

Université des Sciences et Technologies de Lille

Année 2008

N° d'ordre : **4313**

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

Discipline : Biologie-Santé

Par

Hélène LALLET-DAHER

**Implication du canal potassique calcium dépendant à
conductance intermédiaire IK_{Ca1} dans la
cancerogenèse de la prostate humaine.**

Thèse dirigée par le Professeur Morad ROUDBARAKI

Soutenue le Mardi 16 Décembre 2008

Jury :

Dr. Joël MAZURIER, CNRS, Université de Lille 1

Président

Pr. Halima OUADID AHIDOUCH, Université de Picardie Jules-Verne, Amiens

Rapporteur

MCF Christophe VANDIER, Université de Tours

Rapporteur

MCF Olivier SORIANI, Université de Nice Sophia-Antipolis

Examineur

Pr. Morad. ROUDBARAKI, Université de Lille 1

Examineur

Pr. Natalia PREVARSKAYA, Université de Lille 1

Examineur

RESUME

Implication du canal potassique calcium-dépendant IK_{Ca1} dans la cancérogenèse de la prostate humaine

Des études récentes montrent que l'homéostasie calcique intracellulaire, ainsi que l'expression et l'activité de canaux ioniques jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire aussi bien dans un contexte physiologique que dans certains cancers. Cependant, aucune approche proposant les canaux ioniques comme cible thérapeutique n'est actuellement envisagée dans le cadre des traitements des cancers de la prostate.

Dans ce travail nous avons mis en évidence l'expression, la fonctionnalité et l'implication des canaux potassiques calcium-activés (IK_{Ca1}) dans la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate humaine.

Ces études ont également montré que l'activation du canal IK_{Ca1} favorise l'entrée de calcium via un canal calcique de la famille des TRP, le canal TRPV6, impliqué dans l'entrée passive de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques. De plus, par des études de co-immunoprécipitations, nous avons montré que le canal IK_{Ca1} et le canal calcique TRPV6 sont associés formant ainsi un complexe moléculaire fonctionnel permettant l'entrée de calcium et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Par ailleurs, une suppression du canal IK_{Ca1} induit la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ceci suggère un rôle essentiel joué par le canal IK_{Ca1} pour favoriser la croissance ou induire la différenciation cellulaire. Nos études ont également mis en évidence une surexpression de l'ARNm et de la protéine d' IK_{Ca1} dans les tissus prostatiques atteints d'un cancer de la prostate humaine. Ces données permettraient de proposer ces canaux ioniques comme marqueurs de cancer et/ou comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des cancers de la prostate humaine.

SUMMARY

Implication of calcium-activated potassium channel IK_{Ca1} in human prostate cancer

Recent studies show that the intracellular calcium homeostasis, as well as expression and the activity of ionic channels play an essential role in the control of cell proliferation as well in a physiological context as in certain cancers. However, no approaches offering ionic channels as therapeutic target is nowadays envisaged as part of the treatments of the cancers of the prostate.

In the present work, we showed the expression, functionality and involvement of calcium-activated potassium channels (IK_{Ca1}) in the proliferation of the human prostate cancer cells. These studies also showed that the activation of the IK_{Ca1} channel favours the calcium entry via a member of the TRP family of calcium channels, TRPV6, in the prostate cancer cells. Besides, by studies of co-immunoprécipitations, we showed that the IK_{Ca1} potassium channel and the TRPV6 calcium channel form a functional molecular complex allowing the calcium entry and the proliferation of the prostate cancer cells.

Moreover, a down-regulation of the IK_{Ca1} channel leads to the neuroendocrine differentiation of the human prostate cancer cells. This suggests an essential role played by the IK_{Ca1} channel to favour growth or lead to cell differentiation. Our immunohistofluorescence studies also showed an overexpression of IK_{Ca1} mRNA and protein in human prostate cancer compared to non-tumor tissues. These data would allow to propose these ion channels as markers and/or as potential therapeutic targets in the treatment of the human prostate cancers.

A Wassim,

A mes parents,

A ma famille

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du jury :

Mesdames, Messieurs les membres du jury veuillez accepter mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger cette thèse. Ayant bien conscience du temps nécessaire que vous avez consacré à la lecture et à l'analyse critique de ce travail, j'espère, humblement, avoir participé à l'enrichissement de vos connaissances sur les canaux potassiques et leur implication dans la physiopathologie de la prostate.

Monsieur le Président, c'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de présider ce jury. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

Madame le Pr. H. Ouadid Aidouch et Monsieur le Dr. C. Vandier, veuillez recevoir toute ma gratitude pour votre lecture critique de ce manuscrit de thèse, pour laquelle vous avez accepté de consacrer votre temps. Soyez assuré de mes profonds remerciements.

Monsieur le Dr. O. Soriani, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être l'examineur. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury.

Madame le Pr. N. Prevarskaya, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir fait confiance tout au long de ces quatre années de thèse.

Monsieur le Pr. M. Roudbaraki, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ces quatre années de thèse.

Remerciements généraux :

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements de façon générale, peut-être la tâche la plus ardue de ces années de thèse ! Non qu'exprimer ma gratitude envers les personnes en qui j'ai trouvé un soutien soit contre ma nature, bien au contraire. La difficulté tient plutôt dans le fait de n'oublier personne. C'est pourquoi, je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas dans cette page et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance et plus particulièrement les membres de l'unité INSERM U800.

« *Faire une thèse* » est une échappée solitaire aux milieux de compagnons de fortune (ou d'infortune). On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où nos chemins se séparent. Je tiens à remercier *Agathe* pour son amitié, sa présence dans les bons et les mauvais moments, pour toutes ces formidables discussions sur tous les sujets possibles et inimaginables que je ne peux partager qu'avec elle. Mais surtout un grand merci pour m'avoir supporté pendant mes moments « Hulkiens » comme tu les nommes si bien. Cette thèse aura eu le mérite d'être à la base de notre amitié. *Loïc*, un grand merci pour tes conseils, pour les discussions passionnantes que nous avons eues et j'espère qu'il y en aura bien d'autre. Je tiens également à remercier les « garçons » (*Matthieu et Olivier* bien sûr) pour leurs bonnes humeurs de tous les jours. Toute mon amitié à *Chantal* avec qui j'ai partagé les joies et les peines de cette thèse. Merci aussi à tous mes collègues du laboratoire qui se reconnaîtront ici. Je leur exprime ma profonde sympathie.

A mes parents et à ma grand-mère, je tiens à vous remercier tout particulièrement pour m'avoir toujours soutenu dans mes choix, d'avoir été à mes côtés. Merci pour vos encouragements, votre présence et pour tout l'Amour dont vous m'avez entouré depuis le début. Merci également à ma belle-famille pour leurs soutiens.

Wassim, comme on dit, le meilleur pour la fin. Je n'aurai pas assez de l'intégralité de ce manuscrit pour te dire tout ce que je veux. Tout simplement MERCI.

