell death. Cells were seeded in 35 mm petri-dishes (8 × 10⁴ cells) for 72h after siRNA transfection. Then they were trypsinized, diluted in Trypan Blue solution (Sigma-Aldrich) and counted six times using Malassez's cell

counting method. Cell mortality was determined using the formula below: rate of cell death = number of dead cells / number of total cells, normalized to each control condition.

5.10. Apoptosis analysis

The cell surface exposure of phosphatidylserine on the outer leaflet of the plasma membrane was utilized to assess apoptosis, since this is an early marker of apoptotic cell death. Cells (detached and adherent cells) were collected 72h after the siRNA transfection, pelleted, washed twice with ice-cold PBS and resuspended in 1 × binding buffer (BD Biosciences Pharmingen). Following the PE Annexin V Apoptosis Detection Kit staining protocol (BD, Biosciences Pharmingen), we added FITC Annexin V and propidium iodide (PI) to the cell preparations and incubated them at 25°C in the dark for 15 min. Binding buffer was then added to each tube and samples were directly analyzed by the flow cytometer (Accuri®) in order to determine the percentage of apoptotic cells. The following controls were used to set up the compensation and quadrants: unstained cells, cells stained only with FITC Annexin V and cells stained only with PI.

5.11. Migration assay

In order to evaluate whether the cytokine secretion of PSCs causes their autocrine activation, we performed live-cell imaging experiments to monitor PSC migration as described previously [19]. PSCs were seeded in coated tissue culture flasks (~27,000 cells per flasks, 12.5 cm²) as described before [55]. The matrix coating mimics desmoplastic regions in PDAC. Polymerization of the desmoplastic matrix was done overnight in the tissue culture incubator prior to seeding PSCs. Prior to the experiment, culture medium was changed to HEPES-buffered RPMI (Sigma-Aldrich) without or with addition of IL-6 (10 ng/µL), flasks were sealed and transferred to preheated (37°C) microscopy chambers. Cell migration was recorded over 6h in 5 min intervals using time-lapse video microscopy. Afterward cell outlines were segmented with the Amira Imaging Software Version 2.2 (Template Graphics Software, Mercury Communication Systems, Carlsbad, US), a self-made Java program and the National Institutes of Health Image J Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Based on segmented cell contours, migratory velocity (in µm/min) was calculated as the movement of the cell center as a function of time. To evaluate the effect on cell morphology, structure index was calculated. More circular PSCs have an index close to 1 and more elongated, star-shaped cells tend towards 0.

5.12. Western blot and Co-immunoprecipitation

RIPA buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 10 mM PO₄Na₂/K, pH=7.4) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), 5 mM sodium orthovanadate and 2 mM EDTA, was added to lyse the cells. Thereafter, the Bicinchoninic Acid protein assay (Bio-Rad) was utilized to determine the protein concentration of the sample. Each sample was loaded (30µg of protein lysate) were used for standard Western blotting) and separated by the denaturing SDS-PAGE, and then transferred onto nitrocellulose membrane (Hybond, GE Healthcare). Blocking of the nonspecific binding sites was done with 3% bovine serum albumin at room temperature for at least 1h, followed by overnight incubation of the membranes with the primary antibody at 4°C. The primary antibodies used were anti-TRPC1 (1:1000, Abcam, #ab51255), anti-αSMA (1:1000, Abcam, #ab7817), anti-GAPDH (1:4000, Abcam, #ab8245), anti-SMAD2 (1:1000, Abcam, #ab40855), anti-p-SMAD2 (phospho S255) (1:1000, Abcam, #ab188334), anti-ERK1/2 (1:500, Cell Signaling, #9102), anti-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (1:500, Cell Signaling, #9101), anti-Akt (1:500, Cell Signaling, #9272) and anti-p-Akt (Ser473) (1:500, Cell Signaling, #9271). The secondary antibodies used, were coupled to horseradish peroxidase, leading to protein band detection through an enhanced

chemiluminescence kit (Ozyme). The Bio-Rad image acquisition software (Quantity One) was used for the quantification of protein bands via a densitometric analysis option, and all the results were normalized to GAPDH as reference protein.

For co-immunoprecipitation experiments, precleared protein A sepharose magnetic beads (Millipore, PureProteome™) were incubated with 500 µg of protein lysate (per condition) at 4°C for 90 min. The beads were then removed, and the samples were incubated with the primary antibody at 4°C overnight. The dilutions of primary antibodies used for the co-immunoprecipitation experiments were anti-TRPC1 and anti-p-SMAD2 (phospho S255) 1 :100 (Abcam) and for anti-αSMA 1 :200 (Abcam). The next day the antigen-antibody complex was precipitated with protein A sepharose magnetic beads (Millipore, PureProteome™) at 4°C for 1h. After denaturation, proteins were used as for standard Western blot.

5.13. Immunostainings

Primary murine PSCs: Directly after isolation PSCs were seeded onto poly-L-lysine coated coverslips (30.000 cells on 20 mm coverslips). They were given a 2h time period for adhesion. This time point, in total 6h after the isolation of pancreata, marked the starting point ($t = 0h$) of the experiments which examined the time course of PSC activation. PSCs fixed at $t = 0h$ were considered as quiescent PSCs. Samples from the control group (ambient pressure) and the pressurized group were collected at $t = 24h, 48h, 72h$ and $120h$.

PSCs were washed twice with PBS and fixed with 3.5 % paraformaldehyde at room temperature for 1h. Fixation was stopped with 0.1 mM glycine for 10 min. For Vitamin A stainings, cells were incubated with 25 µM Nile Red in a wet chamber for 15 min as described earlier [53]. After washing with PBS, cell nuclei were stained with DAPI (1 µg/mL), and coverslips were mounted on glass slides.

For αSMA stainings, fixed PSCs were rinsed with PBS and permeabilized using 0.5 % Triton-X100 in PBS for 10 min. PSCs were blocked with 10 % normal goat serum for 1h and subsequently incubated with the primary antibody against αSMA (anti-mouse, 1:400 in blocking solution, Sigma Aldrich, #A2547) overnight at 4°C. The coverslips were then washed with PBS and incubated with appropriate secondary Alexa488-conjugated antibody (1:400 in blocking solution for 1h). Cell nuclei were stained with DAPI (1 µg/mL), and coverslips were mounted on glass slides. For image acquisition we used an Axiovert 200 microscope (40 x) connected to a RT-SE-Spot camera (Visitron Systems) and controlled by Metaview software.

PS-1 cells: They were first gently washed twice with PBS solution (pH=7.4, Sigma-Aldrich) and then fixed using 4 % paraformaldehyde diluted in PBS at room temperature for 20 min. Cells were after permeabilized with 0.1 % of saponin diluted in PBS for 10 min, washed three times with PBS, blocked with 5 % bovine serum albumin diluted in PBS (blocking solution) for 45 min and then incubated with the primary antibody at 4°C overnight. We used the following primary antibodies: anti-TRPC1 (1:200; Alomone Labs - anti-rabbit, #ACC-010) and anti-TRPC1 (1:50; Santa Cruz - anti-mouse, #sc-133076), anti-p-SMAD2 (phospho S255; 1:200; Abcam, #ab188334) and anti-αSMA (1:1000; Abcam, #ab7817). Thereafter, the coverslips were incubated at room temperature with the secondary antibody for 45 min. For TRPC1 (anti-rabbit) and p-SMAD2 detection, a secondary AlexaFluor® 550 conjugated antibody (1:200; IgG DyLight, Thermo Fischer Scientific, # 84541) was used, and for αSMA and TRPC1 (anti-mouse) detection, a secondary AlexaFluor® 488 conjugated antibody (Invitrogen, # A-11029) was used at 1:1000 and 1:50 dilution, respectively. Both, primary and secondary antibodies were diluted in the blocking solution. The immunofluorescence staining was made in a sequential way for the double labeling. At the end DAPI (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) staining was used to mark the nucleus, before mounting coverslips on glass slides. The fluorescence image acquisition was made with a confocal microscope LSM710 and ZEN software (Carl Zeiss MicroImaging) and images were

analyzed with Fiji Image J software.

5.14. Cytokine quantification

For quantification of cytokine secretion, cell culture supernatants of pressurized and control WT and TRPC1-KO PSCs (pre-activated, passage 2 after isolation) were collected after 24h of stimulation. The concentration of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 (IL-6) was measured with the LEGENDplex Kit (Biolegend) according to the manufacturer's instructions as described before [56].

PS-1 cell culture supernatants were collected 72h after siRNA transfection or treatment with the pharmacological inhibitors and used for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantify IL-6. IL-6 supernatant concentration was measured based on the technical protocol provided by the suppliers (Invitrogen, # 88-7066-86). The absorbance obtained by the colorimetric reaction revealing IL-6 quantity in the supernatant was measured at 450 nm.

5.15. Ca^{2+} influx measurements

Ca^{2+} influx into the cells was quantified using the Mn^{2+} quench technique as described before [19,42,55,57]. Mn^{2+} influx largely mimics Ca^{2+} entry as it enters cells via similar pathways. In contrast to Ca^{2+} ions, Mn^{2+} ions quench the fluorescence emission of the Ca^{2+} sensitive dye Fura-2 AM which we employed for these experiments. The Mn^{2+} -induced decrease of the Fura-2 AM fluorescence intensity is largely proportional to the transmembrane influx of Ca^{2+} .

PS-1 cells were stained with 6 µM of the Ca^{2+} indicator Fura-2-AM (#F1221, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, US) at 37°C in HEPES buffered solution for 20 min. PS-1 were visualized using an ionic imaging setup consisting of a fluorescence microscope, a high-speed shutter and a polychromator (Visitron Systems, Puchheim, Germany). The proper isosbestic excitation wavelength, at which the emission is Ca^{2+} independent, was determined in pilot experiments to be 357 nm and fluorescence emission was recorded at 510 nm. Images were acquired in 10 sec intervals. Each experiment started with an initial 3 min incubation in Ringer's solution, followed by another 3 min incubation in a Ca^{2+} -free, Mn^{2+} supplemented Ringer's solution (Mn^{2+} Ringer's). The Mn^{2+} concentration in Mn^{2+} Ringer's was 400 µM.

Data analysis was performed by measuring fluorescence intensities over the whole cell area and correcting it for background fluorescence. The extracted fluorescence intensity F was normalized to the initial fluorescence intensity F_0 determined under control conditions in the presence of Ringer's solution (F/F_0). For each cell, the slope of linear regression ($\Delta F/F_0/\text{min}$) was calculated before and after Mn^{2+} application over intervals of 30 sec. Subsequently, the slope after Mn^{2+} application was subtracted by the slope in the presence of Ringer's solution to correct for potential photobleaching. The inverse value of the Mn^{2+} quench was determined which directly correlates with Ca^{2+} influx.

5.16. Atomic force microscopy (AFM)

AFM measurements were performed using a Nanowizard III microscope (JPK Instruments) equipped with the SmallCell™ closed liquid cell (JPK Instruments). The elasticity of PSCs was measured by nano-indentation spectroscopy [58]. We used silicon nitride gold-coated cantilevers (Novascan Technologies) with 10 µm polystyrene spherical probes (0.03 N/m nominal spring constant) for all experiments. Cantilevers were manually calibrated prior to each measurement.

Force-distance curves were obtained with a tip velocity of 1 µm/s and loading forces of 300 pN. We analyzed the first 100 nm strain of the force-indentation curve, as this part is known to correspond to the cortical actin cytoskeleton [59,60]. Eight to ten force-distance curves were obtained for each cell, and 15 cells were measured in each experiment (4 to 5 repeated experiments). Elasticity values were calculated from force-distance curves with the Protein Unfolding and

Nano-Indentation Analysis Software PUNIAS3D version 1.0 release 2.3 and data were presented as absolute data values ('Young's modulus').

5.17. Traction Force Microscopy

Traction Force Microscopy (TFM) quantifies the forces imposed by the cells onto the surrounding matrix. PSCs were seeded on hydroxyl acrylamide gels with a calculated stiffness of 10 kPa. The hydroxyl acrylamide gels contained 2×10^7 microbeads per mL (FluoSpheres 1 μm , Invitrogen, Carlsbad, USA) to monitor matrix traction. Gels were crosslinked to Poly-L-Lysin by using the UV-light activated Sulfo-SANPAH (0.5 mg/mL, Sigma Aldrich). After seeding, PSCs were incubated in a humidified pressure chamber for 24h, as described [19]. Fluorescence images of the embedded microbeads were taken with a Zeiss Axiovert 25 microscope. The traction force can be measured by deformations caused by adherent stellate cells which are recorded by taking images of the gel/microbeads before and after removing the cell with 0.05 % trypsin. Image analysis quantifies the beads displacement using the particle image velocimetry (PIV) method as described [61].

5.18. Statistical analysis

All data are presented as mean values (\pm S.E.M), with n corresponding to the number of cells and N referring to the number of cell passages or mice. All experiments were realized at least with three different cell passages or with cells from at least three mice. Tests for normality (unpaired Student's *t* test), one-way ANOVA or two-way ANOVA performed with Tukey's or Bonferroni post hoc test, for multiple comparisons, depending to the compared conditions, were applied using GraphPad Prism version 5 or 7. Statistical significance was assumed when $p < 0.05$.

Author contributions

Silviya Radoslavova: Conceptualization, Performing experiments and data analysis, Investigation, Writing-original draft preparation, Writing-review and editing

Benedikt Fels: Conceptualization, Performing experiments and data analysis, Investigation, Writing-original draft preparation, Writing-review and editing

Zoltan Pethő: Conceptualization, Performing experiments and data analysis, Investigation

Matthias Gruner: Performing experiments and data analysis

Tobias Ruck: Performing experiments and data analysis

Sven G. Meuth: Performing experiments and data analysis

Natalia Prevarskaya: Conceptualization, Investigation, Writing-review and editing, Study supervision

Albrecht Schwab: Conceptualization, Investigation, Writing-review and editing, Study supervision

Halima Ouadid-Ahidouch: Conceptualization, Investigation, Writing-review and editing, Study supervision

Conflicts of Interest Statement

Manuscript title: TRPC1 channels regulate the activation of pancreatic stellate cells through ERK1/2 and SMAD2 pathways and perpetuate their pressure-mediated activation

The authors whose names are listed immediately below certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Author names

Silviya Radoslavova, Benedikt Fels, Zoltan Pethő, Matthias Gruner, Tobias Ruck, Sven G. Meuth, Antoine Folcher, Natalia Prevarskaya, Albrecht Schwab and Halima Ouadid-Ahidouch. The authors declare that they have no interest of any kind affecting this study.

Author contributions

Conceptualization: S.R, B.F, Z.P, N.P, A.S and H.O-A, performing experiments and data analysis: S.R, B.F, Z.P, M.G, T.R, and S.M, investigation: S.R, B.F, Z.P, N.P, A.S and H.O-A, writing-original draft preparation: S.R and B.F, writing-review and editing: S.R, B.F, N.P, A.S and H.O-A, study supervision: N.P, A.S and H.O-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no interest of any kind affecting this study.

Data Availability

Data are contained within the article and supplementary materials

Acknowledgments

We acknowledge the Région Hauts-de-France (Picardie), the FEDER (Fonds Européen de Développement Économique Régional), the Université de Picardie Jules Verne, the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Cancéropôle Nord-Ouest (CNO) and the Ligue contre le cancer (SEPTENTRION) for supporting this study. We thank the Pr H.M. Kocher and his laboratory members from the Queen Mary University of London, for kindly providing us the PS-1 cell line, used for this study. A.S acknowledges support from IZKF Münster (Schw2/020/18) and Deutsche Forschungsgemeinschaft SCHW 407/22-1.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ceca.2022.102621](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2022.102621).

References








- [1] M.V. Apte, R.C. Pirola, J.S. Wilson, Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas, *Front Physiol* 3 (2012), <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00344>.
- [2] R. Jaster, J. Emmrich, Crucial role of fibrogenesis in pancreatic diseases, *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 22 (2008) 17–29, <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2007.10.004>.
- [3] D. Thomas, P. Radhakrishnan, Pancreatic Stellate Cells: The Key Orchestrator of The Pancreatic Tumor Microenvironment, in: A. Birbaier (Ed.), *Tumor Microenvironment: Non-Hematopoietic Cells*, Springer International Publishing, Cham, 2020, pp. 57–70, https://doi.org/10.1007/978-3-030-37184-5_5.
- [4] A. Masamune, T. Shimosegawa, Pancreatic stellate cells – Multi-functional cells in the pancreas, *Pancreatol* 13 (2013) 102–105, <https://doi.org/10.1016/j.pan.2012.12.058>.
- [5] P.E. Ferdek, M.A. Jakubowska, Biology of pancreatic stellate cells—more than just pancreatic cancer, *Pflugers Arch* (2017), <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1968-0>.
- [6] M.V. Apte, J.S. Wilson, A. Lugea, S.J. Pandol, A starring role for stellate cells in the pancreatic cancer microenvironment, *Gastroenterology* 144 (2013) 1210–1219, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.11.037>.
- [7] R.R. Bynigeri, A. Jakkampudi, R. Jangala, C. Subramanyam, M. Sasikala, G.V. Rao, D.N. Reddy, R. Talukdar, Pancreatic stellate cell: Pandora's box for pancreatic disease biology, *World J Gastroenterol* 23 (2017) 382–405, <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i3.382>.
- [8] H. Aoki, H. Ohnishi, K. Hama, S. Shinozaki, H. Kita, H. Yamamoto, H. Osawa, K. Sato, K. Tamada, K. Sugano, Existence of autocrine loop between interleukin-6