GLOSSAIRE.....5

INTRODUCTION.....9

I- Physiopathologie de la prostate humaine.....	10
A- La glande prostatique.....	10
1- Anatomie.....	10
2- Histologie.....	12
2.1- Le stroma.....	12
2.2- Le tissu glandulaire.....	12
B- Rôles physiologiques de la glande prostatique.....	17
1- Rôle sécrétoire de la prostate.....	17
2- Rôle mécanique de la prostate.....	18
C- Les pathologies prostatiques.....	18
1- La prostatite.....	19
2- Adénome ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP).....	19
3- Le cancer de la prostate.....	19
3.1- Histoire naturelle du cancer.....	20
3.2- Evolution du cancer de la prostate.....	20
3.3- Hormones et cancer.....	21
a- Rôle des hormones mâles.....	21
b- De l'hormono-dépendance à l'hormono-résistance.....	21
c- Echappement hormonal : mécanismes cellulaires.....	23
- Apoptose.....	23
- Perturbation de la prolifération.....	28
- Différenciation neuroendocrine.....	29
3.4- Les métastases.....	30
3.5- Epidémiologie du cancer de la prostate.....	31
3.6- Facteurs de risque.....	31
a- Facteurs de risques constitutionnels.....	31
b- Facteurs de risques environnementaux.....	32
3.7- La classification oncologique.....	32
a- Le système TNM.....	32
b- Le système de gradation de Gleason.....	34
E- Diagnostics.....	35
1- Examens cliniques.....	35
2- Examens biologiques : dosage du taux de PSA.....	35
3- Prélèvements tissulaires prostatiques.....	36
F- Les traitements du cancer.....	37
1- Les traitements curatifs.....	37
2- Les traitements palliatifs.....	37
G- L'avenir dans le traitement du cancer de la prostate.....	39

II- L'homéostasie calcique : implication dans la physiologie et physiopathologie cellulaire.....	39
A- Prolifération et calcium.....	41
B- Principales sources de calcium.....	42
C- Caractéristiques des signaux calciques.....	44
1- Régulation spatio-temporelle des signaux calciques.....	44

2- Genèse et maintien des oscillations calciques.....	45
D- Calcium et transcription.....	48
1- Calcium et localisation des facteurs de transcription.....	49
2- Modulation de l'expression transcriptionnelle.....	50
3- Régulation directe de l'expression des gènes par le calcium : DREAM.....	50
4- Modulation de l'expression génique calcium-dépendante.....	51
III- Les canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie calcique intracellulaire.....	53
A- Les canaux calciques.....	53
1- Généralités.....	53
2- Les canaux calciques voltage-dépendants.....	53
3- Les canaux calciques voltage-indépendants.....	58
3.1- Canaux calciques chimio-dépendants : ROC et SOC.....	58
3.2- Les canaux TRP : Généralités.....	58
3.3- Diversité moléculaire des canaux TRP : TRPC (canonical)/TRPM (Melastatin)/TRPV (Vanilloid)/TRPA (AnkTM1)/TRPP (Polycystin)/TRPML (Mucolipins).....	59
3.4- Fonctions et rôles des canaux TRP dans la physiologie et la physiopathologie cellulaire.....	60
a- Les canaux TRPV.....	60
b- Les canaux TRPN, TRPML, TRPP1 et TRPP2.....	62
c- Les canaux TRPC.....	63
d- Les canaux TRPM.....	64
e- Les canaux TRPA.....	66
3.5- Les protéines STIM et Orai.....	67
4- Les canaux calciques et le cancer.....	69
B- Les canaux potassiques.....	72
1- La superfamille des canaux potassiques : Généralité.....	68
2- Diversité structurale des canaux potassiques.....	73
2.1- Canaux potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 pore.....	74
- La sous-famille Slo : le canal potassique BK _{Ca}	75
2.2- Canaux potassiques à 2 segments transmembranaires et 1 pore.....	78
2.3- Canaux potassiques à 4 segments transmembranaire et 2 pores.....	79
2.4- Sous-unités régulatrices.....	81
a- Sous-unités KCNE.....	81
b- Sous-unité β (Kvβ).....	83
c- Sous-unité β (Sloβ).....	83
3- Rôles physiologiques des canaux potassiques et prolifération cellulaire.....	85
3.1- Importance du potentiel de membrane et des signaux calciques dans la prolifération cellulaire.....	85
3.2- La prolifération cellulaire.....	85
a- Les canaux Kv.....	86
b- Canaux K ⁺ calcium-activés.....	87
3.3- Le volume cellulaire.....	88
3.4- L'apoptose.....	88
4- Les canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire : K _{Ca}	90
4.1- BK _{Ca}	91
4.2- IK _{Ca1}	94
4.3- SK.....	97
5- Les canaux potassiques et le cancer.....	97

C- Intervention des canaux ioniques dans les voies de transduction de facteurs modulateurs de la prolifération et de la motilité cellulaire	99
1- L'endothéline-1	100
2- Endothéline et Cancer	102
2.1- Expression du système endothéline dans le cancer	102
2.2- Mécanismes d'action de l'endothéline-1 sur la croissance tumorale et l'angiogenèse	104
2.3- Approches thérapeutiques	106

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS.....108

MATERIELS ET METHODES.....111

1- Culture cellulaire.....	112
1.1- Les lignées cellulaires	112
1.2- Conditions de culture	112
1.3- Préparation du milieu déstéroïdé	113
1.4- Conservation des cellules	113
1.5- Induction de la différenciation cellulaire	114
2- Mesure microfluorimétrique du calcium libre intracellulaire.....	114
2.1- Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2/AM	114
2.2- Equipement optique	115
2.3- Calibration des signaux de fluorescence	116
2.4- Milieu d'enregistrement	116
2.5- Charge des cellules en Fura-2/AM	116
3- Mesure de la viabilité cellulaire.....	117
4- Transfection transitoire.....	117
4.1- Lipofection	117
4.2- Nucléofection	118
5- Mesure du taux d'expression des ARN messagers (ARNm) : RT-PCR.....	119
5.1- Extraction d'ARNm	119
5.2- Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNaseI)	120
5.3- Transcription inverse et polymérase chain reaction (PCR)	120
6- Clonage.....	121
6.1- Clonage par PCR	121
• Clonage de long fragment d'ADN (> 2kpb)	121
• Clonage de fragment d'ADN (< 2kpb)	122
6.2- Adénosinylation terminal des produits de PCR	122
6.3- Clonage par restriction	123
7- Bactéries chimio-compétentes, transformation et criblage des bactéries.....	124
7.1- Préparation des bactéries chimio-compétentes	124
7.2- Transformation des bactéries par un plasmide	124
7.3- Criblage des colonies positives	124
7.4- Criblage par empreinte de restriction	125
7.5- Criblage par PCR	125
8- Extraction de plasmide.....	126
9- Séquençage.....	126
10- Immunodétection.....	127
10.1- Extraction des protéines	127

10.2- Western blot	127
10.3- Immunofluorescence	128
11- Techniques électrophysiologiques	129
11.1- Patch clamp	129
11.2- Solutions utilisées	130
12- Analyses statistiques	130

RESULTATS.....131

Implication du canal potassique IK_{Ca1} dans la croissance cellulaire

1^{er} article “Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate human prostate cancer cells proliferation *via* a close control of calcium entry.”132

Implication du canal potassique IK_{Ca1} dans la différenciation cellulaire. Implication du canal potassique calcium dépendant IK_{Ca1} dans la différenciation neuroendocrine des cellules androgéno-dépendante LNCaP

2^{ème} article “Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate the neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells: Involvement of REST transcription factor”134

Implication du canal potassique calcium dépendant IK_{Ca1} dans la l’entrée de calcium induite par l’endothéline-1 (ET-1), agoniste naturel, chez les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

3^{ème} article “Involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in Endothelin-1-induced human prostate cancer cells proliferation”136