- and transforming growth factor-beta1 in activated rat pancreatic stellate cells, *J Cell Biochem* 99 (2006) 221–228, <https://doi.org/10.1002/jcb.20906>.
- [9] H. Aoki, H. Ohnishi, K. Hama, T. Ishijima, Y. Satoh, K. Hanatsuka, A. Ohashi, S. Wada, T. Miyata, H. Kita, H. Yamamoto, H. Osawa, K. Sato, K. Tamada, H. Yasuda, H. Mashima, K. Sugano, Autocrine loop between TGF-beta1 and IL-1beta through Smad3- and ERK-dependent pathways in rat pancreatic stellate cells, *Am J Physiol Cell Physiol* 290 (2006) C1100–C1108, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00465.2005>.
- [10] A. Allam, A.R. Thomsen, M. Gøthwal, D. Saha, J. Maurer, T.B. Brunner, Pancreatic stellate cells in pancreatic cancer: In focus, *Pancreatol* 17 (2017) 514–522, <https://doi.org/10.1016/j.pan.2017.05.390>.
- [11] A. Neesse, S. Krug, T.M. Gress, D.A. Tuveson, P. Michl, Emerging concepts in pancreatic cancer medicine: targeting the tumor stroma, *Oncotargets Ther* 7 (2013) 33–43, <https://doi.org/10.2147/OTT.S38111>.
- [12] M.V. Apte, P.S. Haber, S.J. Darby, S.C. Rodgers, G.W. McCaughan, M.A. Korsten, R. C. Pirola, J.S. Wilson, Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines: implications for pancreatic fibrogenesis, *Gut* 44 (1999) 534–541, <https://doi.org/10.1136/gut.44.4.534>.
- [13] P. Mews, P. Phillips, R. Fahmy, M. Korsten, R. Pirola, J. Wilson, M. Apte, Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines: potential role in chronic pancreatitis, *Gut* 50 (2002) 535–541, <https://doi.org/10.1136/gut.50.4.535>.
- [14] E. Schneider, A. Schmid-Kotsas, J. Zhao, H. Weidenbach, R.M. Schmid, A. Menke, G. Adler, J. Waltenberger, A. Grünert, M.G. Bachem, Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281 (2001) C532–C543, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.2.C532>.
- [15] G. van Duineveldt, M.D.W. Griffin, T.L. Putoczki, Emerging roles for the IL-6 family of cytokines in pancreatic cancer, *Clin Sci (Lond)* 134 (2020) 2091–2115, <https://doi.org/10.1042/CS20191211>.
- [16] S. Okada, T. Okusaka, H. Ishii, A. Kyogoku, M. Yoshimori, N. Kajimura, K. Yamaguchi, T. Kakizoe, Elevated serum interleukin-6 levels in patients with pancreatic cancer, *Jpn J Clin Oncol* 28 (1998) 12–15, <https://doi.org/10.1093/jco/28.1.12>.
- [17] S. Watanabe, Y. Nagashio, H. Asaumi, Y. Nomiya, M. Taguchi, M. Tashiro, Y. Kihara, H. Nakamura, M. Otsuki, Pressure activates rat pancreatic stellate cells, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287 (2004) G1175–G1181, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00339.2004>.
- [18] P.P. Provenzano, S.R. Hingorani, Hyaluronan, fluid pressure, and stromal resistance in pancreas cancer, *Br J Cancer* 108 (2013) 1–8, <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.569>.
- [19] B. Fels, N. Nielsen, A. Schwab, Role of TRPC1 channels in pressure-mediated activation of murine pancreatic stellate cells, *Eur Biophys J* (2016) 1–14, <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1176-4>.
- [20] Z. Pethő, K. Najder, E. Bulk, A. Schwab, Mechanosensitive ion channels push cancer progression, *Cell Calcium* 80 (2019) 79–90, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.03.007>.
- [21] B. Martinec, Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction, *Journal of Cell Science* 117 (2004) 2449–2460, <https://doi.org/10.1242/jcs.01232>.
- [22] G. Mesquita, N. Prevarskaya, A. Schwab, V. Lehen'kyi, Role of the TRP Channels in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Development and Progression, *Cells* 10 (2021) 1021, <https://doi.org/10.3390/cells10051021>.
- [23] R. Jaster, G. Sparmann, J. Emmrich, S. Liebe, Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells, *Gut* 51 (2002) 579–584, <https://doi.org/10.1136/gut.51.4.579>.
- [24] A.A. Kusiak, M.D. Szopa, M.A. Jakubowska, P.E. Ferdek, Signaling in the Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Stellate Cells – a Brief Review of Recent Advances, *Front Physiol* 11 (2020), <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00078>.
- [25] H. Ohnishi, T. Miyata, H. Yasuda, Y. Satoh, K. Hanatsuka, H. Kita, A. Ohashi, K. Tamada, N. Makita, T. Iiri, N. Ueda, H. Mashima, K. Sugano, Distinct roles of Smad2, Smad3, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions, *J Biol Chem* 279 (2004) 8873–8878, <https://doi.org/10.1074/jbc.M309698200>.
- [26] D. Lachowski, E. Cortes, D. Pink, A. Chronopoulos, S.A. Karim, J. Morton, A.E. del Río Hernández, Substrate Rigidity Controls Activation and Durotoxin in Pancreatic Stellate Cells, *Scientific Reports* 7 (2017) 2506, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02689-x>.
- [27] B.M. MacCurtain, N.P. Quirke, S.D. Thorpe, T.K. Gallagher, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Relating Biomechanics and Prognosis, *J Clin Med* 10 (2021) 2711, <https://doi.org/10.3390/jcm10122711>.
- [28] A. Masamune, T. Shimosegawa, Signal transduction in pancreatic stellate cells, *J Gastroenterol* 44 (2009) 249–260, <https://doi.org/10.1007/s00535-009-0013-2>.
- [29] M. Shimada, A. Andoh, K. Hata, K. Tadaki, Y. Araki, Y. Fujiyama, T. Bamba, IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators, *J Immunol* 168 (2002) 861–868, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.861>.
- [30] M.V. Apte, J.S. Wilson, Dangerous liaisons: pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells, *J Gastroenterol Hepatol* 27 (2) (2012) 69–74, <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07000.x>. Suppl.
- [31] P.P. Provenzano, C. Cuevas, A.E. Chang, V.K. Goel, D.D. Von Hoff, S.R. Hingorani, Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Cell* 21 (2012) 418–429, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>.
- [32] B. Fels, E. Bulk, Z. Pethő, A. Schwab, The Role of TRP Channels in the Metastatic Cascade, *Pharmaceuticals (Basel)* 11 (2018) E48, <https://doi.org/10.3390/ph11020048>.
- [33] K.T. Cheng, H.L. Ong, X. Liu, I.S. Ambudkar, Chapter Seven - Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca²⁺ Entry, in: M. Prakriya (Ed.), *Current Topics in Membranes*, Academic Press, 2013, pp. 149–179, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X>.
- [34] O.M. Elzamazzy, R. Penner, L.A. Hazlehurst, The Role of TRPC1 in Modulating Cancer Progression, *Cells* 9 (2020) 388, <https://doi.org/10.3390/cells9020388>.
- [35] J.E. Camacho Londoño, V. Kuryshv, M. Zorn, K. Saar, Q. Tian, N. Hübner, P. Nawroth, A. Dietrich, L. Birnbaumer, P. Lipp, C. Dieterich, M. Freichel, Transcriptional signatures regulated by TRPC1/C4-mediated Background Ca²⁺ entry after pressure-overload induced cardiac remodeling, *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 159 (2021) 86–104, <https://doi.org/10.1016/j.phiomolbio.2020.07.006>.
- [36] A. Fabian, J. Bertrand, O. Lindemann, T. Pap, A. Schwab, Transient receptor potential canonical channel 1 impacts on mechanosignaling during cell migration, *Pflügers Arch* 464 (2012) 623–630, <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1169-9>.
- [37] P. Gottlieb, J. Folgering, R. Maroto, A. Raso, T.G. Wood, A. Kurosky, C. Bowman, D. Bichet, A. Patel, F. Sachs, B. Martinec, O.P. Hamill, E. Honoré, Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity, *Pflügers Arch* 455 (2018) 1097–1103, <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0359-3>.
- [38] R. Maroto, A. Raso, T.G. Wood, A. Kurosky, B. Martinec, O.P. Hamill, TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 179–185, <https://doi.org/10.1038/ncb1218>.
- [39] L. Xia, K. Cheung, S.S. Yeung, E.W. Yeung, The involvement of transient receptor potential canonical type 1 in skeletal muscle regrowth after unloading-induced atrophy, *J Physiol* 594 (2016) 3111–3126, <https://doi.org/10.1113/jp271705>.
- [40] S. Radoslavova, A. Folcher, T. Lefebvre, K. Kondratska, S. Guénin, I. Dhennin-Duthille, M. Gautier, N. Prevarskaya, H. Ouadid-Ahidouch, Orail Channel Regulates Human-Activated Pancreatic Stellate Cell Proliferation and TGFβ1 Secretion through the AKT Signaling Pathway, *Cancers* 13 (2021) 2395, <https://doi.org/10.3390/cancers13102395>.
- [41] V. Prystopiuk, B. Fels, C.S. Simon, I. Liashkovich, D. Pasrednik, C. Kronlage, R. Wedlich-Söldner, H. Oberleitner, J. Fels, A two-phase response of endothelial cells to hydrostatic pressure, *J Cell Sci* 131 (2018), <https://doi.org/10.1242/jcs.206920>.
- [42] A. Kuntze, O. Goetsch, B. Fels, K. Najder, A. Unger, M. Willhelmi, S. Sargin, S. Schimmelpfennig, I. Neumann, A. Schwab, Z. Pethő, Protonation of Piezo1 Impairs Cell-Matrix Interactions of Pancreatic Stellate Cells, *Front Physiol* 11 (2020) 89, <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00089>.
- [43] C. Dou, Z. Liu, K. Tu, H. Zhang, C. Chen, U. Yaqoob, Y. Wang, J. Wen, J. van Deursen, D. Sicard, D. Tschumperlin, H. Zou, W.-C. Huang, R. Urrutia, V.H. Shah, N. Kang, P300 Acetyltransferase Mediates Stiffness-Induced Activation of Hepatic Stellate Cells Into Tumor-Promoting Myofibroblasts, *Gastroenterology* 154 (2018) 2209–2221, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.02.015>, e14.
- [44] Y. Xiao, H. Zhang, Q. Ma, R. Huang, J. Lu, X. Liang, X. Liu, Z. Zhang, L. Yu, J. Pang, L. Zhou, T. Liu, H. Wu, Z. Liang, YAP1-mediated pancreatic stellate cell activation inhibits pancreatic cancer cell proliferation, *Cancer Letters* 462 (2019) 51–60, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.07.015>.
- [45] M. Faouzi, F. Hague, D. Geerts, A.-S. Ay, M. Potier-Cartereau, A. Ahidouch, H. Ouadid-Ahidouch, Functional cooperation between KCa3.1 and TRPC1 channels in human breast cancer: Role in cell proliferation and patient prognosis, *Oncotarget* 7 (2016) 36419–36435, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9261>.
- [46] C. Selli, Y. Erac, B. Kosova, E.S. Erdal, M. Tosun, Silencing of TRPC1 regulates store-operated calcium entry and proliferation in Huh7 hepatocellular carcinoma cells, *Biomed Pharmacother* 71 (2015) 194–200, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.024>.
- [47] M.S.S. Alhamdani, M. Youns, M. Buchholz, T.M. Gress, M.-C. Beckers, D. Maréchal, A. Bauer, C. Schröder, J.D. Hoheisel, Immunoassay-based proteome profiling of 24 pancreatic cancer cell lines, *J Proteomics* 75 (2012) 3747–3759, <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2012.04.042>.
- [48] R. Li, J. Hou, Q. Xu, Q.-J. Liu, Y.-J. Shen, G. Rodin, M. Li, High level interleukin-6 in the medium of human pancreatic cancer cell culture suppresses production of neurotransmitters by PC12 cell line, *Metab Brain Dis* 27 (2012) 91–100, <https://doi.org/10.1007/s11011-011-9270-x>.
- [49] L. Magni, R. Bouazzi, H. Heredero Olmedilla, P.S.S. Petersen, M. Tozzi, I. Novak, The P2X7 Receptor Stimulates IL-6 Release from Pancreatic Stellate Cells and Tocilizumab Prevents Activation of STAT3 in Pancreatic Cancer Cells, *Cells* 10 (2021) 1928, <https://doi.org/10.3390/cells10081928>.
- [50] Y.S. Wu, I. Chung, W.F. Wong, A. Masamune, M.S. Sim, C.Y. Looi, Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861 (2017) 296–306, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.006>.
- [51] S.J. Wicks, S. Lui, N. Abdel-Wahab, R.M. Mason, A. Chantry, Inactivation of smad-transforming growth factor beta signaling by Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II, *Mol Cell Biol* 20 (2000) 8103–8111, <https://doi.org/10.1128/mcb.20.21.8103-8111.2000>.
- [52] A. Dietrich, H. Kalwa, U. Storch, M. Mederos y Schnitzler, B. Salanova, O. Pinkenburg, G. Dubrovskaya, K. Essin, M. Gollasch, L. Birnbaumer, T. Gudermann, Pressure-induced and store-operated cation influx in vascular smooth muscle cells is independent of TRPC1, *Pflügers Arch* 455 (2007) 465–477, <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0314-3>.

- [53] K.A. Haanes, A. Schwab, I. Novak, The P2X7 Receptor Supports Both Life and Death in Fibrogenic Pancreatic Stellate Cells, *PLoS One* 7 (2012), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051164>.
- [54] F.E.M. Froeling, T.A. Mirza, R.M. Feakins, A. Seedhar, G. Elia, I.R. Hart, H. M. Kocher, Organotypic culture model of pancreatic cancer demonstrates that stromal cells modulate E-cadherin, beta-catenin, and Ezrin expression in tumor cells, *Am J Pathol* 175 (2009) 636–648, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090131>.
- [55] N. Nielsen, K. Kondratska, T. Ruck, B. Hild, I. Kovalenko, S. Schimmelpfennig, J. Welzig, S. Sargin, O. Lindemann, S. Christian, S.G. Meuth, N. Prevarskaya, A. Schwab, TRPC6 channels modulate the response of pancreatic stellate cells to hypoxia, *Pflugers Arch* 469 (2017) 1567–1577, <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2057-0>.
- [56] K. Göbel, S. Pankratz, C.-M. Asaridou, A.M. Herrmann, S. Bittner, M. Merker, T. Ruck, S. Glumm, F. Langhauser, P. Kraft, T.F. Krug, J. Breuer, M. Herold, C. C. Gross, D. Beckmann, A. Korb-Pap, M.K. Schuhmann, S. Kuerten, I. Mitroulis, C. Ruppert, M.W. Nolte, C. Panousis, L. Klotz, B. Kehrel, T. Korn, H.F. Langer, T. Pap, B. Nieswandt, H. Wiendl, T. Chavakis, C. Kleinschnitz, S.G. Meuth, Blood coagulation factor XII drives adaptive immunity during neuroinflammation via CD87-mediated modulation of dendritic cells, *Nat Commun* 7 (2016) 11626, <https://doi.org/10.1038/ncomms11626>.
- [57] J.E. Merritt, R. Jacob, T.J. Hallam, Use of manganese to discriminate between calcium influx and mobilization from internal stores in stimulated human neutrophils, *J Biol Chem* 264 (1989) 1522–1527.
- [58] P. Carl, H. Schillers, Elasticity measurement of living cells with an atomic force microscope: data acquisition and processing, *Pflugers Arch* 457 (2008) 551–559, <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0524-3>.
- [59] J. Fels, P. Jeggle, K. Kusche-Vihrog, H. Oberleithner, Cortical actin nanodynamics determines nitric oxide release in vascular endothelium, *PLoS ONE* 7 (2012) e41520, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041520>.
- [60] H. Oberleithner, C. Callies, K. Kusche-Vihrog, H. Schillers, V. Shahin, C. Riethmüller, G.A. Macgregor, H.E. de Wardener, Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 2829–2834, <https://doi.org/10.1073/pnas.0813069106>.
- [61] J.-L. Martiel, A. Leal, L. Kurzawa, M. Balland, I. Wang, T. Vignaud, Q. Tseng, M. Théry, Chapter 15 - Measurement of cell traction forces with ImageJ, in: E. K. Paluch (Ed.), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 2015, pp. 269–287, <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2014.10.008>.

Article

Acidic Growth Conditions Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition to Select More Aggressive PDAC Cell Phenotypes In Vitro

Madelaine Magali Audero ^{1,2} , Tiago Miguel Amaral Carvalho ³ , Federico Alessandro Ruffinatti ² , Thorsten Loeck ⁴, Maya Yassine ¹, Giorgia Chinigò ², Antoine Folcher ¹, Valerio Farfariello ¹, Samuele Amadori ², Chiara Vaghi ², Albrecht Schwab ⁴, Stephan J. Reshkin ³ , Rosa Angela Cardone ³ , Natalia Prevarskaya ^{1,*}  and Alessandra Fiorio Pla ^{1,2,*} 

¹ U1003—PHYCELL—Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Inserm, University of Lille, Villeneuve d'Ascq, 59000 Lille, France

² Laboratory of Cellular and Molecular Angiogenesis, Department of Life Sciences and Systems Biology, University of Turin, 10123 Turin, Italy

³ Department of Biosciences, Biotechnologies and Environment, University of Bari, 70126 Bari, Italy

⁴ Institute of Physiology II, University of Münster, 48149 Münster, Germany

* Correspondence: natacha.prevarskaya@univ-lille.fr (N.P.); alessandra.fiorio@unito.it (A.F.P.); Tel.: +33-320336423 (N.P.); +39-0116704660 (A.F.P)

† These authors contributed equally to this work.

Simple Summary: Acidosis represents a key chemical marker of the Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) microenvironment (TME). It induces the selection of aggressive cancer cell phenotypes and promotes its progression. Here, we describe the impact of an acidic TME on different PDAC hallmarks such as proliferation, migration, extracellular matrix digestion, invasion, and epithelial–mesenchymal transition. This was executed after establishing a model of pH_e-selected cells that were cultured for different time periods in an acidic environment and then re-acclimated back to pH_e 7.4. Our findings show that the acid selection contributes to PDAC cells' response and adaptation to the hostile acidic microenvironment, which is a requirement for the acquisition of an aggressive phenotype of PDAC cells.

Abstract: Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is characterized by an acidic microenvironment, which contributes to therapeutic failure. So far there is a lack of knowledge with respect to the role of the acidic microenvironment in the invasive process. This work aimed to study the phenotypic and genetic response of PDAC cells to acidic stress along the different stages of selection. To this end, we subjected the cells to short- and long-term acidic pressure and recovery to pH_e 7.4. This treatment aimed at mimicking PDAC edges and consequent cancer cell escape from the tumor. The impact of acidosis was assessed for cell morphology, proliferation, adhesion, migration, invasion, and epithelial–mesenchymal transition (EMT) via functional in vitro assays and RNA sequencing. Our results indicate that short acidic treatment limits growth, adhesion, invasion, and viability of PDAC cells. As the acid treatment progresses, it selects cancer cells with enhanced migration and invasion abilities induced by EMT, potentiating their metastatic potential when re-exposed to pH_e 7.4. The RNA-seq analysis of PANC-1 cells exposed to short-term acidosis and pH_e-selected recovered to pH_e 7.4 revealed distinct transcriptome rewiring. We describe an enrichment of genes relevant to proliferation, migration, EMT, and invasion in acid-selected cells. Our work clearly demonstrates that upon acidosis stress, PDAC cells acquire more invasive cell phenotypes by promoting EMT and thus paving the way for more aggressive cell phenotypes.

Keywords: acidic tumor microenvironment; acid-selection; PDAC; cell proliferation; cell adhesion; cell migration; cell invasion; EMT



Citation: Audero, M.M.; Carvalho, T.M.A.; Ruffinatti, F.A.; Loeck, T.; Yassine, M.; Chinigò, G.; Folcher, A.; Farfariello, V.; Amadori, S.; Vaghi, C.; et al. Acidic Growth Conditions Promote Epithelial-to-Mesenchymal Transition to Select More Aggressive PDAC Cell Phenotypes In Vitro. *Cancers* **2023**, *15*, 2572. <https://doi.org/10.3390/cancers15092572>

Academic Editor: Jurgen Dittmer

Received: 16 November 2022

Revised: 28 March 2023

Accepted: 26 April 2023

Published: 30 April 2023



Copyright: © 2023 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/>).

acts as a stressor factor during the acute exposition, limiting PDAC cell growth and viability and impairing cell adhesion and invasion. This paves the way for a more aggressive cancer cell subpopulation, induced by the epithelial–mesenchymal transition. Migratory and invasive activity rise as the acid treatment progresses. Importantly, this process further enhances metastatic potential when cells are re-exposed to pH_e 7.4 as can occur during local cyclic waves of acidification and alkalization. These data emphasize the importance of an extracellular acidification in cancer cell selection and adaptation to hostile environments that promotes the development of more aggressive PDAC cell phenotypes.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture and Generation of PANC-1 and Mia PaCa-2 Acidic Phenotypes

Human pancreatic ductal adenocarcinoma PANC-1 cells were obtained from the Institute for Experimental Cancer Research, Christian-Albrecht-University (CAU) of Kiel, Germany. Mia PaCa-2 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). Control cells were cultured as monolayers in RPMI 1640 growth medium (Gibco, Cat# 31870-025) supplemented with 10% FBS (Biochrom (Cambridge, UK); Cat# S0615), 2 mM L-Glutamine (Gibco (Carlsbad, CA, USA); Cat# 25030-024), 1 mM sodium pyruvate (Gibco; Cat# 11360039), and antibiotics (penicillin/streptomycin 100 U mL⁻¹; Life Technologies, Inc. (Carlsbad, CA, USA); Cat# 15070-063). For pH adjustments of the cell culture media to pH_e 6.6, RPMI 1640 powder medium (Sigma (Macquarie Park, NSW, Australia); Cat# R6504) was complemented with NaHCO₃, according to the Henderson–Hasselbalch equation to derive the target pH_e . The osmolarity of the medium was balanced using NaCl. The different powder components were dissolved in UltraPure distilled water (Invitrogen (Waltham, MA, USA); Cat# 10977-035), and the resulting medium was filtered in a sterile environment and supplemented with 10% FBS (Biochrom; Cat# S0615), 1 mM sodium pyruvate (Gibco; Cat# 11360039), and antibiotics (penicillin/streptomycin 100 U mL⁻¹; Life Technologies, Inc.; Cat# 15070-063). All cells were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

For the generation of the acidic phenotypes, PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were exposed to pH_e 6.6 for different time periods by changing the media pH_e from 7.4 to 6.6. Control cells were cultured at pH_e 7.4. For studying early stages of low pH_e -selection («4 days pH_e 6.6» cells), freshly split PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were cultured in pH_e 6.6 medium for 4 days. PDAC mimicking cells (« pH_e -selected» cells) were generated by a 1 month-long exposure to the acidic medium before performing the experiments. pH_e -selected + 7.4 cells were maintained in pH_e 6.6 for 1 month before they were put back to pH_e 7.4 for 2 weeks. Experiments requiring pH_e -selected + 7.4 cells were performed after a maximum of 2 weeks following recovery to pH_e 7.4. Both pH_e 7.4 and pH_e 6.6 media were refreshed every other day, and acidic medium pH was monitored daily. For experiments requiring acute (1 h) exposition to acidic pH, an aliquot of pH_e 6.6 medium was maintained at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere for at least 1 h before the experiment to equilibrate the target pH_e .

2.2. Cell Proliferation and Viability

Proliferation of PANC-1 and Mia PaCa-2 cells was studied using EdU staining assay, MTS assay, trypan blue exclusion assay, and ATP quantification assay. For MTS assays, cells were plated in 96-well plates at a density of 3000 cells/well for PANC-1 and 8000 cells/well for Mia PaCa-2 cells in 100 µL medium, letting them adhere overnight. Cell media of correspondent pH was refreshed the following day and cell proliferation was assessed at 2 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h using MTS CellTiter 96[®] Aqueous assay (Promega (Madison, WI, USA); Cat# G1111) following the manufacturer's instructions.

Cell proliferation was assessed via 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation using Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit (Invitrogen; Cat# C10340). Briefly, the different PANC-1 and Mia PaCa-2 cell models were plated for 4 days in their corresponding pH_e conditions in 1% gelatin-coated coverslips inserted in 6-well plates. The culture

83. Wang, T.; Abou-Ouf, H.; Hegazy, S.A.; Alshalfal, M.; Stoletov, K.; Lewis, J.; Donnelly, B.; Bismar, T.A. Ankyrin G Expression Is Associated with Androgen Receptor Stability, Invasiveness, and Lethal Outcome in Prostate Cancer Patients. *J. Mol. Med.* **2016**, *94*, 1411–1422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Zeng, C.; Long, J.; Deng, C.; Xie, L.; Ma, H.; Guo, Y.; Liu, S.; Deng, M. Genetic Alterations in Papillary Thyroid Carcinoma with Hashimoto's Thyroiditis: ANK3, an Indolent Maintainer of Papillary Thyroid Carcinoma. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 894786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Zhao, M.; Liu, Y.; Zheng, C.; Qu, H. DbEMT 2.0: An Updated Database for Epithelial-Mesenchymal Transition Genes with Experimentally Verified Information and Precalculated Regulation Information for Cancer Metastasis. *J. Genet. Genom.* **2019**, *46*, 595–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Wu, T.-C.; Liao, C.-Y.; Lu, W.-C.; Chang, C.-R.; Tsai, F.-Y.; Jiang, S.-S.; Chen, T.-H.; Lin, K.M.-C.; Chen, L.-T.; Chang, W.-S.W. Identification of Distinct Slow Mode of Reversible Adaptation of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma to the Prolonged Acidic PH Microenvironment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 137. [[CrossRef](#)]
87. Hagelund, S.; Trauzold, A. Impact of Extracellular PH on Apoptotic and Non-Apoptotic TRAIL-Induced Signaling in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 768579. [[CrossRef](#)]
88. Rohani, N.; Hao, L.; Alexis, M.S.; Joughin, B.A.; Krismer, K.; Moufarrej, M.N.; Soltis, A.R.; Lauffenburger, D.A.; Yaffe, M.B.; Burge, C.B.; et al. Acidification of Tumor at Stromal Boundaries Drives Transcriptome Alterations Associated with Aggressive Phenotypes. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1952–1966. [[CrossRef](#)]
89. Corbet, C.; Feron, O. Tumour Acidosis: From the Passenger to the Driver's Seat. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 577–593. [[CrossRef](#)]
90. Swietach, P. What Is PH Regulation, and Why Do Cancer Cells Need It? *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38*, 5–15. [[CrossRef](#)]
91. Riemann, A.; Schneider, B.; Ihling, A.; Nowak, M.; Sauvart, C.; Thews, O.; Gekle, M. Acidic Environment Leads to ROS-Induced MAPK Signaling in Cancer Cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e22445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Pedersen, S.F.; Jørgensen, N.K.; Damgaard, I.; Schousboe, A.; Hoffmann, E.K. Mechanisms of PHi Regulation Studied in Individual Neurons Cultured from Mouse Cerebral Cortex. *J. Neurosci. Res.* **1998**, *51*, 431–441. [[CrossRef](#)]
93. White, K.A.; Grillo-Hill, B.K.; Barber, D.L. Cancer Cell Behaviors Mediated by Dysregulated PH Dynamics at a Glance. *J. Cell Sci.* **2017**, *130*, 663–669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Persi, E.; Duran-Frigola, M.; Damaghi, M.; Roush, W.R.; Aloy, P.; Cleveland, J.L.; Gillies, R.J.; Ruppin, E. Systems Analysis of Intracellular PH Vulnerabilities for Cancer Therapy. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 2997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Russell, S.; Xu, L.; Kam, Y.; Abrahams, D.; Ordway, B.; Lopez, A.S.; Bui, M.M.; Johnson, J.; Epstein, T.; Ruiz, E.; et al. Proton Export Upregulates Aerobic Glycolysis. *BMC Biol.* **2022**, *20*, 163. [[CrossRef](#)]
96. Bevington, A.; Walls, J. Protein Catabolism in Metabolic Acidosis: Inhibition of Glycolysis by Low PH Suggests a Role for Glucose. *Biochem. Soc. Trans.* **1995**, *23*, 464S. [[CrossRef](#)]
97. de Bem Prunes, B.; Nunes, J.S.; da Silva, V.P.; Laureano, N.K.; Gonçalves, D.R.; Machado, I.S.; Barbosa, S.; Lamers, M.L.; Rados, P.V.; Kurth, I.; et al. The Role of Tumor Acidification in Aggressiveness, Cell Dissemination and Treatment Resistance of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Life Sci.* **2022**, *288*, 120163. [[CrossRef](#)]
98. Oster, L.; Schröder, J.; Rugi, M.; Schimmelpfennig, S.; Sargin, S.; Schwab, A.; Najder, K. Extracellular PH Controls Chemotaxis of Neutrophil Granulocytes by Regulating Leukotriene B₄ Production and Cdc42 Signaling. *J. Immunol.* **2022**, *209*, 136–144. [[CrossRef](#)]
99. Nagano, M.; Hoshino, D.; Koshikawa, N.; Akizawa, T.; Seiki, M. Turnover of Focal Adhesions and Cancer Cell Migration. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 310616. [[CrossRef](#)]
100. Cardone, R.A.; Casvola, V.; Reshkin, S.J. The Role of Disturbed PH Dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 786–795. [[CrossRef](#)]
101. Brisson, L.; Reshkin, S.J.; Goré, J.; Roger, S. PH Regulators in Invasosomal Functioning: Proton Delivery for Matrix Tasting. *Eur. J. Cell Biol.* **2012**, *91*, 847–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Reshkin, S.J.; Cardone, R.A.; Harguindey, S. Na⁺/H⁺ Exchanger, PH Regulation and Cancer. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* **2012**, *8*, 85–99. [[CrossRef](#)]
103. Swayampakula, M.; McDonald, P.C.; Vallejo, M.; Coyaud, E.; Chafe, S.C.; Westerback, A.; Venkateswaran, G.; Shankar, J.; Gao, G.; Laurent, E.M.N.; et al. The Interactome of Metabolic Enzyme Carbonic Anhydrase IX Reveals Novel Roles in Tumor Cell Migration and Invadopodia/MMP14-Mediated Invasion. *Oncogene* **2017**, *36*, 6244–6261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Lee, S.-H.; McIntyre, D.; Honess, D.; Hulikova, A.; Pacheco-Torres, J.; Cerdán, S.; Swietach, P.; Harris, A.L.; Griffiths, J.R. Carbonic Anhydrase IX Is a PH-Stat That Sets an Acidic Tumour Extracellular PH in Vivo. *Br. J. Cancer* **2018**, *119*, 622–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Yilmaz, M.; Christofori, G. EMT, the Cytoskeleton, and Cancer Cell Invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 15–33. [[CrossRef](#)]
106. Ranieri, D.; Gutteri, L.; Raffa, S.; Torrioni, M.R.; Belleudi, F. Role of FGFR2c and Its PKCε Downstream Signaling in the Control of EMT and Autophagy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 4993. [[CrossRef](#)]
107. Qian, J.; Liu, H.; Chen, W.; Wen, K.; Lu, W.; Huang, C.; Fu, Z. Knockdown of Slug by RNAi Inhibits the Proliferation and Invasion of HCT116 Colorectal Cancer Cells. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *8*, 1055–1059. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

60. Debreova, M.; Csaderova, L.; Burikova, M.; Lukacikova, L.; Kajanova, I.; Sedlakova, O.; Kery, M.; Kopacek, J.; Zatovicova, M.; Bizik, J.; et al. CAIX Regulates Invadopodia Formation through Both a PH-Dependent Mechanism and Interplay with Actin Regulatory Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2745. [[CrossRef](#)]
61. Yamada, T.; Park, C.S.; Burns, A.; Nakada, D.; Lacorazza, H.D. The Cytosolic Protein G0S2 Maintains Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Luo, Y.; Jin, H.; Kim, J.H.; Bae, J. Guanylate-Binding Proteins Induce Apoptosis of Leukemia Cells by Regulating MCL-1 and BAK. *Oncogenesis* **2021**, *10*, 54. [[CrossRef](#)]
63. Britzen-Laurent, N.; Lipnik, K.; Ocker, M.; Naschberger, E.; Schellerer, V.S.; Croner, R.S.; Vieth, M.; Waldner, M.; Steinberg, P.; Hohenadl, C.; et al. GBP-1 Acts as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer Cells. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 153–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Xu, H.; Sun, L.; Zheng, Y.; Yu, S.; Ou-yang, J.; Han, H.; Dai, X.; Yu, X.; Li, M.; Lan, Q. GBP3 Promotes Glioma Cell Proliferation via SQSTM1/P62-ERK1/2 Axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 446–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lee, S.; Kim, H.; Naidansuren, P.; Ham, K.A.; Choi, H.S.; Ahn, H.; Kim, M.; Kang, D.H.; Kang, S.W.; Joe, Y.A. Peroxidase Is Essential for Endothelial Cell Survival and Growth Signaling by Sulfinilimine Crosslink-dependent Matrix Assembly. *FASEB J.* **2020**, *34*, 10228–10241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Kurihara-Shimomura, M.; Sasahira, T.; Shimomura, H.; Kiritani, T. Peroxidase Plays a Tumor-Promoting Role in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5416. [[CrossRef](#)]
67. Paumann-Page, M.; Kienzl, N.F.; Motwani, J.; Bathish, B.; Paton, L.N.; Magon, N.J.; Sevcnikar, B.; Furtmüller, P.G.; Traxlmayr, M.W.; Obinger, C.; et al. Peroxidase Protein Expression and Enzymatic Activity in Metastatic Melanoma Cell Lines Are Associated with Invasive Potential. *Redox Biol.* **2021**, *46*, 102090. [[CrossRef](#)]
68. Cai, C.; Chen, S.-Y.; Zheng, Z.; Omwancha, J.; Lin, M.-F.; Balk, S.; Shemshedini, L. Androgen Regulation of Soluble Guanylyl Cyclase1 Mediates Prostate Cancer Cell Proliferation. *Oncogene* **2007**, *26*, 1606–1615. [[CrossRef](#)]
69. Babykutti, S.; Suboj, P.; Srinivas, P.; Nair, A.S.; Chandramohan, K.; Gopala, S. Insidious Role of Nitric Oxide in Migration/Invasion of Colon Cancer Cells by Upregulating MMP-2/9 via Activation of CGMP-PKG-ERK Signaling Pathways. *Clin. Exp. Metastasis* **2012**, *29*, 471–492. [[CrossRef](#)]
70. Schwappacher, R.; Rangaswami, H.; Su-Yuo, J.; Hassad, A.; Spitler, R.; Casteel, D.E. CGMP-Dependent Protein Kinase I β Regulates Breast Cancer Cell Migration and Invasion via a Novel Interaction with the Actin/Myosin-Associated Protein Caldesmon. *J. Cell Sci.* **2013**, *126*, 1626–1636. [[CrossRef](#)]
71. Ronchetti, S.A.; Pino, M.T.L.; Cordeiro, G.; Bollani, S.N.; Ricci, A.G.; Duvilanski, B.H.; Cabilla, J.P. Soluble Guanylyl Cyclase A1 Subunit Is a Key Mediator of Proliferation, Survival, and Migration in ECC-1 and HeLa Cell Lines. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zhou, J.; Gao, S.; Hsieh, C.-L.; Malla, M.; Shemshedini, L. Peptide B Targets Soluble Guanylyl Cyclase A1 and Kills Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0184088. [[CrossRef](#)]
73. Daulat, A.M.; Bertucci, F.; Audebert, S.; Serge, A.; Finetti, P.; Josselin, E.; Castellano, R.; Birnbaum, D.; Angers, S.; Borg, J.-P. PRICKLE1 Contributes to Cancer Cell Dissemination through Its Interaction with MTORC2. *Dev. Cell* **2016**, *37*, 311–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Jiang, D.; He, Y.; Mo, Q.; Liu, E.; Li, X.; Huang, L.; Zhang, Q.; Chen, F.; Li, Y.; Shao, H. PRICKLE1, a Wnt/PCP Signaling Component, Is Overexpressed and Associated with Inferior Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *J. Transl. Med.* **2021**, *19*, 211. [[CrossRef](#)]
75. Huang, S.; Zhao, J.; Song, J.; Li, Y.; Zuo, R.; Sa, Y.; Ma, Z.; OuYang, H. Interferon Alpha-Inducible Protein 27 (IFI27) Is a Prognostic Marker for Pancreatic Cancer Based on Comprehensive Bioinformatics Analysis. *Bioengineered* **2021**, *12*, 8515–8528. [[CrossRef](#)]
76. Lao, M.; Zhang, X.; Ma, T.; Xu, J.; Yang, H.; Duan, Y.; Ying, H.; Zhang, X.; Guo, C.; Qiu, J.; et al. Regulator of Calcineurin 1 Gene Isoform 4 in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Regulates the Progression of Tumor Cells. *Oncogene* **2021**, *40*, 3136–3151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Gordon, K.J.; Kirkbride, K.C.; How, T.; Blobe, G.C. Bone Morphogenetic Proteins Induce Pancreatic Cancer Cell Invasiveness through a Smad1-Dependent Mechanism That Involves Matrix Metalloproteinase-2. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 238–248. [[CrossRef](#)]
78. Takagi, K.; Shimomura, A.; Imura, J.; Mori, H.; Noguchi, A.; Tanaka, S.; Minamisaka, T.; Nishida, T.; Hatta, H.; Nakajima, T. Interleukin-32 Regulates Downstream Molecules and Promotes the Invasion of Pancreatic Cancer Cells. *Oncol. Lett.* **2021**, *23*, 14. [[CrossRef](#)]
79. Sun, Q.; Ye, Z.; Qin, Y.; Fan, G.; Ji, S.; Zhuo, Q.; Xu, W.; Liu, W.; Hu, Q.; Liu, M.; et al. Oncogenic Function of TRIM2 in Pancreatic Cancer by Activating ROS-Related NRF2/ITGB7/FAK Axis. *Oncogene* **2020**, *39*, 6572–6588. [[CrossRef](#)]
80. Wang, L.; Wang, L.; Zhang, H.; Lu, J.; Zhang, Z.; Wu, H.; Liang, Z. AREG Mediates the Epithelial-mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells via the EGFR/ERK/NF- κ B Signaling Pathway. *Oncol. Rep.* **2020**, *43*, 1558–1568. [[CrossRef](#)]
81. Abdulkareem, N.M.; Bhat, R.; Qin, L.; Vasaikar, S.; Gopinathan, A.; Mitchell, T.; Shea, M.J.; Nanda, S.; Thangavel, H.; Zhang, B.; et al. A Novel Role of ADGRF1 (GPR110) in Promoting Cellular Quiescence and Chemoresistance in Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive Breast Cancer. *FASEB J.* **2021**, *35*, e21719. [[CrossRef](#)]
82. Masuda, M.; Uno, Y.; Ohbayashi, N.; Ohata, H.; Mimata, A.; Kukimoto-Niino, M.; Moriyama, H.; Kashimoto, S.; Inoue, T.; Goto, N.; et al. TNIK Inhibition Abrogates Colorectal Cancer Stemness. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12586. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. LaMonte, G.; Tang, X.; Chen, J.L.-Y.; Wu, J.; Ding, C.-K.C.; Keenan, M.M.; Sangokoya, C.; Kung, H.-N.; Ilkayeva, O.; Boros, L.G.; et al. Acidosis Induces Reprogramming of Cellular Metabolism to Mitigate Oxidative Stress. *Cancer Metab.* **2013**, *1*, 23. [[CrossRef](#)]
36. Peppicelli, S.; Bianchini, F.; Toti, A.; Laurenzana, A.; Fibbi, G.; Calorini, L. Extracellular Acidity Strengthens Mesenchymal Stem Cells to Promote Melanoma Progression. *Cell Cycle* **2015**, *14*, 3088–3100. [[CrossRef](#)]
37. Hofschroer, V.; Koch, K.A.; Ludwig, F.T.; Friedl, P.; Oberleithner, H.; Stock, C.; Schwab, A. Extracellular Protonation Modulates Cell-Cell Interaction Mechanics and Tissue Invasion in Human Melanoma Cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42369. [[CrossRef](#)]
38. Tang, X.; Lucas, J.E.; Chen, J.L.-Y.; LaMonte, G.; Wu, J.; Wang, M.C.; Koumenis, C.; Chi, J.-T. Functional Interaction between Responses to Lactic Acidosis and Hypoxia Regulates Genomic Transcriptional Outputs. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 491–502. [[CrossRef](#)]
39. Moellerling, R.E.; Black, K.C.; Krishnamurty, C.; Baggett, B.K.; Stafford, P.; Rain, M.; Gatenby, R.A.; Gillies, R.J. Acid Treatment of Melanoma Cells Selects for Invasive Phenotypes. *Clin. Exp. Metastasis* **2008**, *25*, 411–425. [[CrossRef](#)]
40. Anemone, A.; Consolino, L.; Conti, L.; Irrera, P.; Hsu, M.Y.; Villano, D.; Dastrù, W.; Porporato, P.E.; Cavallo, F.; Longo, D.L. Tumour Acidosis Evaluated in Vivo by MRI-CEST PH Imaging Reveals Breast Cancer Metastatic Potential. *Br. J. Cancer* **2021**, *124*, 207–216. [[CrossRef](#)]
41. Yao, J.; Czaplinska, D.; Ialchina, R.; Schnipper, J.; Liu, B.; Sandelin, A.; Pedersen, S.F. Cancer Cell Acid Adaptation Gene Expression Response Is Correlated to Tumor-Specific Tissue Expression Profiles and Patient Survival. *Cancers* **2020**, *12*, 2183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhou, Z.-H.; Wang, Q.-L.; Mao, L.-H.; Li, X.-Q.; Liu, P.; Song, J.-W.; Liu, X.; Xu, F.; Lei, J.; He, S. Chromatin Accessibility Changes Are Associated with Enhanced Growth and Liver Metastasis Capacity of Acid-Adapted Colorectal Cancer Cells. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 511–522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Schnipper, J.; Kouba, S.; Hague, F.; Girault, A.; Telliez, M.-S.; Guénin, S.; Ahidouch, A.; Pedersen, S.F.; Ouadid-Ahidouch, H. Acid Adaptation Promotes TRPC1 Plasma Membrane Localization Leading to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Proliferation and Migration through Ca²⁺ Entry and Interaction with PI3K/CaM. *Cancers* **2022**, *14*, 4946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Czaplinska, D.; Ialchina, R.; Andersen, H.B.; Yao, J.; Stigliani, A.; Dannesboe, J.; Flinck, M.; Chen, X.; Mitrega, J.; Gnosa, S.P.; et al. Crosstalk between Tumor Acidosis, P53 and Extracellular Matrix Regulates Pancreatic Cancer Aggressiveness. *Int. J. Cancer* **2023**, *152*, 1210–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Schwab, A.; Rossmann, H.; Klein, M.; Dieterich, P.; Gassner, B.; Neff, C.; Stock, C.; Seidler, U. Functional Role of Na⁺-HCO₃⁻ Cotransport in Migration of Transformed Renal Epithelial Cells: Na⁺-HCO₃⁻ Cotransport and Cell Migration. *J. Physiol.* **2005**, *568*, 445–458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Busco, G.; Cardone, R.A.; Greco, M.R.; Bellizzi, A.; Antelmi, E.; Mancini, M.T.; Dell'Aquila, M.E.; Casavola, V.; Paradiso, A.; et al. NHE1 Promotes Invadopodial ECM Proteolysis through Acidification of the Peri-invadopodial Space. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3903–3915. [[CrossRef](#)]
47. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast Universal RNA-Seq Aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21. [[CrossRef](#)]
48. Li, B.; Dewey, C.N. RSEM: Accurate Transcript Quantification from RNA-Seq Data with or without a Reference Genome. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 323. [[CrossRef](#)]
49. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)]
50. Benjamini, Y.; Drai, D.; Elmer, G.; Kafkafi, N.; Golani, I. Controlling the False Discovery Rate in Behavior Genetics Research. *Behav. Brain Res.* **2001**, *125*, 279–284. [[CrossRef](#)]
51. Chen, J.; Bardes, E.E.; Aronow, B.J.; Jegga, A.G. ToppGene Suite for Gene List Enrichment Analysis and Candidate Gene Prioritization. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, W305–W311. [[CrossRef](#)]
52. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Deer, E.L.; González-Hernández, J.; Coursen, J.D.; Shea, J.E.; Ngatia, J.; Scaife, C.L.; Firpo, M.A.; Mulvihill, S.J. Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* **2010**, *39*, 425–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hao, G.; Xu, Z.P.; Li, L. Manipulating Extracellular Tumour PH: An Effective Target for Cancer Therapy. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 22182–22192. [[CrossRef](#)]
55. Deakin, N.O.; Turner, C.E. Paxillin Comes of Age. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 2435–2444. [[CrossRef](#)]
56. Kato, Y.; Lambert, C.A.; Colige, A.C.; Mineur, P.; Noël, A.; Frankenne, F.; Foidart, J.-M.; Baba, M.; Hata, R.-I.; Miyazaki, K.; et al. Acidic Extracellular PH Induces Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Mouse Metastatic Melanoma Cells through the Phospholipase D-Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 10938–10944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Magalhaes, M.A.O.; Larson, D.R.; Mader, C.C.; Bravo-Cordero, J.J.; Gil-Henn, H.; Oser, M.; Chen, X.; Koleske, A.J.; Condeelis, J. Cortactin Phosphorylation Regulates Cell Invasion through a PH-Dependent Pathway. *J. Cell Biol.* **2011**, *195*, 903–920. [[CrossRef](#)]
58. Lucien, F.; Brochu-Gaudreau, K.; Arsenaault, D.; Harper, K.; Dubois, C.M. Hypoxia-Induced Invadopodia Formation Involves Activation of NHE-1 by the P90 Ribosomal S6 Kinase (P90RSK). *PLoS ONE* **2011**, *6*, 11. [[CrossRef](#)]
59. Greco, M.R.; Antelmi, E.; Busco, G.; Guerra, L.; Rubino, R.; Casavola, V.; Reshkin, S.J.; Cardone, R.A. Protease Activity at Invadopodial Focal Digestive Areas Is Dependent on NHE1-Driven Acidic PHe. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 940–946. [[CrossRef](#)]