DISCUSSION/PERSPECTIVES.....138

CONCLUSION GENERALE.....162

ANNEXE.....166

PUBLICATIONS.....171

BIBLIOGRAPHIE.....173

GLOSSAIRE

1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinone
5 α -DHT	5 α -DiHydroTestostérone
[Ca ²⁺]	Concentration calcique
[Ca ²⁺] _i	Concentration calcique intracellulaire
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMPc	Adenosine 3',5'-cyclophosphate camp
AP1	activating protein 1
ARN	Acide Ribonucléique
AR	Androgen Receptor
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BK _{Ca}	Large conductance calcium-activated potassium channel
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
cAMP	Adénosine Monophosphate cyclique
CBP	CREB-binding protein
CDK	kinases dépendantes des cyclines
CDKI	cyclines-CDK inhibitors
CgA	Chromogranine A
CRAC	Calcium Release Activated Ca ²⁺ Channel/Current
CREB	cAMP response element binding
DAG	Diacylglycérol
DREAM	Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogen Response element
HEK	Human Embryonic Kidney
HIF1	hypoxia-inducible factor 1
IBMx	1-Methyl-3-isobutylxanthine
IGF	Insulin Growth Factor
IK _{Ca1}	Intermediate conductance calcium-activated potassium channel
IP ₃	Inositol TrisPhosphate
IP ₃ R	Inositol TrisPhosphate Receptor
K ⁺	Potassium
K _{Ca}	Calcium-activated potassium channel
KID	Kinase Inductible Domain

LNCaP.....	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LCR.....	Liquide céphalo-rachidien
Mg ²⁺	Magnesium
MTS.....	Sel de Tetrazolium
MW.....	Molecular Weight
MZF1.....	Myeloid Zinc Finger gene
NFAT.....	Nuclear Factor of Activated T Cells
NSE.....	Neuron Specific Enolase
Orai-1.....	Transmembrane protein 142A, CRACM1
p21 ^{Cip1}	p21 _{waf1/Cip1} protein
pb.....	paire de bases
PBS.....	Phosphate Buffered Saline
PC-3.....	Human, Caucasian, prostate, adenocarcinoma, grade IV
PKA.....	Protein Kinase A
PKB.....	Protein Kinase B
PKC.....	Protein Kinase C
PLC.....	Phospholipase C
PCa.....	Prostate Cancer
PI3K.....	Phosphatidyl Inositol 3 kinase
PrPCa.....	Prostate Primary Cancer Cells
PrPE.....	Prostate Primary Epithelial Cells
PMS.....	Phenazine Methosulfate
PSA.....	Prostate Specific Antigen
RE.....	Réticulum Endoplasmique
REST.....	RE-1 silencing transcription factor
ROC.....	Receptor Operated Channel
RT-PCR.....	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RyR.....	Ryanodine Receptor
SDS.....	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS PAGE.....	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA.....	Sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
ShRNA.....	Short Hairpined RNA
SiRNA.....	small interfering RNA
SK.....	Small conductance calcium-activated potassium channel

SOC	Store Operated Channel
STIM	Stromal Interacting Molecule
TG	Thapsigargin
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential Ankyrin
TRPC	Transient receptor potential Canonical
TRPM	Transient receptor potential Melastatin
TRPML	Transient receptor potential Mucolipin
TRPN	Transient receptor potential “NOMPC”
TRPP	Transient receptor potential Polycystin
TRPV	Transient receptor potential Vanilloid
UV	Ultra Violet
VOC	Voltage Operated Channel

INTRODUCTION

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme de plus de 50 ans. Véritable problème de santé publique, cette pathologie présente la particularité de n'être sensible à aucune chimiothérapie connue actuellement. Depuis la découverte de l'androgéno-dépendance du cancer de la prostate, les traitements visent à empêcher l'action des androgènes sur cet organe. Ces traitements ont, malheureusement, une efficacité limitée dans le temps et les patients développent alors un cancer androgéno-indépendant dont l'issue est souvent fatale. Il est donc évident que d'autres facteurs non androgéniques interviennent. La maîtrise de la croissance cellulaire (prolifération et apoptose) des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes apparaît donc comme un enjeu considérable dans le développement à long terme de thérapies innovantes qui permettront d'améliorer la qualité de vie des hommes atteints de ce cancer et permettrait à terme de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques. Prévenir cette évolution grâce au dépistage précoce représente un grand enjeu de santé publique, d'autant que la fréquence de ce cancer augmente avec l'espérance de vie.

I- Physiopathologie de la prostate humaine

A- La glande prostatique

1- Anatomie

La prostate est une glande exocrine qui appartient au système reproducteur masculin. Elle a la taille d'une noix et pèse environ 20 g à l'âge de 20 ans. Du grec prostatês, « qui se tient en avant », elle est située dans le pelvis, juste en-dessous de la vessie en avant du rectum et entoure l'urètre proximal (**Figure 1**). Ce point est important car il explique une partie des symptômes du cancer de la prostate.

Depuis les travaux de McNeal en 1981 (McNeal, 1981), la prostate est divisée en cinq zones anatomiques distinctes (**Figure 2**):

- **La zone périphérique** composée de tissu sécrétoire ; elle représente 70% de la glande. Elle est située à l'arrière de la prostate. C'est dans cette **zone que naissent 70% des cancers de la prostate**. La zone périphérique est constituée d'acini et de canaux de petite taille à revêtement très régulier.

- **La zone centrale**, au contact de l'urètre; représente environ 25% de la glande. C'est dans cette zone que se développe 5 à 10% des cancers prostatiques. La zone centrale est le siège privilégié de développement des hyperplasies bénignes prostatiques (Lalani

et al., 1997). La sécrétion de la prostate (environ 30 % du volume du sperme) est un liquide laiteux et légèrement acide renfermant du citrate et plusieurs enzymes.

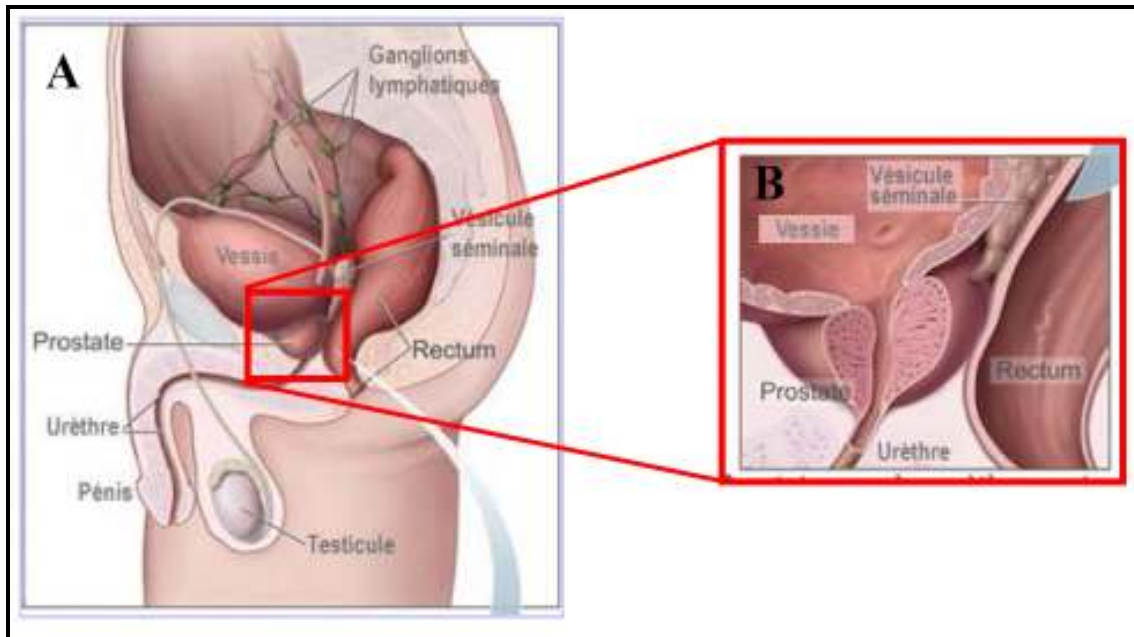


Figure 1: Localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale (coupe sagittale) chez l'homme (A) et son agrandissement (B) (Source : prostate.fr).