11. Lagadic-Gossmann, D.; Huc, L.; Lecureur, V. Alterations of Intracellular PH Homeostasis in Apoptosis: Origins and Roles. *Cell Death Differ.* **2004**, *11*, 953–961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Matsuyama, S.; Llopis, J.; Deveraux, Q.L.; Tsien, R.Y.; Reed, J.C. Changes in Intramitochondrial and Cytosolic PH: Early Events That Modulate Caspase Activation during Apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 318–325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Wojtkowiak, J.W.; Rothberg, J.M.; Kumar, V.; Schramm, K.J.; Haller, E.; Proemsey, J.B.; Lloyd, M.C.; Sloane, B.F.; Gillies, R.J. Chronic Autophagy Is a Cellular Adaptation to Tumor Acidic PH Microenvironments. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 3938–3947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Suzuki, A.; Maeda, T.; Baba, Y.; Shimamura, K.; Kato, Y. Acidic Extracellular PH Promotes Epithelial Mesenchymal Transition in Lewis Lung Carcinoma Model. *Cancer Cell Int.* **2014**, *14*, 129. [[CrossRef](#)]
15. Andreucci, E.; Peppicelli, S.; Ruzzolini, J.; Bianchini, F.; Biagioni, A.; Papucci, L.; Magnelli, L.; Mazzanti, B.; Stecca, B.; Calorini, L. The Acidic Tumor Microenvironment Drives a Stem-like Phenotype in Melanoma Cells. *J. Mol. Med.* **2020**, *98*, 1431–1446. [[CrossRef](#)]
16. Sutoo, S.; Maeda, T.; Suzuki, A.; Kato, Y. Adaptation to Chronic Acidic Extracellular PH Elicits a Sustained Increase in Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2020**, *37*, 133–144. [[CrossRef](#)]
17. Damaghi, M.; Gillies, R. Phenotypic Changes of Acid-Adapted Cancer Cells Push Them toward Aggressiveness in Their Evolution in the Tumor Microenvironment. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 1739–1743. [[CrossRef](#)]
18. Wang, H.; Cai, J.; Du, S.; Wei, W.; Shen, X. LAMC2 Modulates the Acidity of Microenvironments to Promote Invasion and Migration of Pancreatic Cancer Cells via Regulating AKT-Dependent NHE1 Activity. *Exp. Cell Res.* **2020**, *391*, 111984. [[CrossRef](#)]
19. Li, S.; Xiong, N.; Peng, Y.; Tang, K.; Bai, H.; Lv, X.; Jiang, Y.; Qin, X.; Yang, H.; Wu, C.; et al. Acidic PHe Regulates Cytoskeletal Dynamics through Conformational Integrin B1 Activation and Promotes Membrane Protrusion. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Mol. Basis Dis.* **2018**, *1864*, 2395–2408. [[CrossRef](#)]
20. Shin, S.C.; Thomas, D.; Radhakrishnan, P.; Hollingsworth, M.A. Invasive Phenotype Induced by Low Extracellular PH Requires Mitochondria Dependent Metabolic Flexibility. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2020**, *525*, 162–168. [[CrossRef](#)]
21. Estrella, V.; Chen, T.; Lloyd, M.; Wojtkowiak, J.; Cornnell, H.H.; Ibrahim-Hashim, A.; Bailey, K.; Balagurunathan, Y.; Rothberg, J.M.; Sloane, B.F.; et al. Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1524–1535. [[CrossRef](#)]
22. Corbet, C.; Bastien, E.; Santiago de Jesus, J.P.; Dierge, E.; Martherus, R.; Vander Linden, C.; Doix, B.; Degavre, C.; Guilbaud, C.; Petit, L.; et al. TGF β 2-Induced Formation of Lipid Droplets Supports Acidosis-Driven EMT and the Metastatic Spreading of Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Rabiee Motmaen, S.; Tavakol, S.; Joghataei, M.T.; Barati, M. Acidic PH Derived from Cancer Cells as a Double-edged Knife Modulates Wound Healing through DNA Repair Genes and Autophagy. *Int. Wound J.* **2020**, *17*, 137–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Yang, O.C.Y.; Loh, S.-H. Acidic Stress Triggers Sodium-Coupled Bicarbonate Transport and Promotes Survival in A375 Human Melanoma Cells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6858. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Rofstad, E.K.; Mathiesen, B.; Kindem, K.; Galappathi, K. Acidic Extracellular PH Promotes Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells in Athymic Nude Mice. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 6699–6707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Riemann, A.; Rauschner, M.; Gießelmann, M.; Reime, S.; Haupt, V.; Thews, O. Extracellular Acidosis Modulates the Expression of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Markers and Adhesion of Epithelial and Tumor Cells. *Neoplasia* **2019**, *21*, 450–458. [[CrossRef](#)]
27. Bohloli, M.; Atashi, A.; Soleimani, M.; Kaviani, S.; Anbarlou, A. Investigating Effects of Acidic PH on Proliferation, Invasion and Drug-Induced Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Microenviron.* **2016**, *9*, 119–126. [[CrossRef](#)]
28. Marino, M.L.; Pellegrini, P.; Di Lernia, G.; Djavaheiri-Mergny, M.; Brnjic, S.; Zhang, X.; Hägg, M.; Linder, S.; Fais, S.; Codogno, P.; et al. Autophagy Is a Protective Mechanism for Human Melanoma Cells under Acidic Stress. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 30664–30676. [[CrossRef](#)]
29. Chen, Y.; Chen, C.-H.; Tung, P.-Y.; Huang, S.-H.; Wang, S.-M. An Acidic Extracellular PH Disrupts Adherens Junctions in HepG2 Cells by Src Kinases-Dependent Modification of E-Cadherin. *J. Cell. Biochem.* **2009**, *108*, 851–859. [[CrossRef](#)]
30. Gilbert, H.T.J.; Hodson, N.; Baird, P.; Richardson, S.M.; Hoyland, J.A. Acidic PH Promotes Intervertebral Disc Degeneration: Acid-Sensing Ion Channel -3 as a Potential Therapeutic Target. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37360. [[CrossRef](#)]
31. Kondo, A.; Yamamoto, S.; Nakaki, R.; Shimamura, T.; Hamakubo, T.; Sakai, J.; Kodama, T.; Yoshida, T.; Osawa, T. Extracellular Acidic PH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Rep.* **2017**, *18*, 2228–2242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lee, S.; Shanti, A. Effect of Exogenous PH on Cell Growth of Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhou, Z.; Song, J.; Li, W.; Liu, X.; Cao, L.; Wan, L.; Tan, Y.; Ji, S.; Liang, Y.; Gong, F. The Acid-Sensing Ion Channel, ASIC2, Promotes Invasion and Metastasis of Colorectal Cancer under Acidosis by Activating the Calcineurin/NFAT1 Axis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hu, P.; Li, S.; Tian, N.; Wu, F.; Hu, Y.; Li, D.; Qi, Y.; Wei, Z.; Wei, Q.; Li, Y.; et al. Acidosis Enhances the Self-Renewal and Mitochondrial Respiration of Stem Cell-like Glioma Cells through CYP24A1-Mediated Reduction of Vitamin D. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*, 25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Upregulated; Supplementary File S9: GSEA PANC-1—4 days pH_e 6.6 vs. Ctrl; Supplementary File S10: GSEA PANC-1—pH_e-selected + 7.4 vs. Ctrl; Supplementary File S11—Uncropped Western Blots Membranes.

Author Contributions: Conceptualization, M.M.A., A.F.P. and N.P.; methodology, M.M.A., T.M.A.C., T.L., F.A.R., M.Y., G.C., A.F., S.A., C.V. and V.F.; software, F.A.R.; validation, M.M.A., T.M.A.C., F.A.R., T.L., M.Y., G.C., S.A., C.V., A.S., S.J.R., R.A.C., A.F.P. and N.P.; formal analysis, M.M.A., T.M.A.C., F.A.R., T.L., M.Y. and G.C.; investigation, M.M.A., T.M.A.C., F.A.R., T.L. and M.Y.; resources, A.S., S.J.R., R.A.C., A.F.P. and N.P.; data curation, M.M.A.; T.M.A.C., F.A.R., T.L., M.Y., G.C., S.A., C.V., A.S., S.J.R., R.A.C., A.F.P. and N.P.; writing—original draft preparation, M.M.A., T.M.A.C., F.A.R., T.L. and A.F.P.; writing—review and editing, M.M.A., T.M.A.C., F.A.R., T.L., M.Y., G.C., A.S., S.J.R., R.A.C., A.F.P. and N.P.; visualization, M.M.A., A.F.P. and N.P.; supervision, A.S., S.J.R., R.A.C., A.F.P. and N.P.; project administration, M.M.A., A.F.P. and N.P.; funding acquisition, A.S., S.J.R., R.A.C., A.F.P. and N.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Marie Skłodowska Curie Innovative Training Network (#GA 813834 pHioniC-H2020-MSCA-ITN-2018); ANR-AAAPG219 Mécanismes calcium-dépendants d'activation des cellules pancréatiques stellaires—Calstell Project; PRIN-2017 “Lioness” project (#GA 754345) from Italian Ministry for Education, University and Research (MIUR), by the Programma Operativo Complementare Ricerca e Innovazione, Asse I “Investimenti in Capitale Umano”—Azione I.1 “Dottorati innovativi con caratterizzazione industriale” del PON R&I 2014–2020, Deutsche Forschungsgemeinschaft (GRK 2515/1, Chembion and SCHW407/22-1); C.V. is funded by PhD scholarship D.M. 351/2022 (M4C1 – Inv. 4.1)/PNRR Research.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in this article and Supplementary Material.

Acknowledgments: We are grateful to Ania Trauzold, University of Kiel, Germany for kindly providing us with PANC-1 cells and we thank the Plateforme de Genotypage/Séquençage, Institut du Cerveau/Paris Brain Institute, ICM, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière CNRS UMR 7225—Inserm U 1127—Sorbonne Université UM75, for performing the RNA-seq.

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

References

1. Khalaf, N.; El-Serag, H.B.; Abrams, H.R.; Thrift, A.P. Burden of Pancreatic Cancer: From Epidemiology to Practice. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2021**, *19*, 876–884. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R.C.; Jones, C.; Coleman, H.G.; McCain, R.S. Pancreatic Cancer: A Review of Clinical Diagnosis, Epidemiology, Treatment and Outcomes. *WJG* **2018**, *24*, 4846–4861. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Orth, M.; Metzger, P.; Gerum, S.; Mayerle, J.; Schneider, G.; Belka, C.; Schnurr, M.; Lauber, K. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Biological Hallmarks, Current Status, and Future Perspectives of Combined Modality Treatment Approaches. *Radiat. Oncol.* **2019**, *14*, 141. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Pedersen, S.F.; Novak, I.; Alves, F.; Schwab, A.; Pardo, L.A. Alternating PH Landscapes Shape Epithelial Cancer Initiation and Progression: Focus on Pancreatic Cancer. *BioEssays* **2017**, *39*, 1600253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Carvalho, T.M.A.; Di Molfetta, D.; Greco, M.R.; Koltai, T.; Alfarouk, K.O.; Reshkin, S.J.; Cardone, R.A. Tumor Microenvironment Features and Chemoresistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Insights into Targeting Physicochemical Barriers and Metabolism as Therapeutic Approaches. *Cancers* **2021**, *13*, 6135. [\[CrossRef\]](#)
6. Zheng, T.; Jäättelä, M.; Liu, B. PH Gradient Reversal Fuels Cancer Progression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2020**, *125*, 105796. [\[CrossRef\]](#)
7. Webb, B.A.; Chimenti, M.; Jacobson, M.P.; Barber, D.L. Dysregulated PH: A Perfect Storm for Cancer Progression. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 671–677. [\[CrossRef\]](#)
8. Blaszczyk, W.; Swietach, P. What Do Cellular Responses to Acidity Tell Us about Cancer? *Cancer Metastasis Rev.* **2021**, *40*, 1159–1176. [\[CrossRef\]](#)
9. Stock, C.; Gassner, B.; Hauck, C.R.; Arnold, H.; Mally, S.; Eble, J.A.; Dieterich, P.; Schwab, A. Migration of Human Melanoma Cells Depends on Extracellular PH and Na⁺/H⁺ Exchange: Extracellular Protons Modulate Cell Migration. *J. Physiol.* **2005**, *567*, 225–238. [\[CrossRef\]](#)
10. Boedtker, E.; Pedersen, S.F. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2020**, *82*, 103–126. [\[CrossRef\]](#)

recovered to pH_e 7.4, whose migratory and invasive phenotypes were related to epithelial–mesenchymal transition induction (Figures 6d and 7d,f,h). These results are in accordance with previous RNA-seq data on 1-month acid-adapted PANC-1 cells [41] and microarray data on other pancreatic cancer cells adapted to low pH_e [86].

5. Conclusions

This work reports that the acidic tumor microenvironment provides certain PDAC cell subpopulations with selective survival benefits that allow them to survive under acidic stress conditions. They do so via genetic reprogramming toward the expression of proliferation, migration, invasion, autophagy, and EMT-related markers, leading to PDAC cells with enhanced metastatic potential which promote cancer progression (Figure 8).

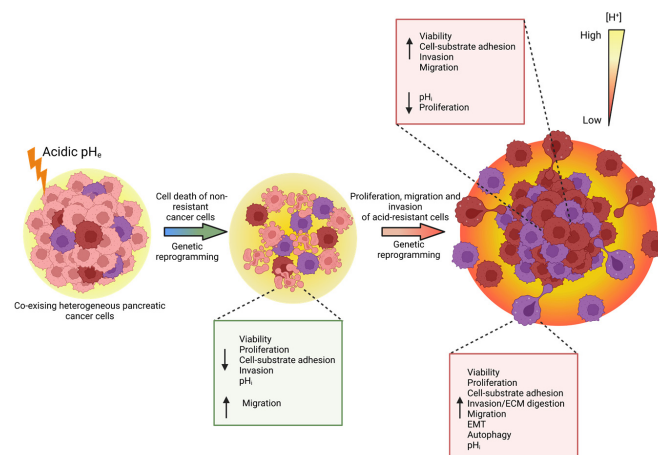


Figure 8. PDAC cells exposed to acidic extracellular conditions undergo a process of selection, characterized by acid-induced genetic and phenotypic alterations. This results in increased cell death due to the cytotoxic effect of low pH_e and decrease in cell-substrate adhesion, proliferation, and cell invasion. Along with the acid exposition, further genetic rewiring provides surviving cancer cells with more aggressive properties in terms of adhesion, migration, and invasion. Limited proliferative capacities are overcome when cells are acclimated to pH_e 7.4 following 1 month-long pH_e 6.6 treatment. ↓ arrow indicates downregulation, ↑ arrow indicates upregulation. The figure was created with [www.Biorender.com](http://www.biorender.com).

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cancers15092572/s1>, Figure S1: Effect of acidic pH_e on ATP production and of acidic pH_e acute treatment of cell-substrate adhesion in PANC-1 and Mia PaCa-2; Figure S2: Effect of acidic pH_e on single cell migration in PANC-1 cells and on Focal Adhesions (FAs) membrane recruitment on PANC-1 and Mia PaCa-2 cells; Figure S3: Establishment of a pH gradient in the Transwell system and effect of acute exposition to acidic pH_e on PANC-1 and Mia PaCa-2 cells' invadopodia activity and epithelial–mesenchymal transition; Figure S4: Principal component analysis (PCA) of RNA-seq-based expression data and gene ontology (GO) pathway enrichment analysis of PANC-1 differentially expressed genes (DEGs) in response to acidosis. Supplementary File S1: DEGs PANC-1—4 days pH_e 6.6 vs. Ctrl; Supplementary File S2: DEGs PANC-1— pH_e -selected + 7.4 vs. Ctrl; Supplementary File S3: EMT DEGs—4 days pH_e 6.6 vs. Ctrl; Supplementary File S4: EMT DEGs— pH_e -selected + 7.4 vs. Ctrl; Supplementary File S5: GO analysis PANC-1—4 days pH_e 6.6 vs. Ctrl—Downregulated; Supplementary File S6: GO analysis PANC-1—4 days pH_e 6.6 vs. Ctrl—Upregulated; Supplementary File S7: GO analysis PANC-1— pH_e -selected + 7.4 vs. Ctrl—Downregulated; Supplementary File S8: GO analysis PANC-1— pH_e -selected + 7.4 vs. Ctrl—

and showed increased paxillin recruitment to the cell periphery, with larger FAs compared to control (Figure S2c–f). On the contrary, the acute acidic treatment did not affect the size of FAs, their number, nor their plasma membrane recruitment in Mia PaCa-2 cells (Figure S2g–i).

One major step in tumor metastasis is local tumor cell invasion, a process promoted by acidic TME [10,21]. Our results indicated that, although PDAC invasive capacities are impaired during the early stages of low pH_e selection, they were indeed potentiated during long-term acidic treatment (1 month). More interestingly this pro-metastatic phenotype is conserved following cell re-acclimation to physiological pH_e (Figure 3f–h). Transwell invasion experiments performed with pH_e gradient (Figure 4d) demonstrated that the increased invasive properties acquired by acid-selected cells were further potentiated when cells found themselves at the interface with less acidic areas mimicking tumor-stroma boundaries, where cells are in contact with better perfused, and therefore less acidic, regions. Indeed, invadopodial activity was increased in PDAC pH_e -selected + 7.4 cells, leading to a more pronounced digestion of the ECM. Although we did not provide the molecular mechanisms involved, a major role in low pH_e -induced matrix degradation is expected for $Na^+ - H^+$ exchanger (NHE1), localized in the invadopodia [100–102] and which promotes the proteolytic activity of different proteinases [46,58,59], and by Carbonic Anhydrase IX (CAIX), which acidifies the extracellular space to promote MMP14 activity [60,103] and metastasis in vivo [104].

These results highlight the metastatic potential of pH_e -selected cells in vitro and indicate that the increased invasiveness results from a gradual selection of aggressive cell phenotypes induced by the acidic pH_e . However, our results following a short-term acid exposure contrast with previous reports with PDAC cells [20], which may explain the different strategies employed for creating the acidic conditions, and other cancer types [14,25,40,59]. In fact, particular attention should be addressed to the different responses that a specific maneuver of pH_e may induce in cancer cells [8]. Our results suggest that the impact of acidic pH_e on cell invasion depends on the strategy used for manipulating the pH , which can produce distinct responses based on the deregulation of specific proteins involved in pH_e/pH_i sensing and transduction. Moreover, the adaptation/selection process might produce different outcomes and take different times to activate/inhibit specific cell processes based on the cell type. We found that some extent of selection is observable after 15 days of acid treatment, concurrently with the progressive recovery of cell viability.

A section of the paper was devoted to underlining the role of acidic pH selection toward a mesenchymal phenotype. Indeed, EMT is another crucial step in disseminating tumor cells from the primary sites to other organs, providing cancer cells with invasive properties [105]. Our work showed that pH_e selection induced a mesenchymal phenotype in both PDAC cells, as demonstrated by an increase in the mRNA levels of several EMT markers. Moreover, PANC-1 exposed to pH_e 6.6 for 4 days and pH_e -selected + 7.4 cells showed a significant enrichment of the EMT gene set (as provided by dbEMT 2.0) in our DEG list (Figure 7a,b), including several metalloproteases and integrins genes. Interestingly, among the EMT genes enriched in the pH_e -selected + 7.4 cells DEG list, we also observed a significant increase in the FGFR2 expression, confirming the role of this receptor in PDAC cell EMT as recently suggested [106]. The EMT phenotype was confirmed by qPCR data, showing a significant decrease in Slug gene expression in the 4 days pH_e 6.6 models, which might correlate with the decrease in proliferative and invasive abilities in the early stages of pH_e selection, as suggested in colorectal cancer [107]. Several publications support the notion that extracellular acidosis promotes EMT [15,19,26,86]. In our work, RNA sequencing on PANC-1 cells allowed us to identify the different genetic signatures of the short-term and long-term (and recovery to pH_e 7.4) acid models, observing the acid-mediated downregulation of genes involved in cell growth, invasion, and adhesion or the upregulation of cell death-related genes during the early stages of pH_e selection (Figures 6c and 7c,e,g). We also validated that different gene sets of cell proliferation, ECM remodeling, migration, and invasion were associated with the acid-selected phenotypes

supporting recent evidences in same cell type [43], a feature that may represent a driving force for cancer progression, as suggested for other cancer types [7,93–95].

The results on pH_i levels correlated well with functional assays, as those PANC-1 cells exposed to acidic pH_e for 4 days had both a decrease in the proliferation rate and lower pH_i values than control cells. After 1 month of acidic pH_e exposure, the growth rate of PDAC cells was comparable to that of cells exposed for 4 days to pH_e 6.6. We confirmed this output in Mia PaCa-2 cells, although the inhibition of proliferation was less evident in these cells. Validation of the Ki67 proliferation marker and G0S2 quiescence marker mRNA levels confirmed our proliferation results (Figure 5c). These results agree with the well-established notion that internal acidification, probably due to external acidic pH_e , inhibits cell proliferation in pancreatic cancer [43,86]. Finally, PDAC cell proliferation was restored and further boosted by recovery in pH_e 7.4. These results clearly demonstrate that the acidic tumor microenvironment selects for cells with reduced growth capacities in acidic conditions but which display greater proliferative abilities when they come into contact with areas of physiological pH_e [10].

We showed that cell growth inhibition results from an increase in cell death, which gradually increased until it reached the maximum percentage of cell death at 4 days (Figure 2g,h). The reduced cell viability is the result of energy deprivation caused by glycolysis inhibition [96], as demonstrated by ATP shortage (Figure S1a,b) and by intracellular acidification (Figure 1b,c). We observed a subsequent, progressive, and almost complete recovery of cell viability (Figure 2g,h). This is likely due to the selection of a subset of cells resistant to the tumor acidosis-induced toxicity around the middle of the 1-month treatment. Consequently, almost all cells were alive at the end of the 1-month acidic exposure. Such a behavior was also observed in other cancer cell types [24,30,39,43,97].

Potential in cell migration and invasion represents a key feature of aggressive cancer progression. Quantification of the adhesive abilities of PANC-1 and Mia PaCa-2 cells to gelatin-coated wells under different acidic conditions (Figure 3) confirmed that cell-matrix interactions are inhibited under acidic conditions during the early phase of acidotic stress (4 days pH_e 6.6), as previously demonstrated in other works [19,29,31]. On the contrary, acid selection enhanced the ability of PDAC cells to adhere, maintaining this feature once PANC-1 cells face back physiological pH_e 7.4 (Figure 3a,b). The acidic treatment led to PDAC cells with an increased migratory potential at population (Figure 3c–e) and single-cell level (Figure S2a,b), with further accentuation in cells re-acclimated to pH_e 7.4 (Figure 3c–e). Of particular interest are the results obtained from pH_e -taxis experiments, which confirmed that the same behavior was observed in the presence of a pH_e gradient, allowing the cells to migrate from an acidic compartment to a pH_e 7.4 one (Figure 4a–c). These data support the hypothesis of acidic selection of a more invasive phenotype as observed on the edges of the tumor. Interestingly, this behavior is not common to immune cells which instead tends to move toward a more acidic pH_e [98].

Despite the inhibition of cell attachment of PANC-1 and Mia PaCa-2 cells exposed for 4 days to low pH_e , those cells migrated faster in acidic conditions.

The apparent contradictory behavior induced at early stages of acidic pH_e selection (4 days), i.e., lower cell-matrix adhesion properties and increased migration velocity, could be explained by an early acidic pH_e selection. In line with this hypothesis, the few PANC-1 cells that survived and remained attached to the gelatin-coated surfaces at the early stages of pH_e 6.6 exposure might have already evolved sufficiently into a more aggressive phenotype characterized by faster cells, as suggested by the greater percentage of PANC-1 cells characterized by high-velocity respect to control cells (Figure S2d). The acquisition of this migratory phenotype might not require longer acidic treatment or acclimation to pH_e 7.4. In this context, focal adhesions (FAs) might be involved. They play a key role in cell migration, as these multi-protein assemblies represent the main linkage between the intracellular cytoskeleton and extracellular matrix, promoting membrane protrusion at the leading edge of migrating cells [99]. Our immunostaining results on PANC-1 cells might confirm this, as cells exposed for 4 days to pH_e 6.6 were faster than control cells

GO database and resulting from the analysis of genes downregulated in PANC-1 4 days pHe 6.6 cells vs. Control, and (d) in PANC-1 pHe-selected + 7.4 cells vs. Control, and of genes upregulated in (e) PANC-1 4 days pHe 6.6 cells vs. Control, and (f) in PANC-1 pHe-selected + 7.4 cells vs. Control. (g) RNA-Seq data of PANC-1 4 days pHe 6.6 and (h) pHe-selected + 7.4 cells analyzed using gene set enrichment analysis (GSEA) and presented as enrichment score (ES) plots. GSEA showed significant enrichment of cell-substrate adhesion, and migration-related gene sets in the two acidic conditions, and of proliferation-related gene set for pHe-selected + 7.4. *y*-axes in GSEA plots represent the ES function, while *x*-axes display a red-blue color scale corresponding to the ranked list of DEGs (from the most up- to the most downregulated one, respectively) following one of the two acidic treatments. Vertical black lines above the red-blue scale in each plot refer to the position of each gene of the selected gene set along the ranked gene list as returned by the differential expression analysis of experimental data.

Finally, to validate and deepen these results, the GO database was also interrogated using GSEA software (see Section 2.11 for more details on parameter settings). GSEA results are in good agreement with the previous ones, showing that 4 days exposure of PANC-1 cells to pHe 6.6 decreases cell adhesion properties (Figure 7g). The long-lasting selection protocol induces a general enhancement of cell adhesion, proliferation, and migration in relation to the mesenchymal-like phenotype of PANC-1 cells kept under acidic conditions (Figure 7h). The full tables of significant terms resulting from GSEA can be found in Files S9 and S10.

4. Discussion

In the same way as most other cancers, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma is characterized by a highly acidic microenvironment resulting from the aberrant blood perfusion and the metabolic rearrangement that cancer cells put in place to meet the increased demand for energy and nutrients needed for their growth. In this study, we characterized the response of PDAC cell lines, PANC-1 and Mia PaCa-2, to short term (4 days) or long-lasting (1 month) acidosis (pHe 6.6) exposure on PDAC cellular hallmarks. Although previous research already showed that prolonged treatment induce a phenomenon of acid adaptation in pancreatic cells [41,43,86,87] little is known about the metastatic potential of the acid-selected cancer cells. To this purpose we established a model by re-exposing acidic selected cells to pHe 7.4 for two weeks. This treatment mimics the interface between acidic microenvironment of the tumor and the physiological pHe of the adjacent non-tumorous tissue. Indeed, tumor acidosis is not restricted to its hypoxic core, but it extends toward the interface between the tumor and normal tissue which delineates the margin of a malignant tumor when cells invade neighboring healthy tissues and blood vessels [21,88].

Our data indicate that acidic pHe selects for more aggressive pancreatic cancer cells via the increase in cell death during the short-term exposition (4 days). This leads to the survival of acid-resistant cells to low pHe stress that further outgrew and underwent EMT to acquire a more aggressive and invasive phenotype when exposed to pHe 7.4.

One feature of cancer cells is the pH gradient reversal compared to their healthy counterparts, leading to extracellular acidification coupled with the relative alkalization of the intracellular space [7,89]. pHi homeostasis is important for the correct functioning of various physiological and pathological cellular processes. Despite the interest of the cancer cell to maintain a stable pHi, it is subjected to variations in external pH; therefore, sudden acidification of the extracellular space can result in the disruption of the pHi steady-state, which may pave the way toward selective pressures as a survival mechanism [6,90]. Our results indicated that short and long acidic exposure induces a slight decrease, although not significant, in the PANC-1 basal pHi (Figure 1b,c), in accordance with previous reports [43,91,92]. Our data demonstrated that the basal pHi value is not only recovered but further increased when PANC-1 pHe-selected cells face back pHe 7.4 (Figure 1b,c),

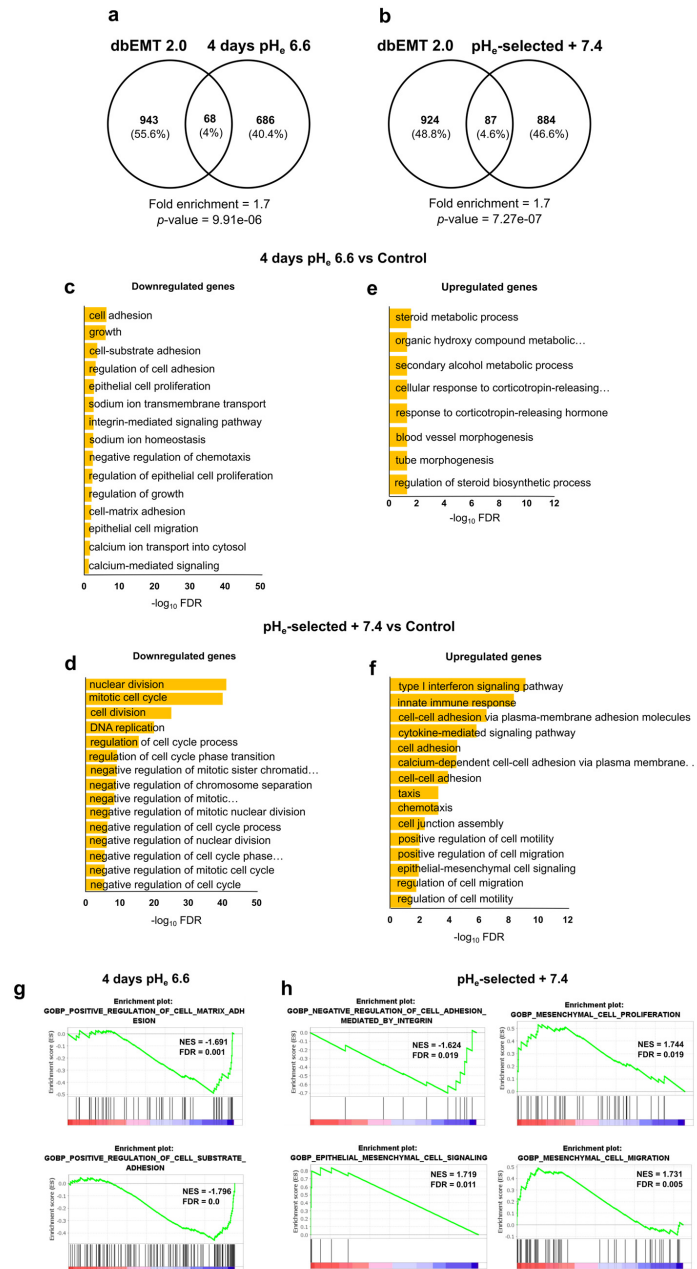


Figure 7. Gene ontology (GO) and gene set enrichment analysis (GSEA) of differentially expressed genes in PANC-1 cells in response to acidosis. (a) Venn plots showing overlapped dbEMT2.0 curated genes and differentially expressed genes (DEGs) in PANC-1 4 days pH_e 6.6 and (b) PANC-1 pH_e-selected cells + 7.4. (c) Bar chart of the most relevant enriched biological processes as defined in (a). (d) Bar chart of the most relevant enriched biological processes as defined in (b). (e) Bar chart of the most relevant enriched biological processes as defined in (a). (f) Bar chart of the most relevant enriched biological processes as defined in (b). (g) Enrichment plots for 4 days pH_e 6.6. (h) Enrichment plots for pH_e-selected + 7.4.

vasive phenotype [66,67], Guanylate Cyclase 1 Soluble Subunit Alpha 2 coding gene (GUCY1A2), which mediates cell growth and survival in different cancer cell types [68–72], and PRICKLE1, prickle planar cell polarity protein 1, a member of the planar cell polarity (PCP) pathway which is involved in cancer cell metastasis [73,74]. Stronger gene deregulations are observed for pH_e-selected + 7.4 cells, where the top 10 upregulated genes include Interferon Alpha Inducible Protein 27 (IFI27), a prognostic marker for pancreatic cancer [75] that promotes PDAC cell proliferation, migration, and invasion [76]; bone morphogenetic protein 7 (BMP7), a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) family reported to be involved in tumor metastasis, including pancreatic cancer where it promotes EMT and invasiveness in PANC-1 cells via matrix metalloproteinase (MMP)-2 upregulation [77]; Interleukin-32 (IL32), involved in PDAC cells invasiveness [78]; tripartite motif-containing 2 (TRIM2), which increases PDAC tumorigenesis both in vitro and in vivo [79]. Among top downregulated genes, amphiregulin (AREG) is involved in EMT and growth in different types of cancer, including PDAC [80], while Adhesion G Protein-Coupled Receptor F1 (ADGRF1) has an important role in inducing quiescence and chemoresistance in breast cancer [81]. Other downregulated genes include Traf2- and Nck-interacting kinase (TNIK), involved in colorectal carcinogenesis via modulation of Wnt signaling pathway [82], and Ankyrin-3 (ANK3), whose knock-down was reported to decrease the growth of prostate cancer cells while promoting their invasion both in vitro and in vivo [83], and to inhibit invasive abilities of thyroid cancer cells and their tumorigenesis when ectopically expressed [84].

To deepen the role of pH_e selection and recovery in EMT process, we performed a hypergeometric test to measure the significance of the overlap between our DEG list and the set of genes involved in EMT as provided by dbEMT 2.0 (<http://dbemt.bioinforminzhao.org>) [85]. Interestingly, the data clearly show a 1.7-fold enrichment of the EMT gene set in our DEG list (p -value = 7.27×10^{-7}) in pH_e-selected + 7.4 cells as well as in 4 days pH_e 6.6 cells (p -value = 9.91×10^{-6} , fold enrichment = 1.7) (Figure 7a,b; see Files S3 and S4 for a complete list of EMT DEGs). These data agree with the significant increase in EMT markers expression in both early and late stages of acidosis adaptation (Figure 5), thus supporting the hypothesis that acidosis selects more invasive cell phenotypes by promoting EMT and thus paving the way for more aggressive cell phenotypes.

To corroborate the functional assays and results obtained in vitro, up- and downregulated DEG lists were separately tested for over-representation through hypergeometric distribution by ToppFun web tool (see Materials and Methods section). The analysis of 4 days pH_e 6.6 downregulated genes returned many enriched GO terms (biological processes) related to cell adhesion, cell growth, proliferation, and (negative regulation of) migration (Figure 7c), whereas very few terms resulted in upregulated PANC-1 cells exposed to short-term acidosis (Figure 7e). Pathway analysis further confirmed the involvement of 4 days pH_e 6.6 downregulated genes in cell adhesion-related processes (such as β 1 integrin cell surface interactions and focal adhesions) as well as a significant contribution to cholesterol biosynthesis and NOD-like receptor signaling pathway coming from the upregulated genes (Figure S4c–d, respectively). As for the pH_e-selected + 7.4 condition, GO terms (biological processes) linked to the negative regulation of cell cycle and cell growth are significantly over-represented within the set of the downregulated genes (Figure 7d), while biological processes associated with cell adhesion, cell migration, and EMT are significantly enriched in the upregulated gene list (Figure 7f). Accordingly, pathway analysis points at a significant alteration in cell cycle-associated processes due to the genes downregulated in pH_e-selected + 7.4 condition, while the upregulated ones are mostly involved in the cadherin signaling pathway, interferon signaling, and cell invasion-associated processes, including degradation of the extracellular matrix and DUB metalloproteases (Figure S4e,f). The complete lists of all the enriched terms returned by such an over-representation analysis are provided in the Supplementary Materials (see Files S5–S8).