- **La zone de transition** représente 5% de la masse totale de la prostate. C'est la seule zone où se développe l'adénome prostatique. Cependant, 20 à 25% des cancers prennent naissance dans ce territoire. Il faut savoir que presque tous les cancers de stade T1 ou A se développent dans cette zone.

- **Le stroma fibromusculaire antérieur,**

- **La zone des glandes péri-prostatiques ou péri-urétrales.**

Enfin, la prostate est entourée par une capsule, la capsule de Gleason. Cette capsule sépare la prostate du reste des autres organes du pelvis.

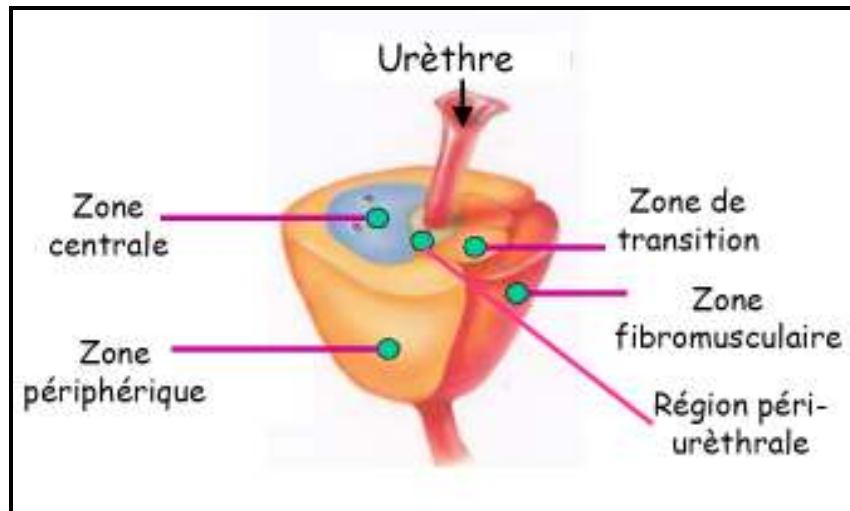


Figure 2: Répartition géographique des différentes zones de la prostate. La Zone Fibro-Musculaire est la partie antérieure de la prostate, la zone centrale se situe sous la vessie, la zone de transition entoure l'urètre. On trouve également la zone périphérique et la région péri-urétrale.

2- Histologie

La prostate est composée d'unités fonctionnelles sécrétoires, **les acini**. Le tissu prostatique est composé de deux couches histologiques principales : le stroma fibromusculaire et le tissu glandulaire constituant un épithélium pseudo-stratifié (épithélium prostatique). Ces deux tissus sont séparés par une membrane basale (**Figure 3**):

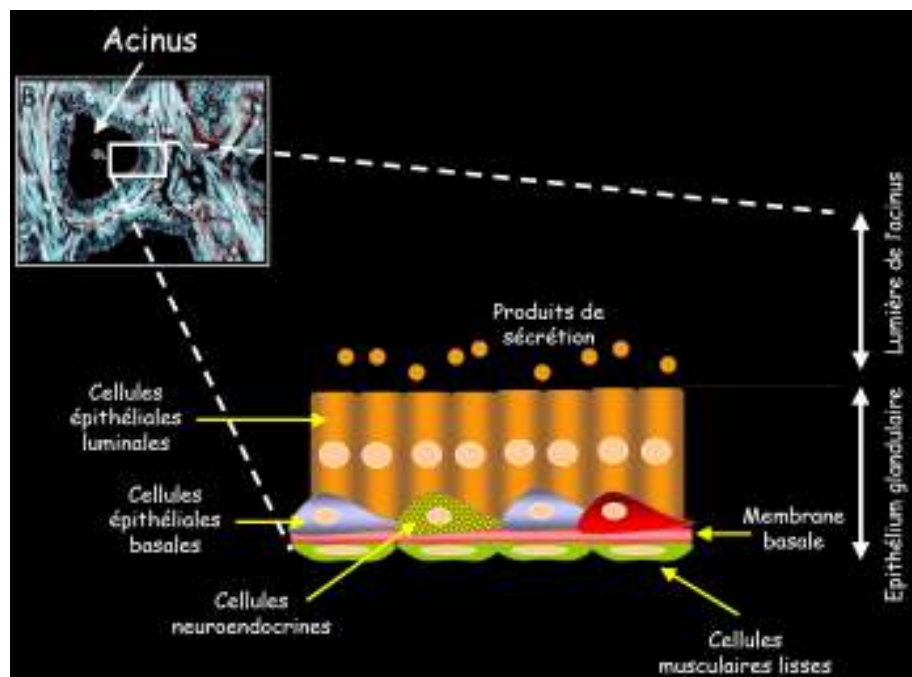


Figure 3 : Architecture cellulaire de l'acinus prostatique

Il existe un phénotype de cellule particulier présent dans les deux compartiments précédemment cités : **les cellules neuroendocrines**.

L'épithélium prostatique est dépendant, pour sa croissance de la sécrétion d'hormones mâles : les androgènes. L'épithélium prostatique comprend aussi des cellules épithéliales basales, non dépendantes des androgènes ainsi que des cellules neuroendocrines et des globules blancs en charge de l'immunité.

2.1- Le stroma

Le stroma est principalement composé de fibroblastes et de cellules musculaires lisses. Hormis leur rôle de soutien du tissu glandulaire, ces deux types cellulaires participent au contrôle de la prolifération et au maintien de l'état de différenciation des cellules épithéliales adjacentes par la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF β (Transforming Growth factor Beta), le NGF (Nerve Growth Factor) (Marengo and Chung, 1994) et d'hormones comme la prolactine (Untergasser et al., 2001). Les cellules musculaires lisses interviennent dans la contraction des zones glandulaires entraînant la sécrétion du liquide prostatique lors de l'éjaculation. Ces cellules participent aussi à la régulation du débit sanguin dans la prostate lorsqu'elles entourent l'endothélium.

2.2- Le tissu glandulaire

Le tissu glandulaire de la prostate est formé par un épithélium pseudo-stratifié composé d'une couche jointive de cellules apicales sécrétrices et d'îlots sous-jacents de cellules basales.

- **Les cellules épithéliales basales**

Elles sont constituées de stocks de cellules souches et de cellules peu différenciées permettant la régénération par différenciation de la couche cellules luminales. Cette différenciation pourrait être contrôlée par les cellules stromales. Les cellules basales sont « androgéno-réfractaires » (ou « androgéno-indépendantes ») et expriment des marqueurs spécifiques tels que les cytokératines 5 et 14 (van Leenders et al., 2003).

- **Les cellules épithéliales intermédiaires.**

Elles n'ont ni reconnaissance histologique ni clinique car elles ne sont pas repérables d'un point de vue histologique. Le concept de cellules intermédiaires est né de l'idée que la différenciation est un processus séquentiel et dynamique (**Figure 4**). Ainsi, lors de leur différenciation en cellules épithéliales apicales, les cellules épithéliales basales acquièrent progressivement le récepteur aux androgènes et les cytokératines 8 et 18 (marqueurs des cellules apicales), alors qu'elles expriment encore la cytokératine 5 (van Leenders et al., 2003).

Les cellules intermédiaires précoces possèdent le plus fort taux de prolifération du compartiment épithélial (Heer et al., 2006). Au contraire les cellules intermédiaires plus tardives ne prolifèrent plus et expriment un fort taux de récepteurs aux androgènes fonctionnels dont l'activation conduit à l'induction de la différenciation (Whitacre et al., 2002). La description de ce phénotype revêt toute son importance lors de l'étude des cellules cancéreuses de la prostate qui présentent généralement un phénotype très proche de celui des cellules épithéliales intermédiaires.