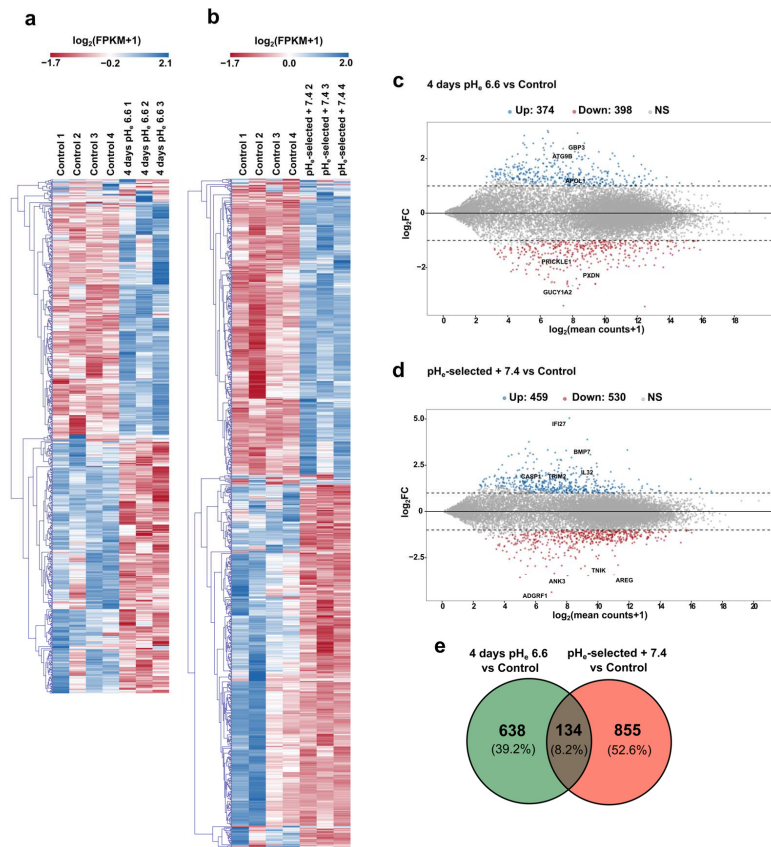


Figure 6. Differential transcriptomic profiles in PANC-1 cells in response to acidosis. (a) Heatmaps of RNA-Seq transcriptomic data relative to the differentially expressed genes (DEGs) detected comparing PANC-1 control condition against 4 days pH_e 6.6 cells and (b) PANC-1 pH_e-selected + 7.4 cells, respectively. Rows of the heatmaps represent the DEGs detected in the two comparisons, while columns are the individual biological replicates. Gene expression values are shown as gene-wise median-centered “log₂(FPKM+1)” (FPKM = Fragments Per Kilobase of sequence per Million mapped reads) according to a red-to-blue color gradient. (c) MA-plots showing gene differential expression observed in PANC-1 after 4 days at pH_e 6.6 and (d) in PANC-1 pH_e-selected + 7.4 cells compared to Control. “M = log₂FC” vs. “A = log₂(mean counts+1)”. Downregulated genes are in red, while upregulated DEGs are in blue. Grey dots indicate non-significant gene expression changes. (e) Venn diagram summarizing the number of differentially expressed genes in PANC-1 4 days pH_e 6.6 cells vs. Control and pH_e-selected + 7.4 cells vs. Control; the number of genes deregulated in both acidic conditions is represented by the overlap between the two circles.

Highly upregulated genes in 4 days pH_e 6.6 cells includes GBP3, a member of the guanylate-binding protein family, which induces caspase-dependent apoptosis in leukemia cells [62] and exerts an anti-tumor role in colorectal cancer [63]. However, its pro-tumor role has also been previously reported [64]. Among the top five downregulated genes in 4 days pH_e 6.6 cells, we find PXDN, coding for Peroxidase, a heme peroxidase which has been associated with proliferation in endothelial cells [65] and with cancer cells in-

E-cadherin and N-cadherin mRNA expression levels were then validated at the protein level in both cell lines (Figure 5d,e). Although the PANC-1 cell line shows increased N-cadherin expression during the different exposures to acidic pH_e at mRNA level (Figure 5a,b), it reaches significant protein upregulation only in pH_e -selected + 7.4 cells (Figure 5d,e). Mia PaCa-2 cells follow a similar mRNA expression pattern in the different acidic conditions (Figure 5b). The acidic treatment-induced shift towards the acquisition of a more mesenchymal phenotype in PANC-1 and Mia PaCa-2 cells is confirmed by the increased mRNA expression of additional mesenchymal markers, Twist1 and Snail. (Figure 5a,b), while Vimentin mRNA levels are significantly increased in PANC-1 cells (Figure 5a,b) but not in Mia PaCa-2 cells, as confirmed by protein quantification (Figure 5d,g). Vimentin overexpression is confirmed by Western blot, showing a significant increase in PANC-1 cells exposed to 1 month to pH_e 6.6 and those subsequently recovered to pH_e 7.4 (Figure 5d,f). Both PDAC cell lines express Slug at low mRNA levels (Figure S3f). However, its gene downregulation is detected following 4 days-long acidic treatment (Figure 5a,b), while a clear upregulation emerges in pH_e -selected cells recovered to pH_e 7.4. These results reinforce the idea that the acidic tumor microenvironment promotes the acquisition of more aggressive cellular phenotypes via the epithelial-mesenchymal transition, especially in PANC-1 cells.

To further support the previous proliferation results (Figure 2 and Figure S1), PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were tested for the mRNA expression of Ki67, an important proliferation marker, and G0S2, a protein involved in the maintenance of hematopoietic stem cells in a quiescent state [61] (Figure 5c). Ki67 upregulation is confirmed in PANC-1 and Mia PaCa-2 pH_e -selected + 7.4 cells, indicating their enhanced proliferative potential compared to control cells, while its expression is decreased in 4 days- and 1-month-long acidic treatment (Figure 5c). Both PDAC cell lines exposed for 4 days to pH_e 6.6 then display a proliferation arrest in the G0 phase, as demonstrated by the enhanced mRNA expression of the G0S2 marker. The reversibility of this cell-cycle arrest is shown by the progressive decrease in the G0S2 marker expression in cells following 1-month-long pH_e 6.6 treatment and further recovered to physiological pH_e , particularly in PANC-1 cells (Figure 5c).

3.5. Differential Transcriptomic Profiles in PANC-1 Cells in Response to Acidosis

To study the effects of the acidic pH_e on gene expression profile in PANC-1 cells, RNA samples from control, 4 days pH_e 6.6, and pH_e -selected + 7.4 cell models were subjected to RNA-sequencing.

Raw paired-end reads were first trimmed to remove adapter contamination; then, STAR aligner was used with RSEM to obtain the count table at gene level as detailed in the Materials and Methods section. Principal component analysis (PCA) was conducted to check the consistency of the three experimental groups (Figure S4a,b); then, the DESeq2 Bioconductor package was used to assess differential gene expression. Our results lead to the identification of 772 differentially expressed genes (DEGs) in PANC-1 cells exposed for 4 days to pH_e 6.6 compared to control samples (398 genes downregulated and 374 genes upregulated), while 989 DEGs are identified between control and pH_e -selected + 7.4 samples (530 genes downregulated and 459 genes upregulated) (Figure 6a–d and Files S1 and S2 for the full DEG lists and the related statistics). Notably, just 134 genes (8.2% of the total DEGs) are in common between the two experimental conditions of pH_e manipulation (see Venn diagram in Figure 6e), representing the transcriptional correlate of that specificity already observed through functional assays.

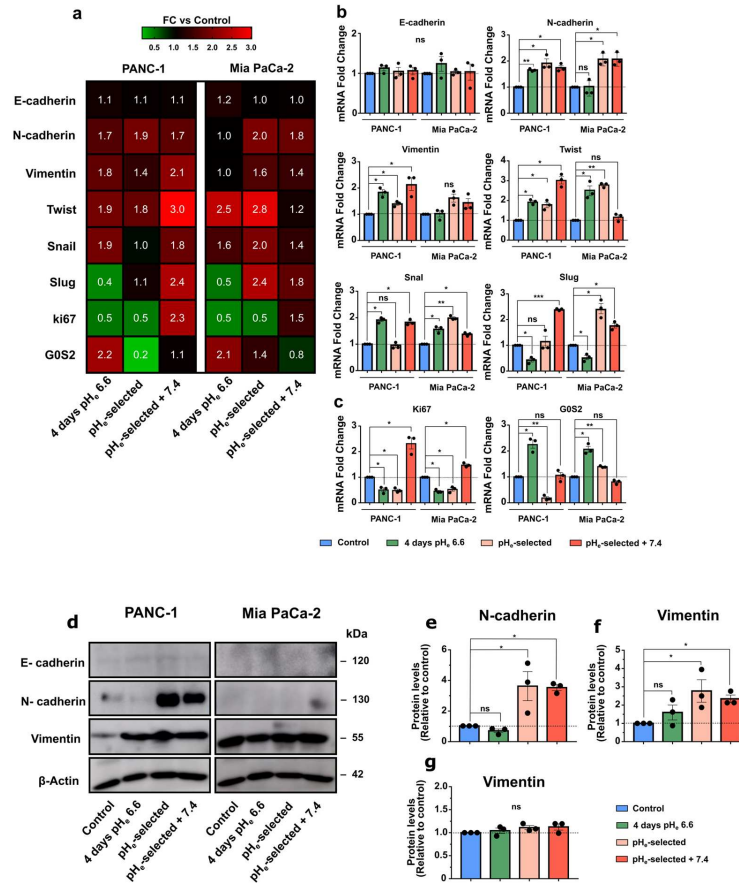


Figure 5. Effects of acidic pH_e on epithelial–mesenchymal transition and proliferation markers of PDAC cell. **(a)** Heatmap of mRNA levels for epithelial–mesenchymal transition (EMT) markers in PANC-1 and Mia PaCa-2 cells. Columns represent each condition of the different PDAC cell lines, while rows indicate each differentially expressed gene. The value indicated is the mean value of the fold change of triplicate samples relative to control. Fold changes relative to control are visualized using a green-to-red gradient color scale. **(b)** mRNA expression levels of the different EMT markers and **(c)** proliferation (Ki67) and cell-cycle arrest (G0S2) markers in PANC-1 and Mia PaCa-2 cells subjected to acidic treatment for different periods and presented as fold change values, obtained by RT-qPCR. The effects of pH_e 6.6 treatment on EMT and proliferation marker expression were compared with control samples (dotted lines). Fold changes were quantified using the 2^{-ΔΔC_q} method and normalized to HPRT reference gene. **(d)** Representative Western blot results that illustrate the effect of different times of exposure to acidic pH_e on EMT proteins in PANC-1 and Mia PaCa-2 cells. **(e)** Relative densitometric quantification of Western blot results, showing the abundances of N-cadherin and **(f)** Vimentin proteins in PANC-1 cells and **(g)** Vimentin protein levels in Mia PaCa-2 cells compared to control conditions after normalization with β-actin. Data were presented as mean and ± SEM and analyzed using one-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparisons test. All data reported were obtained from three independent experiments, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001, ns not significant. The uncropped blots are shown in Supplementary File S11—Uncropped Western Blots Membranes.

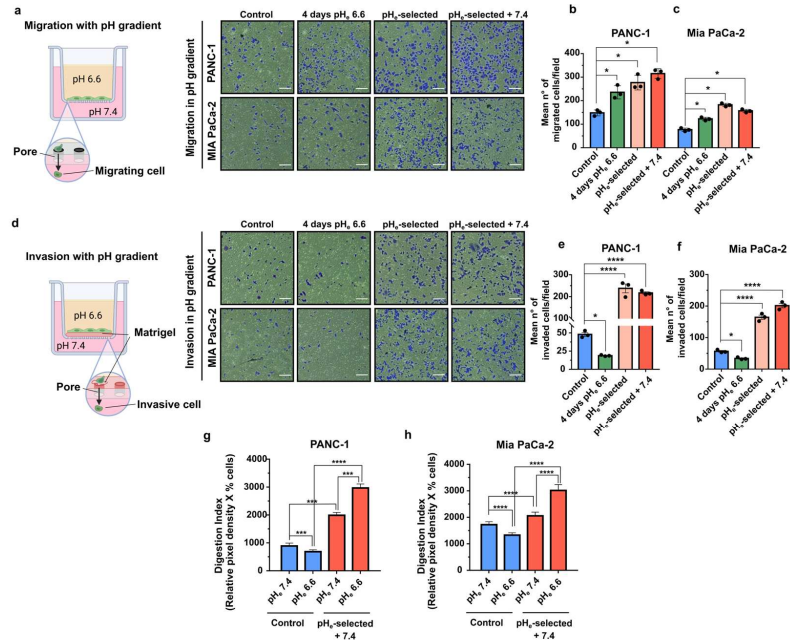


Figure 4. Effects of a pH_e gradient on PDAC cells migration, invasion, and invadopodia activity. (a) Representative microscopic images of PDAC cells' migration assay, showing cells that migrated through the transwell membrane in a pH gradient, allowing cells to move from an acidic compartment to the pH 7.4 bottom part of the transwell. Scale bar = 100 μm. (b) Quantification of the mean number of migrated cells of the transwell migration assay in PANC-1 and (c) Mia PaCa-2 cells in the presence of a pH gradient. (d) Representative microscopic images of PDAC cell invasion assay, showing cells that invaded through the Matrigel-coated transwell membrane in a pH gradient. Scale bar = 100 μm. (e) Quantification of the mean number of invaded cells of the transwell invasion assay in PANC-1 and (f) Mia PaCa-2 cells in the presence of a pH gradient. (g) Effect of acidic pH_e on the Digestion Index of both PANC-1 and (h) Mia PaCa-2 control and pH_e-selected + 7.4 cells. The percentage of cells that produced invadopodia and their ECM degradation was determined by in situ zymography. The mean total invadopodia proteolytic activity was calculated as follows: Digestion Index = % of cells positive for invadopodia ECM digestion × mean pixel density of focal ECM digestion/cell. Data were reported as mean and ± SEM and analyzed using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test with Tukey's multiple comparisons test for (g,h). All data shown were obtained from three independent experiments, * p < 0.05, *** p < 0.001, **** p < 0.0001.

3.4. Effects of pH_e 6.6 on Epithelial-Mesenchymal Transition and Proliferation Markers of PANC-1 and Mia PaCa-2 Cells

Considering the previous results and the more aggressive behavior showed by acid-selected cells, we assessed whether acidic pH_e-induced selection determines the acquisition of mesenchymal properties in PDAC cell lines. Therefore, different EMT markers were evaluated at mRNA levels by qPCR. As previously demonstrated [53], PANC-1 and Mia PaCa-2 cell lines are characterized by low E-cadherin mRNA expression levels, which are not affected by the different acidic pH_e exposures (Figure 5a,b and Figure S3f).

The correlation between migratory cell properties and cell invasion was studied by using Matrigel-coated Transwell filters. Interestingly, early stages of acidic selection (4 days pH_e 6.6) significantly inhibit the invasive abilities of both PANC-1 and Mia PaCa-2 cells (Figure 3f–h). The effect is reversed with a prolonged exposition to acidic pH_e conditions (pH_e -selected cells) at a similar rate as pH_e -selected + 7.4 cells (Figure 3f–h).

The role of pH_e selection on both migration and invasion in the context of a microenvironmental pH_e gradient was evaluated by experimentally establishing a pH_e gradient in the Transwell system. This experimental condition would mimic the interface between acidic cancer edges and neighboring healthy tissues and blood vessels. To simulate this situation, PDAC cells were plated in pH_e 6.6 media and allowed to migrate or to invade (through the Matrigel coating) toward pH_e 7.4 media overnight. Migration assay clearly demonstrates that all three acid-treated PDAC cell models (4 days pH_e 6.6; pH_e -selected and pH_e -selected + 7.4) respond to the pH_e gradient more avidly than the control cells (Figure 4a–c). In contrast, invasion of PANC-1 and Mia PaCa-2 cells exposed to pH_e 6.6 for a short term (4 days pH_e 6.6 cells) along the alkalizing pH_e gradient is significantly inhibited compared to control cells (Figure 4d–f). On the contrary, prolonged treatment with acidic media enhances the invasion of both PDAC pH_e -selected cells towards the compartment filled with pH_e 7.4 as compared to control. This invasive behavior is maintained in PANC-1 and Mia PaCa-2 pH_e -selected + 7.4 cells (Figure 4d–f).

Cancer cells digest extracellular matrix (ECM) on their way to local or distant metastases. To accomplish this task, cells employ specialized structures called invadopodia, F-actin-rich membrane protrusions that mediate protease-dependent proteolysis of ECM components. Previous works have elucidated the critical role of extracellular acidosis in invadopodial function and invasion [46,56–60]. Therefore, we next assessed whether the extracellular acidosis could promote the invadopodia-mediated proteolytic degradation of the ECM by performing an in situ zymography in both PANC-1 and Mia PaCa-2 cells. To this purpose, cells were plated on quenched DQ-Green-BSA-containing Matrigel-coated slides the invadopodia-mediated focal ECM digestion was quantified via the measurement of the ECM Digestion Index (Figure 4g,h), which derives from the combination of % of cells positive for invadopodial ECM digestion \times mean pixel density of focal ECM digestion/cell (see Section 2.10) that are presented as single parameters in Figure S3b–e. The invadopodia-mediated ECM digestion assay was performed in both PDAC control and pH_e -selected + 7.4 cells subjected to an overnight exposition to acidic pH_e (pH_e 6.6) or physiological pH_e (pH_e 7.4) (same protocol as in Figure 4a–f). Acidic overnight treatment (pH_e 6.6) of both PANC-1 and Mia PaCa-2 control cells reduces the invadopodial Digestion Index compared to control cells exposed to pH_e 7.4 (Figure 4g,h). On the contrary, the Digestion Index is very much higher in both PANC-1 and Mia PaCa-2 pH_e -selected + 7.4 cells compared to the control cells at pH_e 7.4 and pH_e 6.6. Moreover, extracellular acidosis further increases the Digestion Index of pH_e -selected + 7.4 cells compared to the same cells at physiological pH_e . Thus, prolonged exposure of PDAC cells to acidic conditions selects cells with higher proteolytic invadopodial activity, conferring a more aggressive and invasive phenotype to these cells.

3.3. Acid Selection at pH_e 6.6 Promotes Adhesion, Migration, and Invasion of PANC-1 and Mia PaCa-2 Cells

The role of acidic pH_e on cell migration and invasion was initially investigated by studying their ability to adhere to gelatin. A period of 4 days of extracellular acidification significantly inhibits both PANC-1 and Mia PaCa-2 cell adhesion compared to the control condition (~50 % reduction; Figure 3a,b). The inhibitory effect of acidic pH_e is already present after 1 h of acidic exposure of PANC-1 cells growing at pH_e 7.4 (control cells) (Figure S1e). On the contrary, one-month extracellular acidification (pH_e -selected cells) promotes an increase in PANC-1 and Mia PaCa-2 adhesion compared to their respective control groups. A similar positive effect on cell adhesion is observed on adhesion of PANC-1 pH_e -selected + 7.4 cells (Figure 3a). However, surprisingly Mia PaCa-2 pH_e -selected + 7.4 cells decrease their adhesion ability as compared to control (Figure 3b). Mia PaCa-2 cells are less sensitive to a 1 h acid treatment, which does not affect the adhesive properties of pH_e -selected cells (Figure S1f).