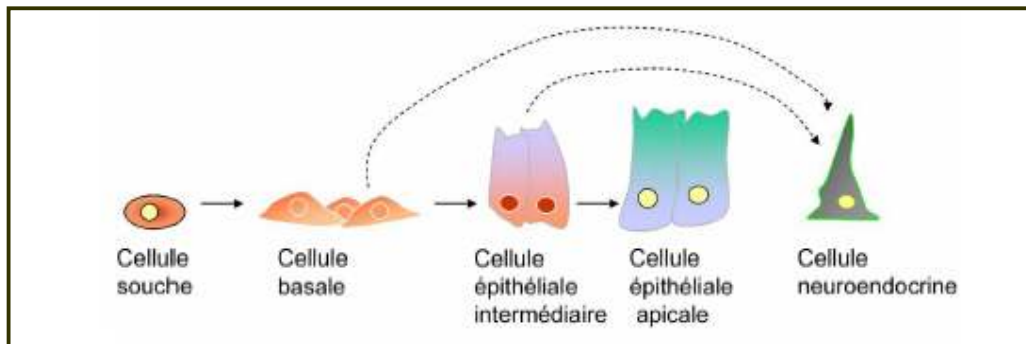


Figure 4 : Représentation schématique de la différenciation cellulaire de l'épithélium prostatique. L'origine des cellules neuroendocrines dans le cas de cancers neuroendocrines purs fait toujours débat et donc est représentée ici par les deux flèches pointillées.

- Les cellules épithéliales apicales

Elles bordent la lumière des acini. Elles sont dites androgéno-dépendantes car les androgènes (principalement la testostérone) contrôlent aussi bien leur prolifération que leur survie ou leur différenciation (Isaacs, 1999). Ces cellules sont principalement des cellules sécrétrices matures. Elles synthétisent et sécrètent les produits constitutifs du plasma séminale incluant la PSA (**P**rostate **S**pecific **A**ntigen) mais aussi du citrate et des ions tel que le zinc (Murphy et al., 1992).

- Les cellules neuroendocrines

Elles représentent le dernier phénotype présent dans la prostate. Elles ont été mises en évidence pour la première fois en 1944 par Pretl (Herrero et al., 2002) grâce à une méthode de coloration argentique appelée coloration de Grimelius, qui révèle les granules neuroendocrines en brun foncé.

Elles sont dites neuroendocrines car elles possèdent certaines caractéristiques structurales, fonctionnelles et métaboliques similaires au neurone et aussi car elles produisent des substances semblables aux neurohormones et neurotransmetteurs tels que la calcitonine, la sérotonine ou le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide). D'autre part, elles expriment des

marqueurs de type neuroendocrinien tels que la NSE (Neuron Specific Enolase), ainsi que la chromogranine A (Karlsson, 2001). Ces cellules renferment également des grains neurosécrétoires (par analogie avec les neurosécrétats hypothalamiques) et possèdent les caractéristiques APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) spécifiques aux cellules neuroendocrines. Cependant, leur rôle physiologique demeure encore mal connu.

Localisation et morphologie : Leur présence au sein du tissu prostatique a été confirmée par Feyrter en 1951. Ces cellules sont dispersées dans tous les compartiments glandulaires de la prostate et représentent entre 0,5 et 2% du tissu prostatique (Aumuller et al., 2001). Après la naissance où les cellules neuroendocrines sont présentes dans toutes les régions de la prostate, elles disparaissent de la région périphérique pour y réapparaître lors de la puberté (Cohen et al., 1993). Après la puberté, le nombre de cellules neuroendocrines atteint son maximum et le conserve entre 25 et 54 ans (Cabrera et al., 1994). Elles sont de deux types morphologiquement distincts : le type « ouvert » : Les cellules ont de longs prolongements dendritiques rejoignant la lumière des acini, le type « fermé » : sans extensions luminales. Elles ne possèdent pas de récepteurs aux androgènes et sont donc androgéno-indépendantes. (Aumuller et al., 1999) ont montré que les cellules neuroendocrines prostatiques suivent un processus migratoire commençant très tôt durant l'embryogenèse (Aumuller et al., 1999).

Les marqueurs neuroendocrines prostatiques :

Ils sont de deux types (**Tableau 1a et 1b**):

- Hormonaux: Les plus couramment détectés sont la somastatine, la calcitonine et la GRP (Gastrin-Releasing peptide) homologue de la bombésine chez les mammifères.
- Non-hormonaux: Avec la synaptophysine, le cytochrome b561, l'antigène lymphoréticulaire, les plus couramment utilisés pour l'identification des cellules neuroendocrines prostatiques sont la chromogranine et la NSE (Neuron-Specific Enolase). La chromogranine est l'un des constituants majeurs des vésicules de sécrétion des cellules neuroendocrines (Blaschko et al., 1967). Elles appartiennent à la famille des granines mais leur fonction biologique demeure inconnue. Les chromogranines A et B peuvent lier de grande quantité de calcium suggérant un rôle dans l'homéostasie calcique et pourraient également agir de manière autocrine ou paracrine comme régulateur de la sécrétion ou encore servir de précurseur hormonal. Bien qu'elle ne soit pas toujours présente dans les cellules neuroendocrines prostatiques, la chromogranine A demeure la plus utilisée pour l'identification de ces

dernières (Abrahamsson, 1999a). La NSE est détectée dans les neurones mais aussi dans les cellules neuroendocrines de nombreux organes (Schmechel et al., 1978). Pour exemple, la présence de la NSE homodimérique dans le neurone annonce la formation des synapses et l'acquisition des propriétés électriques. C'est également cette forme qui est détectée dans les cellules neuroendocrines.

Leur rôle physiologique :

Il est encore méconnu mais certains travaux suggèrent que les cellules neuroendocrines participent au maintien des autres phénotypes. Ces cellules semblent intervenir aussi bien dans les activités physiologiques que pathologiques de la prostate et il a été suggéré qu'elles soient impliquées dans la régulation de la croissance et la différenciation prostatique en développement, mais aussi dans la régulation de la sécrétion de la glande mature, par analogie avec ce qui est connu dans d'autres organes à cellules neuroendocrines tels que les systèmes respiratoires, gastrointestinal et le pancréas (Cutz, 1982; Larsson, 1980).

Neurohormones	Références bibliographiques
CT (Calcitonine)	(Abrahamsson et al., 2000); (Davis et al., 1989)
CGRP ("Calcitonin Gene Related Peptide")	(Davis et al., 1989); (Nagakawa et al., 2001)
Katacalcine	(Davis et al., 1989)
GRP ("Gastrin-Releasing Peptide")	(Nagakawa et al., 2001); (Varvarigou et al., 2004)
Somatosatine	(Krsek, 2003)
α -HCG	(Fetissof et al., 1987)
TSH-Like (Thyroid-Stimulating hormone like-peptide)	(Abrahamsson et al., 1986)
PTHrP (ParaThyroid Hormone-related Protein)	(Mosca et al., 2005)
Neurotensine	(Nagakawa et al., 2001; Wu et al., 1998)
NPY	(Cox et al., 1999; Vias et al., 2007)
(Neuropeptide Y)	(Nagakawa et al., 2001)
B-endorphine	(Morales Martinez and Pedron, 1999)

Tableau 1a : Liste des principales neurohormones identifiées dans les cellules neuroendocrines prostatiques