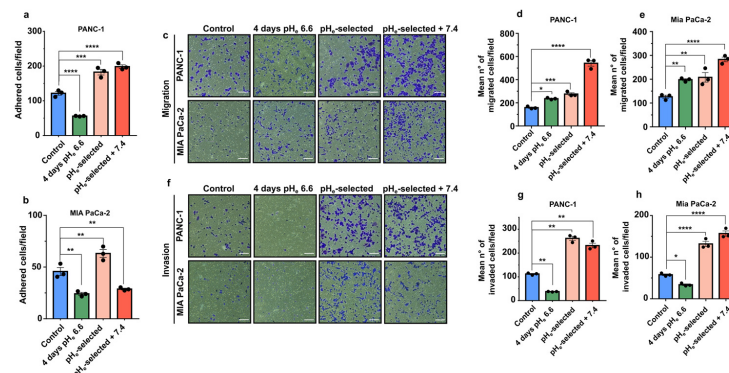


Figure 3. Effects of acidic pH_e on PDAC cell adhesion, migration, and invasion. **(a)** Quantification of PANC-1 and **(b)** Mia PaCa-2 cell adhesion assays. Cells were exposed to acidic conditions for different periods. Data were reported as mean \pm SEM from at least 4 representative regions for each condition. **(c)** Representative brightfield microscopic images of crystal violet-stained PDAC cell (in blue) that migrated through the transwell membrane in the migration assay. Scale bar = 100 μ m. Quantification of the mean number of migrated **(d)** PANC-1 and **(e)** Mia PaCa-2 cells determined in a transwell 18-h long migration assay. Data were reported as mean \pm SEM. **(f)** Representative images of PDAC cell models that invaded through the Matrigel-coated transwell membrane in the invasion assay. Scale bar = 100 μ m. Quantification of the mean number of invaded cells of the 18-h long transwell invasion assay in **(g)** PANC-1 and **(h)** Mia PaCa-2 cells. Data were reported as mean \pm SEM of three independent experiments and analyzed using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. All data shown were obtained from three independent experiments, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

In the second set of experiments, the migratory ability of PDAC cells was evaluated using Transwell migration assays. The data presented in Figure 3c–e show that cell migration is significantly enhanced during the early stages of pH_e treatment (4 days pH_e 6.6) and in pH_e -selected cells, with a maximal effect in pH_e -selected + 7.4 (Figure 3c–e). Time-lapse video-microscopy assays were also performed to confirm the enhanced migratory activity at the single-cell level after 4 days of acidic pH_e treatment in PANC-1 cells (Figure S2a,b). This increase in PANC-1 cell migration nicely correlates with the higher recruitment of paxillin, a central Focal Adhesion (FA)-adaptor protein and a marker for nascent focal adhesion [55] toward the cell periphery and by larger FAs compared to control (Figure S2c–f).

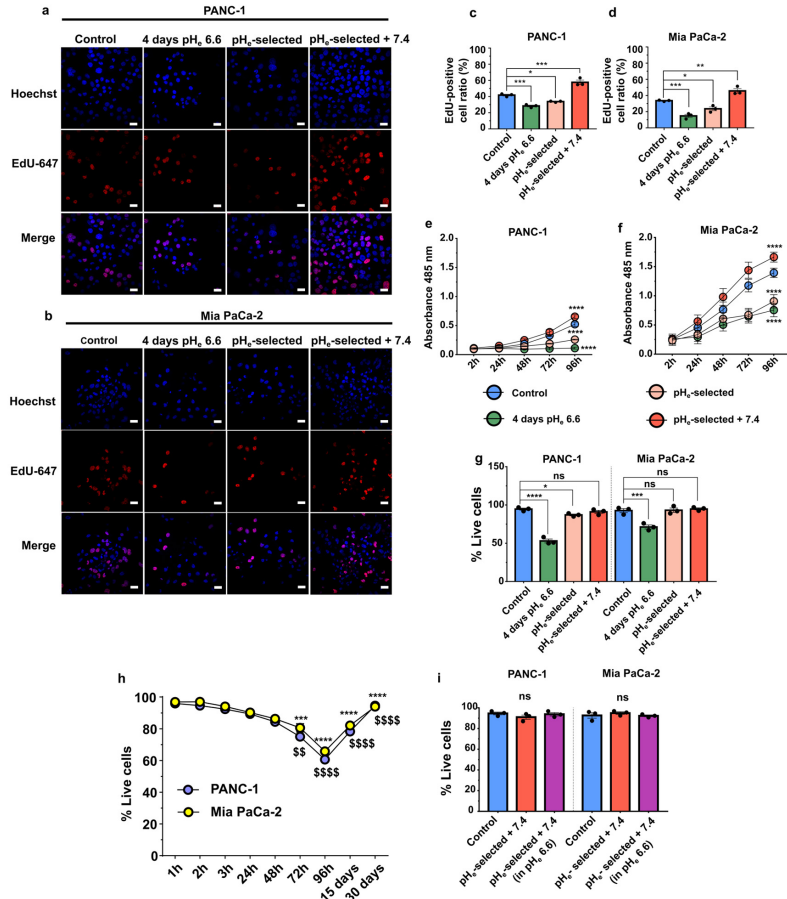


Figure 2. Effects of acidic pH_e on PDAC cells' viability and proliferation. (a) Representative fluorescence images of PANC-1 and (b) Mia PaCa-2 cell proliferation obtained by EdU staining assay (red, Alexa Fluor 647) and Hoechst (blue) nuclear staining. Scale bar = 20 μm. (c) Quantification of the percentage of PANC-1 and (d) Mia PaCa-2 EdU-positive cells upon treatment with acidic pH_e. Data were reported as the percentage of EdU/Hoechst-positive cell mean ± SEM from 4 representative regions for each condition. Time course of proliferation of the different models of (e) PANC-1 and (f) Mia PaCa-2 cells assessed by an MTS assay. Significant differences between control cells vs. all other conditions at 96 h. (g) Determination of PANC-1 (left) and Mia PaCa-2 (right) cell viability by trypan blue exclusion assay in control cells (pH_e 7.4), 4 days pH_e 6.6 and pH_e selected + 7.4 (1 month in pH_e 6.6 followed by 2 weeks in pH_e 7.4). (h) Time course of PANC-1 (blue) and Mia PaCa-2 (yellow) cell viability by trypan blue exclusion assay in control cells exposed to acidic pH_e for different times. Significant differences in PANC-1 (*) or Mia PaCa-2 cells (\$) at each time point of acidic treatment vs. 1 h. (i) Determination of PANC-1 (left) and Mia PaCa-2 (right) cell viability as assessed by trypan blue exclusion assay in control cells (pH_e 7.4) and pH_e selected + 7.4 (1 month in pH_e 6.6 followed by 2 weeks in pH_e 7.4 and following 96 h treatment in pH_e 6.6). Data were presented as mean ± SEM using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. All data shown were obtained from three independent experiments, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001, **** *p* < 0.0001, \$\$, *p* < 0.01, \$\$\$ *p* < 0.0001, ns = not significant.

cells (Figure 1d). This is accompanied by an increase in cell area and a decrease in cell circularity (Figure 1e,f, green bars). This spread-out and elongated shape is still maintained in PANC-1 and Mia PaCa-2 selected cells + 7.4 (Figure 1d–f, red bars). Interestingly, Mia PaCa-2 cells show similar behavior after 1-month of acid selection (Figure 1d,f, pink bars). This treatment induces a significant decrease in the cell area of PANC-1 cells (Figure 1d,e, pink bar).

3.2. Extracellular Acidification Decreases Cell Proliferation in PANC-1 and Mia PaCa-2 Cells

Cell proliferation is strictly regulated by the pH_e/pH_i ratio. We quantified DNA-synthesizing cells by using EdU incorporation, and the metabolic activity as an indication of the proliferative state of cells was quantified by MTS assay. The data showed a significant inhibition of both PANC-1 and Mia PaCa-2 cell proliferation by extracellular acidification independently of the time of acidic pH_e exposure. Indeed, the ratio of Edu positive/Hoechst cells is reduced and the absorbance of the MTS reagent is reduced in 4 days pH_e 6.6 and pH_e -selected cells when compared to the control groups (Figure 2a–f, Figure S1a,b). Data were also confirmed by quantifying the ATP production (Figure S1c,d). Interestingly, a significant increase in the fraction of EdU-positive cells or increase in MTS absorbance is detected in pH_e -selected + 7.4 cells, demonstrating that pH_e 7.4 treatment following long-term acid exposure enhances cell proliferation in both PDAC cell lines as compared to control conditions (Figure 2c–f).

The enhancement in cell viability in pH_e -selected cells after recovery at pH_e 7.4 is further confirmed in PANC-1 by quantification of the ATP production by metabolically active cells. However, no significant differences are detected between Mia PaCa-2 control and pH_e -selected + 7.4 (Supplementary Figure S1a). The reduced proliferation observed in PANC-1 and Mia PaCa-2 cells following a 4 days-long treatment with acidic pH_e is the consequence of an increase in cell death, as detected by the trypan blue exclusion assay. The latter shows that the percentage of dead cells reaches almost 50% after 4 days in acidic pH_e media for PANC-1 cells and nearly 30% in Mia PaCa-2 cells (Figure 2g). However, this phenomenon appears to be overcome as the acidic treatment continued. After 15 days-long acidic treatment, the percentage of live cells recovers, reaching almost 90% after 1 month in low pH_e conditions (Figure 2h). These results indicate that acute acidification promotes significant cell death in both PDAC cell lines (Figure 2h) within the first 96 h after seeding, selecting a subpopulation of cells that outgrows and is viable under acidic conditions, with a higher proliferation rate as compared to non-selected PANC-1 cells (Figure 2e,* and \$ symbol), which is consistent with more aggressive phenotype. To better clarify the acquired proliferative and more acid-resistant behavior of PDAC pH_e -selected + 7.4 cells, they were subjected to a 4-days long treatment with pH_e 6.6. Cell viability was assessed at the end of the treatment, obtaining no significant differences in the percentage of live cells when compared with the same cells kept in pH_e 7.4 and control cells (Figure 2i). These results indicate that PDAC control and pH_e -selected + 7.4 cells respond differently to low pH_e , thus suggesting a selection of acid-resistant cells whose phenotype is also maintained after recovering in pH_e 7.4.

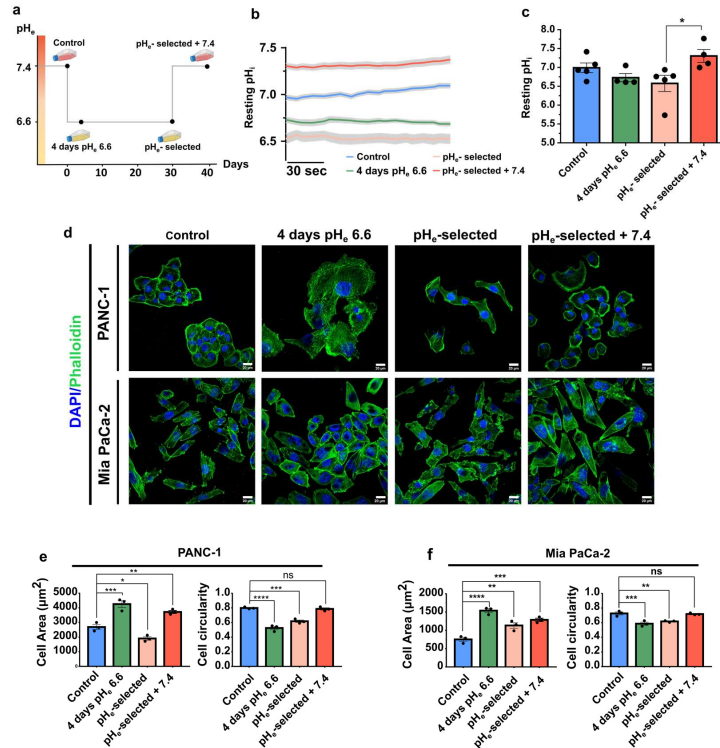


Figure 1. Effects of acidic pH_e on PANC-1 cells' intracellular pH and PDAC cells' morphology. (a) Scheme of the different acidic pH_e phenotypes established. Control cells were kept in physiological pH_e culture conditions (pH_e= 7.4), while acidic phenotypes were constituted by PDAC cells exposed for different periods to acidic pH_e: 4 days (cell model named "4 days pH_e 6.6"), 1 month (pH_e-selected), and 1-month long exposure followed by recovery to physiological pH_e for 2 weeks (pH_e-selected + 7.4). (b) Mean traces (± SEM) of at least 4 independent experiments illustrating the resting pHi values in PANC-1 control cells (blue) and the different acidic phenotypes. Cells were loaded with 3 µM BCECF, and pHi values were recorded for 3 min as a fluorescent ratio (490/440 nm) changes following exposition to pH_e 6.6 for 4 days (green), 1 month (light orange), and 1-month prior recovery to pH_e 7.4 for 2 weeks (red). (c) Quantification of pHi values in PANC-1 control and acidic phenotypes from 3 min recording. Each dot indicates the mean value of one independent experiment (n ≥ 108 cells for each condition). Data were analyzed using the Kruskal–Wallis H-test and Dunn's multiple comparison test, * p < 0.05, ns = not significant. (d) Alexa Fluor 488-phalloidin (F-actin, green) and DAPI (nucleus, blue) staining of the different PANC-1 (top) and Mia PaCa-2 (bottom) cell models on a 1% gelatin-coated surface. Scale bar 20 µm. (e) Quantification of cell area in µm² (left) and cell circularity index (right) of the different PANC-1 and (f) Mia PaCa-2 cell models. Data were reported as mean (± SEM) of 5 representative regions per condition; 3 independent experiments were performed for each condition. Data were analyzed using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001, ns = not significant.

To examine the role of short- or long-term acidification on PDAC cell lines, we evaluated the morphology of PANC-1 and Mia PaCa-2 cells after labeling the cells with Alexa 488 phalloidin and DAPI (Figure 1d–f). Both cell lines display a more spread-out morphology in the initial days of the acidic pH_e exposure (4 days pH_e 6.6), compared to control

$\alpha = 0.05$ through the Benjamini–Hochberg procedure. Genes with an adjusted p -value smaller than 0.05 and featuring a $|\log_2FC| > 1$ were considered significantly deregulated. The ToppFun web tool (from Topmen Suite, <https://toppgene.cchmc.org/>, accessed on 4 August 2022) was used to identify significantly overrepresented GO terms and pathways [51]. Finally, \log_2 fold changes determined with DESeq2 were used to rank genes for Gene Set Enrichment Analysis (GSEA v4.2.2) with the MSigDB database v2022.1.Hs (updated August 2022) [52]. Probes were collapsed into unique gene symbols before the analysis, and a standard (weighted) enrichment statistic was chosen for the computation of the Normalized Enriched Score (NES). Within the context of the GSEA, the q -values cutoff was set to 0.25.

2.12. Statistical Analyses

The data were analyzed using GraphPad Prism 7 software (GraphPad Corporation, San Diego, CA, USA). The Shapiro–Wilk normality test was used to assess the normality of distribution of the continuous variables, which were reported as mean and standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). In contrast, non-normally distributed variables were reported as a median and 95% Confidence Interval. The Student's t -test was used to compare the means of two continuous variables with normal distribution. In contrast, the Mann–Whitney U test was used for non-normal distributed variables. Means of more than two groups of variables were compared using One-way ANOVA or the Kruskal–Wallis H -test. A p -value < 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. Extracellular Acidification Selection Affects PANC-1 Intracellular pH and PDAC Cell Line Morphology

The role of an acidic pH_e in determining phenotypic changes was assessed in PANC-1 and Mia PaCa-2 pancreatic cancer cell lines. They are characterized by a mesenchymal phenotype and are poorly differentiated [53]. We chose pH_e 6.6 which is in the typical pH_e range of solid tumor areas (pH_e 6.4 to 7.2), including pancreatic cancer [54]. The cells were subjected to pH_e 6.6 for a short-term period («4 days pH_e 6.6» cells) or long-term period (« pH_e -selected» cells) to simulate and study the early and late stages of low pH_e selection (see also the Materials and Methods section for details) (Figure 1a). Moreover, to mimic the heterogeneity of the tumor pH landscape and, in particular, the tumor edges at the interface with peritumoral tissue, PDAC cell lines were recovered at pH_e 7.4 after pH selection (« pH_e -selected + 7.4» cells) (Figure 1a).

The first step in evaluating the role of the extracellular acidic tumor microenvironment was to monitor its effect on intracellular pH (pH_i). It is a key parameter for all types of cells, profoundly affecting several cell processes, including those promoting cancer progression [7]. This value does not always correspond to the extracellular pH_e value in cancer cells but is influenced by it. Figure 1b shows the mean traces of PANC-1 cells' resting intracellular pH measurements, obtained by superfusing each cell model with CO_2/HCO_3^- -buffered Ringer's solution at the appropriate pH_e for 3 min. Extracellular acidification at pH_e 6.6 treatment slightly influences the intracellular pH that became more acid compared to the control condition, although the difference is not statistically significant (pH_i 6.99 ± 0.12 control conditions; pH_i 6.72 ± 0.10 4 days pH_e 6.6; pH_i 6.57 ± 0.21 pH_e -selected cells). In contrast, recovery to pH_e 7.4 following the 1-month-long pH_e 6.6 treatment determines a significant cytosolic alkalization compared to pH_e -selected cells, although not statistically significant compared to control cells (p -value = 0.50) (pH_i 7.31 ± 0.17) (Figure 1b,c). These results indicate that extracellular acidosis leads to a mild intracellular acidification, affecting PANC-1 cells exposed to acidic pH_e for extended periods. As opposed to this phenomenon, 1-month acidic treatment followed by a pH_e 7.4 exposition recovers and alkalizes the pH_i .

on Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA) and quantified using the densitometric analysis option in ImageJ/Fiji version 1.53 software. All band density values were normalized to β -actin or Calnexin, used as loading controls, and then compared to the control condition.

2.9. Intracellular pH Measurements

The intracellular pH of PANC-1 cells was measured using fluorescent live-cell imaging (Axiovert TV100, Zeiss, Oberkochen, Germany) as described previously [45]. Cells were loaded with the fluorescent pH indicator 2'7'-bis(carboxyethyl)-5-carboxyfluorescein (BCECF-AM) (3 μ M) for up to 2 min. The excitation wavelength alternated between 490 nm and 440 nm. The emitted fluorescence was detected at 510 nm. The mean fluorescence of each cell was measured in 10 s intervals. Data acquisition and the polychromator (Visitron Systems, Puchheim, Germany) were controlled by the program VisiView (Visitron Systems). The cells were superfused with prewarmed (37 °C) CO₂/HCO₃⁻-buffered Ringer's solution (116 mM NaCl; 24 mM NaHCO₃; 5.4 mM KCl; 0.8 mM MgCl₂; 1.2 mM CaCl₂; 5.5 mM Glucose) at pH 7.4. NaHCO₃ was lowered to 4.7 mM for pH 6.6. pH measurements were calibrated with a two-point calibration (130 mM KCl; 1.2 mM CaCl₂; 0.8 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; 5.5 mM Glucose; pH 7.5 and pH 6.5; supplemented with 10 μ M Nigericin) (Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). For data analysis, the mean fluorescence intensity of the cell area was measured and corrected for background fluorescence. Afterward, the 490 nm/440 nm ratio was determined, and the pH_i was calculated with a linear regression of pH 6.5 and 7.5.

2.10. Invadopodia Activity Assay: Fluorescent-Matrigel Layer Preparation and ECM Digestion Index Assay

Invadopodia focal ECM digestion experiments were conducted as previously described [46]. Cells were seeded onto a layer of 90% matrigel:10% collagen I (3.6 mg/mL Matrigel and 0.4 mg/mL collagen I) in which quenched BODIPY linked to BSA (DQ-Green-BSA) was mixed at a final concentration of 30 μ g/mL. The matrix mix was used to cover 12-mm round glass coverslips at the bottom of a 24-well plate. Matrigel containing the fluorescent dye was allowed to polymerize for 30 min in a humidified incubator at 37 °C. Then, 30 \times 10³ cells/coverslip were seeded on the top of polymerized ECM at both pH_e 7.4 and pH_e 6.6 and incubated overnight. Cells were fixed with paraformaldehyde 3.7% in PBS, stained for F-actin with Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (1:5000 in 0.1% gelatin in PBS, Sigma-Aldrich Cat# p1951), and processed for immunofluorescence. Invadopodia-dependent ECM digestion was evaluated microscopically. Invadopodia-ECM digestion emits green fluorescence on a black background, which quantitatively reflects their ECM proteolytic activity. The quantity of invadopodia ECM proteolysis for 100 cells was then calculated as follows:

Digestion Index = % of cells positive for invadopodial ECM digestion \times mean pixel density of focal ECM digestion/cell.

2.11. RNA-Sequencing and Analysis

Total RNA was isolated from cultured PANC-1 cells using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey Nagel Bioanalysis™), according to the manufacturer's instructions. Libraries for the RNA-Seq analysis were prepared with 200 ng of RNA using the Illumina Stranded mRNA Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's protocol. All the libraries were sequenced on an Illumina NovaSeq 6000 system using paired-end NovaSeq 6000 S2 Reagent Kit (200 cycles). Raw sequencing reads were first trimmed using BBDuk (from BBTools suite v35.85) to remove possible adapter contamination and then aligned to the reference genome (Ensembl Release 106) using STAR aligner v2.5 [47]. RSEM v1.3.0 [48] was used to quantify transcript abundances, while differential expression analysis was carried out using the package DESeq2 v1.14.1 [49] in R/Bioconductor environment. False discovery rate (FDR) [50] was controlled at level

Real-time qPCR was performed in a 20 μ L-reaction mixture containing 10 ng/ μ L cDNA, SYBRTM Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), and 400 nM forward and reverse primers for each gene of interest. qPCR reactions were performed in technical triplicates. The primers used are listed in Table 1. The analysis was performed in a real-time thermal cycler Cfx C1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase-1 (HPRT-1) was used for normalization. Relative mRNA levels were quantified using the $2(-\Delta\Delta CT)$ method.

Table 1. List of primers for qPCR.

Gene Name	Primer Probe	Sequence (5' to 3')
hE-cadherin	Forward	GAACGCATTGCCACATACAC
	Reverse	GAATTCGGGCTTGTTCAT
hN-cadherin	Forward	CCTGAGGGATCAAAGCCTGGAAC
	Reverse	TTGGAGCCTGAGACACGATTCTG
hVimentin	Forward	TCTACGAGGAGGAGATGCGC
	Reverse	GGTCAAGACGTGCCAGAGAC
hSnail	Forward	CTCCAGCAGCCCTACGAC
	Reverse	CGGTGGGGTTGAGGATCT
hTwist	Forward	AGCAAGATTCAAGCCCTCAAGCT
	Reverse	CCTGGTAGAGGAAGTCGATGTACCT
hSlug	Forward	TGTTTCAAGATCTGCGGC
	Reverse	TGCAGTCAGGGCAAGAAAA
hKi67	Forward	TGACCCTGATGAGAAAGCTCAA
	Reverse	CCCTGAGCAACACTGTCTTT
hG0S2	Forward	AAGGGGAAGATGGTGAAGCTG
	Reverse	CTGCACACAGTCTCCATCAGG
hHPRT1	Forward	AGTTCTGTGGCCATCTGCTT
	Reverse	CAATCCGCCCAAAGGGAAC

2.8. Protein Extraction and Western Blot

PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer (1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 10 mM PO_4Na_2/K , pH 7.4) containing protease and phosphatase inhibitor cocktails (Sigma-Aldrich and Thermo ScientificTM, respectively). Protein concentrations were determined with the Bicinchoninic Acid protein assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and 30 μ g of denatured protein lysate was used for each condition. Samples were loaded in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (7 or 12%) of 1.5-mm thickness and electrophoresed in tris-glycine migration buffer (25 mM tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3–8.5) at 80 V in stacking gel and 120 V in resolving gel. Protein samples were transferred from the polyacrylamide gel onto a nitrocellulose membrane using a Pierce G2 Fast Blotter System (Thermo Scientific) at 2.5 V and a 3 A constant for 15 min. Nitrocellulose membranes were blocked with 3% BSA in 1X TNT buffer (15 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) for 1 h at room temperature followed by an overnight incubation at 4 °C with the following specific primary antibodies preparing in 3% BSA in 1X TNT supplemented with 0.02% sodium azide: anti-E-cadherin (1:1000, Cat# MAB3199), anti-N-cadherin (1:200, Cat# SC59987), anti-Vimentin (1:1000, Cat# SC5565), anti-Actin (1:1000, Cat# A5441), anti-Calnexin (1:1000, Cat# MAB3126). Following overnight incubation, three washes of 5 min each and one wash of 10 min in 1X TNT were performed before membranes were incubated with 3% BSA in TNT solution containing goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA); Cat# 211-032-171, 1:50,000) or goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch; Cat# 115-035-174, 1:25,000) horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Membranes were then washed for 3×5 min and 1×10 min in 1X TNT. Peroxidase activity was revealed using SuperSignal West Dura or SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescent signals were captured

or invade through the pores of the insert membrane overnight (around 18 h) at 37 °C and 5% CO₂.

Regarding pH gradient experiments, one major limitation of the Transwell system is the inability to maintain a stable pH gradient throughout the experiment (18 h). The pH gradient established by this system is transient due to the diffusion of the acidic medium to the lower compartment with pHe 7.4, which dissipates the pH gradient. Measurements of the medium pH present in the upper chamber revealed that the pH gradient along the Transwell system starts to decrease within ~5 h of the experiment in the absence of the Matrigel coating, while a substantial dissipation of the pH gradient occurred after ~7 h in the presence of the Matrigel coating. For these reasons, experiments with a pH gradient were performed in a 5-h time window, allowing the pH gradient to remain present (Figure S3a (Supplementary Materials)). After incubation, cells were washed with PBS, and non-migrating/invading cells were removed from the upper side of the membrane using a cotton swab; cell fixation with cold methanol for 15 min at -20 °C was then performed. Cells were stained with 0.4% crystal violet solution at room temperature in the dark for 30 min and imaged under a light microscope (10× magnification). Invasive cells were counted in five representative fields of view per condition. The mean numbers of cells obtained from the five images of each biological replicate were used for statistical analysis. Three independent experiments were performed for each experimental condition.

2.5. Immunofluorescence Staining

PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were stained with fluorescent phalloidin to label F-actin for cell morphology studies. Cells were plated in their corresponding pHe conditions in 1% gelatin-coated coverslips inserted in 6-well plates at different densities to reach ~80% confluence on the day of the experiment. Cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. After washing the samples twice with PBS, the fixed cells were incubated with a solution of 0.1% Triton X-100 in PBS (PBST) for 5 min at room temperature for permeabilization. Solutions were decanted, and two washes with PBS followed. Fixed cells were incubated with PBS containing 1% BSA for 30 min and then stained with a staining solution containing 2 units/coverslip of fluorescent Alexa 488 phalloidin (2 U/200 µL per coverslip; Invitrogen™; Cat# A12379) in 1% BSA in PBS for 20 min at room temperature. Cells were washed two times with PBS, and cell nuclei were stained with a solution of 1:1000 DAPI in PBS for 15 min at room temperature. Cells were washed twice with PBS and air dried, and the coverslips were mounted on clean microscope glass slides using Glycergel mounting medium (Dako; Cat# C0563) and stored in the dark at 4 °C. Glass slides were then examined using a confocal laser scanning microscope (LSM 700; Carl Zeiss MicroImaging GmbH) with a Plan Apochromat 40×/1.3 numerical aperture oil-immersion objective. The images were analyzed in Zeiss LSM Image Browser software.

2.6. Analysis of Cell Morphology: Cell Area and Cell Circularity

Cells were plated in the appropriate pHe-target medium and grown to approximately 80% confluency. Four random fields of each cell condition were imaged using a brightfield microscope (Nikon Eclipse TS100). ImageJ software quantified the cell area and circularity by manually segmenting the brightfield images. Over 500 cells for each condition were considered for the cell area and circularity analysis.

2.7. RNA Extraction and qPCR

Total RNA was isolated from cultured PANC-1 and Mia PaCa-2 cell models using the NucleoSpin RNA Plus kit (Macherey Nagel Bioanalysis™, Bethlehem, PA, USA), according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and quality were determined by absorbance at 260 nm. Reverse Transcription synthesized cDNA in a 20-µL reaction mixture containing 2 µg total RNA, 10 mM dNTPs, 50 µM/100 µL Random Hexamers, 1× First strand buffer, 20U RNase inhibitor, 0.1 M DTT, and 200 U M-MLV reverse transcriptase.

medium was refreshed every two days, and cells were incubated with 20 μ M EdU for 2 h at 37 °C. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4; Gibco; Cat# 10010-015) and fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) at room temperature for 15 min. Following two washes with 3% bovine serum albumin (BSA)-containing PBS, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS at room temperature for 20 min and washed twice with 3% BSA-containing PBS. Cells were then stained with 100 μ L Click-iT reaction cocktail per coverslip and incubated in the dark for 30 min. Following two washes with 3% BSA-containing PBS, cell nuclei were stained with Hoechst 33342 for 30 min and away from light. Coverslips were finally mounted on clean, microscope glass slides using Glycergel mounting medium (Dako (Santa Clara, CA, USA); Cat# C0563) and stored in the dark at 4 °C. The EdU-positive cells were visualized using a confocal laser scanning microscope (LSM 700; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Oberkochen, Germany) with a Plan Apochromat 40 \times /1.3 numerical aperture oil-immersion objective. At least five photos per condition were taken, and positive cells were counted using ImageJ software (v1.54d).

Trypan blue exclusion assays were used to determine the viability of PANC-1 and Mia PaCa-2 cell models after exposition to pH_e 6.6 for different time points (2 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h, 15 days, and 30 days). PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were seeded in 6-well plates at a density of 2×10^5 cells/well and allowed to adhere overnight. Cells were then treated with the acidic medium for the different time points. Cells were trypsinized at specific time points and stained with trypan blue to assess the live/dead cell counts following counting on a hemocytometer. Data from treated cells with acidic pH_e were compared to those from PANC-1 and Mia PaCa cells kept in pH_e 7.4. Three independent experiments were performed for each experimental condition.

2.3. Cell Adhesion

Adhesion assays quantified the ability of PDAC cells to remain adhered to 1% gelatin-coated wells when exposed to a detachment force. PANC-1 and Mia PaCa-2 cells were plated in 96-well plates at a density of 3000 cells/well, and 6000 cells/well, respectively, in 100 μ L of the appropriate growth medium containing 10% FBS. PANC-1 and Mia PaCa-2 were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 1 and 2 h, respectively, to allow the cells to adhere to the well surface. Each condition of each independent experiment was performed in eight technical replicates. Media was discarded, and non-adherent cells were further removed with two washes with cold PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺. Adherent cells were fixed with cold methanol for 15 min at 4 °C, followed by two washes with cold PBS containing Ca²⁺ and Mg²⁺. Nuclei were stained with DAPI in PBS for 15 min at room temperature, and cells were then washed and kept in PBS. Image acquisition was performed using a Nikon Eclipse Ti fluorescence microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) with a 4 \times objective. Cell nuclei of adherent cells of 4 different fields per well were counted in ImageJ for a total of 32 images per condition/biological replicate. The mean numbers of adherent cells obtained from the 32 images of each biological replicate were used for statistical analysis. Three independent experiments were performed for each condition tested.

2.4. Cell Migration and Cell Invasion

Transwell migration and invasion assays were performed using 6.4 mm cell culture inserts with 8 μ m pore-size polyethylene terephthalate (PET) membrane (Corning (New York, NY, USA), Cat# 353097) placed into Falcon® 24-well Permeable Support Companion Plate (Corning, Cat# 353504). Cells were pretreated with 10 μ g/mL of cell cycle inhibitor mitomycin C for 2 h before seeding. The lower chamber was filled with 500 μ L of growth medium pH_e 7.4 or 6.6 containing 10% FBS. The 75×10^3 PANC-1 and 10×10^4 Mia PaCa-2 cells/insert were seeded without Matrigel coating (migration assay) or with Matrigel (diluted in growth medium in ratio 1:5; Corning; Cat# 354230) coating in 300 μ L of the corresponding pH_e-target growth medium supplemented with 10% FBS. Thereby, we avoided a FBS gradient between the two compartments. The cells were allowed to migrate

1. Introduction

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common neoplastic condition affecting the pancreas. It is characterized by an unsatisfactory 5-year survival rate of around 10%, far below that for other forms of solid cancer [1]. In the early stages, PDAC does not manifest itself with striking symptoms and lacks useful screening tests for evaluating asymptomatic patients. This condition often delays diagnosis, when metastases have usually/already spread throughout the body [2]. To date, there are no effective therapeutic options for PDAC. This is in part due to an immunosuppressive microenvironment and a strong desmoplastic reaction that occurs during tumor development [3]. Moreover, this type of cancer is distinguished by a characteristic chemical signature, an acidic extracellular microenvironment ($\text{pH}_e < 6.5$), common to many other malignancies, which offers important cues for its progression and aggressiveness [4,5].

The PDAC acidic microenvironment is the result of a shift to glycolytic metabolism (the “Warburg effect”) that leads to the production and excretion of lactate and H^+ , even in the presence of oxygen [4]. The excretion of these acidic products, together with the hydration of CO_2 , the aberrant vascularization which causes a continuous hypoxic state, and the overexpression and activity of acid transporters, determine a “re-versed pH gradient” with cancer cells, in contrast to normal cells, showing an alkaline pH_i and acidic pH_e . This pH gradient reversal is now considered to be an emerging “hallmark of cancers” [6]. Additionally, the acidic PDAC microenvironment also finds its roots in the physiology of the exocrine pancreas, where the intermittent exposition of pancreatic ductal cells to stroma acidification results from their bicarbonate secretion across their apical membranes into pancreatic ducts. This has been considered to promote the adaptation of acid-resistant phenotypes aiding in PDAC initiation and progression in concomitance with driving mutations [4].

While the reversed pH gradient represents a driving force for cancer progression, tumor acidosis may disrupt this pH balance, fostering genomic instability and imposing considerable selective pressure on cells [7–10]. The acidic microenvironment of the tumor may negatively affect cancer cell survival [11,12] and promote the selection of acid-resistant cancer subclones characterized by defense mechanisms against acidotic stress, such as autophagy [13].

Moreover, an acidic pH_e in the tumor microenvironment represents an escape strategy for tumor cells to promote EMT, cell migration, and local invasion [5,13–22], posing a threat to the efficacy of PDAC therapy. The role of the acidic pH_e at the peritumoral regions has been previously described by the Gillies group [17,21]. It plays a role in the degradation of the extracellular matrix at the periphery of the tumor and subsequent local invasion in melanoma and breast cancers [21]. In this complex tumor microenvironment, cells adapted to acidic pH_e survive due to adaptive mechanisms.

While several teams have focused on the effects of short-term extracellular acidification on different cancer cell types [9,14,23–38], these have provided a limited understanding of how tumor cells respond to this acute acidic exposure. Moreover, as regarding the effects of long-term adaptation and selection to extracellular acidosis [13,15–17,39–42], few data are available on PDAC [43,44] and a clear role of acid selection in cell invasion still needs to be elucidated.

Due to the lack of a comprehensive characterization of the different cell phenotypes induced by acid selection in PDAC and, in particular, re-acclimation in physiological pH in pancreatic cancer, we aimed to describe the impact of the tumor acidic microenvironment on PDAC progression. We therefore established and characterized the different phenotypic alterations occurring in two PDAC cell lines (PANC-1 and Mia PaCa-2). Cells were subjected to a short-term (4 days) exposition to acidic pH_e ($\text{pH}_e 6.6$), in order to mimic the early stages of pH_e selection and also a long-term (1 month) exposition, as the acidification of PDAC tumor microenvironment occurs over a sustained period. To evaluate the impact of acid selection on promoting local invasion, we also established a model of pH_e -selected cells recovered in $\text{pH}_e 7.4$. Our *in vitro* results, confirmed by RNA-seq, indicate that low pH_e

Unexpected function of TMEM165 in Store Operated Ca^{2+} entry (SOCE)

Kateryna Kondratska*^{1,2} Marine Houdou*¹, Antoine Folcher², Alexandre Bokhobza², Aurore Layotte¹, Zoé Durin¹, Dominique Legrand¹, Natalia Prevarskaya*², François Foulquier*^{1±}

¹Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F- 59000 Lille, France

²Univ. Lille, INSERM, U1003, Phycell- Canaux ioniques, inflammation et cancer, F-59000 Lille, France

* These authors equally contributed to this work

± Corresponding Author: François Foulquier (francois.foulquier@univ-lille.fr), Address : Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 – UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France.

Tel. + 33 3 20 43 44 30

Fax. +33 3 20 43 65 55

En cours de publication

Résumé en Français

Le nombre de patients atteints de cancer est en augmentation constante. Les décès par cancer sont principalement dus à l'évolution de la maladie qui se traduit par un développement de métastases, et l'apparition de résistances aux traitements. Dans ce contexte, nous avons utilisé deux modèles : le cancer de la prostate et le cancer du pancréas. Dans les pays développés, le cancer de la prostate est devenu la deuxième cause de mortalité par cancer dans la population masculine. Les traitements actuels se limitent à diminuer les taux d'androgènes circulants. Cependant, à plus long terme, les tumeurs développent les métastases hormone-réfractaires qui échappent aux traitements. Le cancer du pancréas est en forte hausse et on estime qu'il sera la seconde cause de mortalité d'ici 2030 en raison du développement de métastases précoces et l'inefficacité des traitements. Il est donc indispensable de comprendre l'évolution de ces cancers et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Un nouveau concept de recherche en oncologie basé sur le fait que les canaux ioniques contrôlent presque toutes les "caractéristiques du cancer" a été développé et promu au cours de la dernière décennie, ouvrant la voie à un nouveau chapitre de l'oncologie appelé "Oncochannelopathies". Ce projet de thèse consistait à identifier les mécanismes d'homéostasie ionique contrôlant certains processus impliqués dans le développement des métastases, à savoir l'invasion, la migration et la rigidité cellulaire.

Nous montrons que les stades avancés androgéno-indépendants du cancer de la prostate favorisent la réexpression de la protéine NALCN (*sodium leak channel non selective*) et ses partenaires UNC79, UNC80, NLF1, qui forment un canalosome. L'activité de ce canalosome est responsable d'une entrée sodique qui contrôle les oscillations calciques intracellulaires nécessaires au développement d'invadopodes et la sécrétion de matrix métalloprotéases primordiales dans l'invasion et la migration. La surexpression de NALCN induit une forte augmentation de l'invasion *in vitro*, mais également une augmentation des métastases *in vivo*. Les études moléculaires ont permis de mettre en évidence que NALCN interfère avec la signalisation calcique par le biais des échangeurs NCX et NCLX ainsi que les canaux calciques de type Orai1. Le canalosome de NALCN est également retrouvé dans d'autres types de cancer et notamment sous des formes mutées dans le cas du cancer du pancréas. Pour ce cancer, l'inefficacité des chimiothérapies est notamment due à la présence d'un tissu fibreux dense (desmoplasique) qui entoure les cellules cancéreuses. Nous avons donc mis en place un modèle d'études *in vitro* (2D et 3D) en intégrant la rigidité du micro-environnement et la communication intercellulaire, dans le but de cibler les acteurs responsables de cette desmoplasie. Par RNAseq nous avons mis en avant la modulation d'un processus biologique important dans le développement des métastases qui est la motilité cellulaire. Nous avons pu montrer que la migration cellulaire *in vitro* était associée principalement à la rigidité de la matrice, et modulée lors des cocultures avec les cellules stellaires. De plus, la migration des cellules stellaires a également pu être associée à la signalisation calcique de type SOCE.

Ce travail montre l'implication de la signalisation sodique et calcique dans le développement des métastases prostatiques. Ce mécanisme pourrait être généralisé aux cancers, en particulier au cancer du pancréas, où nous avons montré que la communication intercellulaire est responsable de nombreux changements génotypiques, et impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique. La double régulation sodique / calcique existante dans le cancer de la prostate pourrait également exister dans le cancer du pancréas, et le ciblage d'acteurs ioniques comme NALCN pourrait être un moyen de moduler la desmoplasie et donc d'augmenter l'efficacité des traitements thérapeutiques.