Marqueurs neuroendocrines	Références bibliographiques
CgA (Chromogranine A)	(DeLellis, 2001); (Mosca et al., 2005)
CgB (Chromogranine B)	(Takekoshi et al., 1999)
CgC (Chromogranine C)	(Cussenot et al., 1998); (Feldman and Eiden, 2003)
NSE (Neuron Specific Enolase)	(DeLellis, 2001); (Takekoshi et al., 1999)
Synaptophysine	(DeLellis, 2001)
Cytochrome b561	(Akerstrom et al., 2005); (DeLellis, 2001)
	(DeLellis, 2001); (Hook and Metz-Boutigue, 2002)

Tableau 1b : Liste des principaux marqueurs identifiés dans les cellules neuroendocrines prostatiques

B- Rôles physiologiques de la prostate

1- Rôle sécrétoire de la prostate

La sécrétion de la glande prostatique qui est continue (0,5 à 2ml par 24 heures), joue un rôle de protection du tractus urogénital contre les agents pathogènes extérieurs et s'intensifie en période pré éjaculatoire pour constituer une partie du plasma séminal (0,5 ml de liquide prostatique pour un éjaculat moyen de 3ml (Mann, 1974)), lequel représente le milieu optimal pour la survie et la locomotion des spermatozoïdes. La sécrétion prostatique légèrement acide (pH 6,4) renferme des ions (citrate, magnésium et zinc), du cholestérol, des phospholipides, des enzymes (phosphatases acides, protéase) et une polyamine, la spermine ou le PSA. La composition exacte des produits sécrétés est reportée dans le [tableau 2](#).

Composants	Taux moyen total	Eléments d'origine prostatique
Electolytes	980mg/100ml	Calcium (28mg/100ml) Zinc (14mg/100ml) Acide citrique (376mg/100ml)
Hydrates de carbone	302mg/100ml	
Composés nitrés	754mg/100ml	Spermine (273mg/ml)
Prostaglandines	21mg/100ml	
Protéines totales	4000mg/100ml	
Acides aminés libres	1258mg/100ml	
Autres:		
• Cholestérol	103mg/100ml	
• Acide sialique	124 mg/100ml	
• Glutathione	30 mg/100ml	
Enzymes	11000-12000U/ml	Phosphatases acides (400U/ml) Leucine aminopeptidase (1173U/ml) Diamine oxydase Alpha-amylase Proteinase seminale

Tableau 2: Composition du liquide séminal chez l'homme (D'après Khoury, 1991; Khoury and Wright, 1991)

Le PSA, caractérisé dans le plasma séminal humain en 1971, est découvert comme étant un produit de sécrétion prostatique mais également un marqueur exclusif de la prostate humaine, d'où son appellation (Stephan et al., 2002). Cette glycoprotéine de 33-34 kDa ressemble aux nombreuses protéases murines de la famille des kallikréines. Ces substrats dans le plasma séminal sont deux protéines sécrétées par les vésicules séminales : la fibronectine et

la séménogéline, protéines provoquant la gélification du sperme. Bien qu'il n'y soit pas destiné, le PSA est observé dans la circulation sanguine, ce qui fait qu'actuellement, il reste le meilleur et le seul antigène disponible pour la surveillance et le diagnostic du cancer de la prostate (Stamey et al., 1987). En effet, il a pu être établi un lien entre le taux de PSA plasmatique et le volume glandulaire de la prostate (Babaian et al., 1992). Enfin, il est à noter que la prostate participe également, en tant que glande exocrine, à l'élaboration et à la sécrétion des hormones stéroïdes et peptidiques.

2- Rôle mécanique de la prostate

Les deux sphincters (lisse et strié) urétraux intraprostatiques confèrent à la prostate un double rôle mécanique dans les processus mictionnels et éjaculatoires. Le système de sphincter permet tout d'abord, en association avec la vessie, de stocker les urines et d'assurer la continence. Cette fonction est assurée notamment grâce aux innervations végétatives et somatiques : le sphincter lisse permet la phase de remplissage du réservoir vésical *via* le système sympathique et l'évacuation des urines *via* le système parasymphatique en association avec le relâchement du sphincter strié.

De plus, les sphincters et les fibres musculaires lisses de la prostate interviennent également au niveau des fonctions de reproduction : lors de l'éjaculation. Le sphincter lisse reste contracté pour empêcher l'éjaculation rétrograde dans la vessie, alors que le sphincter strié se relâche (les innervations étant les mêmes que pour la miction).

La prostate intervient donc dans les processus de miction et de reproduction, grâce à un double contrôle glandulaire et musculaire : la gravité des conséquences d'un dérèglement anatomique et fonctionnel de la prostate tel que l'on peut l'observer en cas d'hyperplasie bénigne ou de cancer est donc facilement compréhensible.

C- Les pathologies prostatiques

La prostate est le siège de trois affections principales : **la prostatite** (atteinte inflammatoire souvent d'origine bactérienne), **l'adénome ou hyperplasie bénigne de la prostate (HBP)**, et **l'adénocarcinome** (cancer de l'épithélium). Ces pathologies prostatiques peuvent toucher l'homme jeune (prostatite aiguë) mais aussi et surtout l'homme à partir de 40-50 ans (adénome et cancer). Il est à noter que la prostatite comme l'adénome ne favorisent pas l'apparition d'un cancer.

1- La prostatite

La prostatite est une inflammation souvent d'origine bactérienne. Elle est généralement traitée par des antibiotiques.

2- Adénome ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP)

Avec l'âge, la prostate grossit, on parle alors « d'hypertrophie ». Ce phénomène est appelé hyperplasie bénigne de la prostate. Elle peut être aussi désignée sous le terme d'adénome prostatique qui désigne une tumeur bénigne. L'**Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP)** se développe le plus souvent dans la zone de transition qui entoure l'urètre. C'est une tumeur bénigne touchant plus de 6 millions d'hommes en France. L'adénome provoque l'apparition au sein de la zone transitionnelle d'un tissu fibreux et glandulaire qui entraîne le grossissement et/ou la rigidité de la glande. Cette transformation de la glande prostatique provoque une irritation ainsi qu'une obstruction de l'urètre entraînant une gêne symptomatique lors de la miction.

L'HBP se traduit par des symptômes regroupés sous le terme de « prostatisme » :

- ▶ Des mictions de faible volume et plus fréquentes (pollakiurie),
- ▶ Une diminution de la force du jet,
- ▶ Une douleur à la miction (dysurie),
- ▶ Une douleur pendant l'éjaculation.

Ces symptômes ont une évolution très variable. Chez certains malades, ils évoluent peu au cours du temps, tandis que chez d'autres patients l'HBP peut aboutir à des complications aiguës comme une rétention aiguë d'urine (impossibilité de vider sa vessie), voire la destruction des reins (hydronéphrose, insuffisance rénale).

L'hyperplasie bénigne de la prostate peut nécessiter un traitement médical ou chirurgical. Dans certain cas, au prix d'une simple surveillance, cette affection peut rester sans traitement si elle n'affecte pas la qualité de vie chez l'homme qui en est atteint

3- Le cancer de la prostate

On désigne par « cancer » plus d'une centaine de maladies, la quasi-totalité des tissus de l'organisme pouvant être atteints (pour certains, plusieurs types de cancers sont possibles). Chaque cancer présente des caractéristiques qui lui sont propres, mais les mécanismes qui engendrent ces tumeurs sont communs.

3.1- Histoire naturelle de la maladie

Tous les mammifères mâles ont une prostate, mais on ne connaît de cancers de la prostate que chez l'homme et le chien. La plupart des tumeurs de la prostate se forment dans la zone périphérique et la partie glandulaire de l'organe. Le cancer de la prostate peut aussi se développer dans le tissu de la zone centrale.

Il se développe le plus souvent à partir de l'épithélium glandulaire. Comme il se développe à partir des glandes (acini) de l'épithélium, on dit qu'il s'agit d'un adénocarcinome. Lorsque le cancer reste à l'intérieur de la capsule de la prostate, on considère la maladie comme « localisée » et donc traitable par la chirurgie ou plus rarement par radiothérapie. Dès que le cancer s'est étendu au-delà de la capsule de la prostate les options thérapeutiques sont différentes (Figure 5).

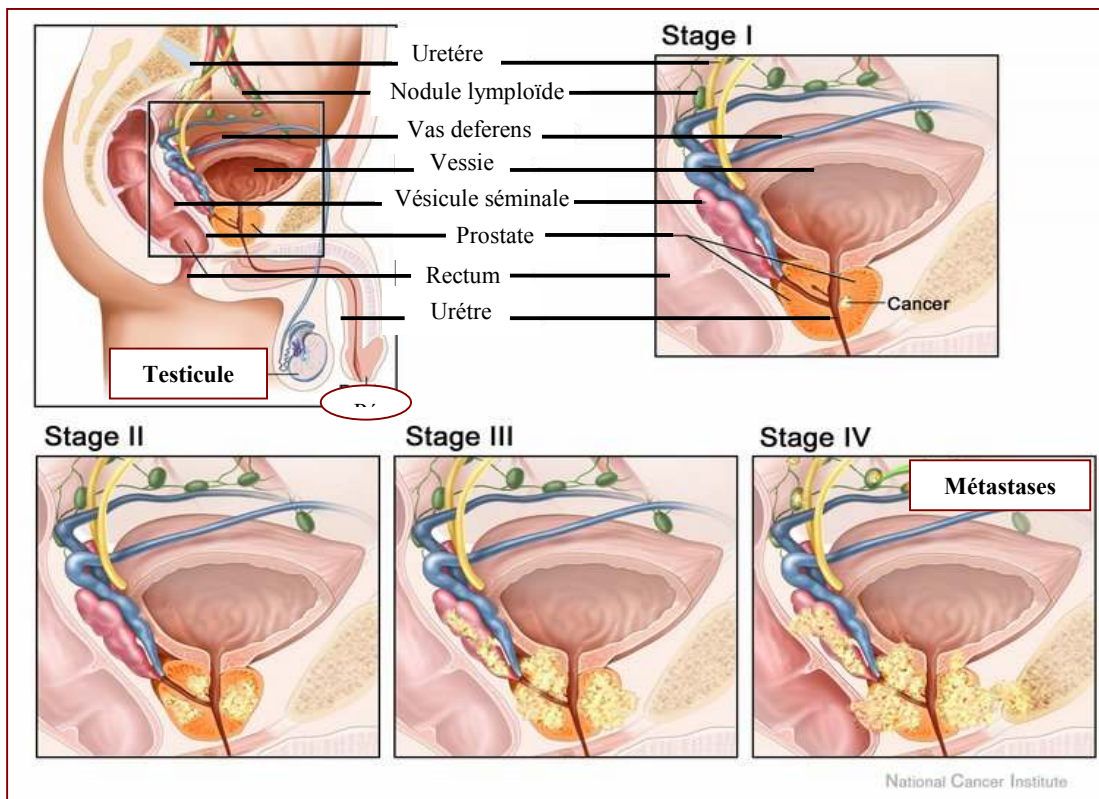


Figure 5: Evolution anatomique du cancer de la prostate au sein de la sphère uro-génitale suivant les différents stades de la maladie (I à IV).

3.2- Evolution du cancer de la prostate

C'est une maladie caractérisée, le plus souvent, par sa lenteur d'évolution responsable de la latence clinique. Par la suite, son évolution est variable. Certaines tumeurs de la prostate se développent lentement et se manifestent par peu de symptômes cliniques. La tumeur peut

devenir agressive et alors d'étendre rapidement aux ganglions lymphatiques et à d'autres organes, en particulier aux os de la colonne vertébrales. Ce processus s'appelle **la métastase**.

L'atteinte des ganglions lymphatiques signifie que certaines cellules cancéreuses ont eu la capacité de sortir de la prostate pour former d'autres colonies tumorales en dehors de cet organe. Les ganglions lymphatiques situés dans le pelvis sont généralement le premier site où le cancer s'étend hors de la prostate. Un taux élevé de PSA peut aussi révéler que le cancer a pénétré les ganglions lymphatiques. Parfois, des cancers touchant les ganglions lymphatiques pelviens peuvent être microscopiques. Il existe donc un risque que d'autres cellules aient suivi le même processus pour aller dans d'autres organes du corps. C'est pourquoi il est important de déterminer si le cancer de la prostate s'est étendu aux ganglions lymphatiques pelviens, afin de mettre en œuvre le meilleur traitement.

3.3- Hormones et cancer

a- Rôle des hormones mâles

C'est la découverte de Huggins et Hodges en 1941 qui a montré l'importance des hormones mâles (androgènes) dans le développement du cancer de la prostate. Ces auteurs ont aussi prouvé qu'une suppression des androgènes correspondait à une amélioration de la maladie. La croissance normale de la prostate est sous la dépendance des hormones mâles, comme la testostérone. Ces hormones permettent, à la puberté, le doublement de volume de la prostate tous les 3 ans. La croissance d'un cancer prostatique peut être significativement ralentie par la suppression de la fabrication d'hormones mâles comme la testostérone, quand les cancers sont hormonodépendants. A ce stade le cancer est dit « hormono-dépendant ».

b- De l'hormono-dépendance à l'hormono-résistance

Bien qu'il n'existe pas de définition universellement admise, la plupart des spécialistes considèrent que la maladie devient « hormono-résistante », lorsqu'en dépit du traitement antihormonal, elle tend à progresser. On considère, alors, que la maladie peut s'étendre quel que soit le taux des hormones en présence.

La maladie se déroule en plusieurs étapes:

▪ Première étape : Hormono-dépendance

Initialement, le cancer métastatique de la prostate est hormono-dépendant et répond à diverses manipulations hormonales. Le traitement de première intention consiste en un blocage androgénique complet ou une castration (chimique ou chirurgicale) seule, suivie, en cas d'échec, par l'ajout d'un antiandrogène périphérique.

Seconde étape : hormono-indépendance

En moyenne, 18 mois après le début de l'hormonothérapie, on observe une perte de la sensibilité au traitement hormonal. On parle alors d'hormono-indépendance.

Troisième étape : hormono-résistance

Le cancer est hormono-résistant lorsqu'il devient réfractaire à une deuxième ligne d'hormonothérapie. Il existe plusieurs mécanismes pouvant expliquer l'hormonorésistance par modifications structurelles ou fonctionnelles des récepteurs aux androgènes (Figure 6) :

- ▶ Une amplification du récepteur aux androgènes qui existe dans un tiers des cas ou une mutation hyper-activatrice du récepteur aux androgènes se traduisant par une hypersensibilité aux androgènes circulants résiduels
- ▶ Une altération des cofacteurs du récepteur aux androgènes
- ▶ Une hyperméthylation du promoteur du gène du récepteur aux androgènes.

Des chercheurs considèrent que le traitement hormonal sélectionne, dès le début, des clones de cellules qui sont intrinsèquement résistantes aux hormones et que ces dernières vont progressivement émerger lorsque la maladie évolue. D'autres suggèrent que sous la pression d'un environnement défavorable (traitement antihormonal), ces cellules vont s'adapter et muter pour survivre. A ce stade, si le cancer de la prostate devient réfractaire au traitement hormonal, il devient agressif et plus difficile à contrôler. Tout comme dans la prostate saine, le développement du cancer de la prostate est sous le contrôle des androgènes (et plus précisément de la DHT, la dihydrotestostérone). De ce fait, le cancer de la prostate est **un cancer androgéno-dépendant**.

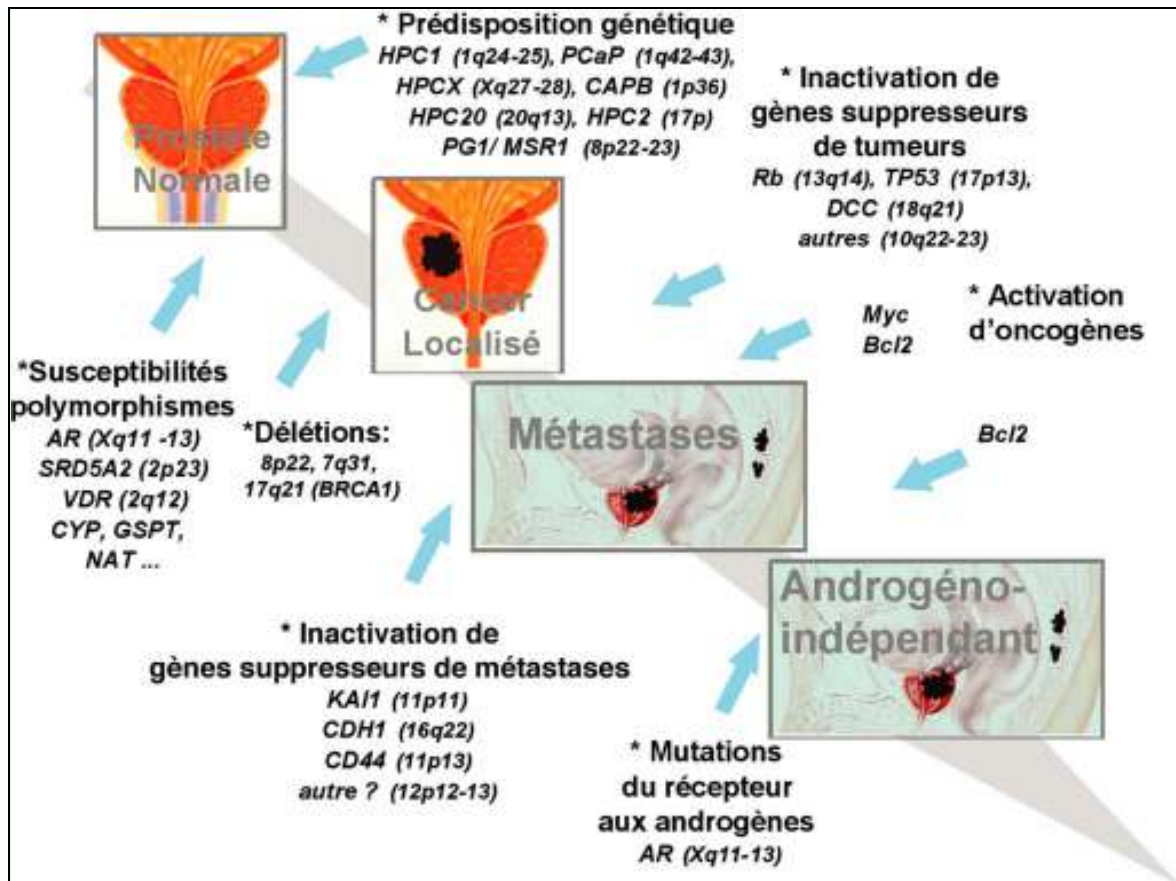


Figure 6: Représentation des différents mécanismes illustrant l'hormonorésistance

c- Echappement hormonal : mécanismes cellulaires

Les mécanismes proposés pour expliquer l'échappement thérapeutique sont : un défaut d'apoptose, une perturbation de la prolifération et la différenciation neuroendocrine.

- Apoptose

Il y a deux grands mécanismes par lesquels les cellules peuvent mourir : **la nécrose** et **l'apoptose**. Alors que la nécrose est considérée comme une mort accidentelle, pour l'apoptose c'est tout à fait l'inverse, elle est souvent comparée à un suicide cellulaire. Les différences entre les deux mécanismes sont résumées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**). C'est en 1972 que Kerr et collègues (Kerr and Searle, 1972) ont adopté le terme apoptose pour décrire un processus de mort cellulaire hautement régulé qui se déroule tout au long de la vie d'un organisme. L'apoptose est essentielle au cours du développement du fœtus, entre autres pour sculpter les doigts et les orteils. Au cours de la vie adulte, elle est essentielle pour maintenir l'homéostasie des tissus et joue un rôle important dans le système immunitaire, que ce soit pour éliminer les cellules infectées par un virus ou encore pour détruire les lymphocytes auto réactifs (Strasser, 2005). L'apoptose est considérée comme une mort « propre », c'est-à-dire

que la cellule meurt en ne déversant pas son contenu cytoplasmique dans l'espace intercellulaire, contrairement à la nécrose, ce qui minimise, voire élimine, les réactions inflammatoires (Schwartzman and Cidlowski, 1993). L'ADN de la cellule en apoptose est clivé en fragments de 180 paires de bases (ou multiples de 180).

	Apoptose	Nécrose
Événement	Actif, programmé (activation de gène spécifique)	Passif, accidentel
Stimulus	Physiologique ou pathologique	Pathologique
Morphologie : - Volume cellulaire - Chromatine	Diminution Condensation	Augmentation Pas de condensation
Organites	Maintien global	Dilatation du réticulum endoplasmique et des mitochondries
Membrane plasmique	Perte tardive d'asymétrie membranaire : la phosphatidylsérine passe sur le feuillet externe. Bourgeonnement et constitution de corps apoptotiques	Rupture cellulaire
Cellules voisines	Phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages	Libération du contenu intracellulaire (dont substances inflammatoires au contact des cellules voisines qui sont lésées)
Inflammation	Non	Oui
ADN	Fragmentation internucléosomale régulière (échelle)	Fragmentation irrégulière et aléatoire

Tableau 3: Comparaison des principales caractéristiques de l'apoptose et de la nécrose

La découverte des familles de gènes et protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose et de sa régulation est venue de l'étude du développement d'un petit ver transparent : *Coenorhabditis elegans*. De manière schématique un processus apoptotique peut-être décomposé en 3 phases successives :

- 1- **Phase d'induction** (Phase de réception des signaux inducteurs)
- 2- **Phase effectrice** (Intégration des signaux inducteurs, franchissement ou non du point de non-retour et activation des caspases)
- 3- **Phase de destruction** (Dégradation cellulaire et élimination des corps apoptotiques)

Il existe deux grandes voies par lesquelles l'apoptose peut être induite dans une cellule: **la voie extrinsèque** dite de Type I et **la voie intrinsèque** dite de Type II (Figure 7).

Bien que les événements initiaux menant à l'apoptose diffèrent dans chacun des cas, les deux voies ont en commun de mener à l'activation des caspases, ce qui constitue le point

de non-retour pour la cellule: **si les caspases sont activées, la mort est inévitable**. Si les caspases sont absentes de la cellule ou rendues inactives, l'apoptose est très ralentie, voir même complètement inhibée (Earnshaw et al., 1999). Le terme « caspase » fait référence à une famille de protéases, extrêmement conservées au cours de l'évolution, possédant une cystéine dans leur site actif et clivant leurs substrats après un résidu acide aspartique, d'où le terme caspase, (*C* ystein- *ASP* artate prote *ASE*). Il y a jusqu'à maintenant plus de quatorze membres de cette famille qui ont été identifiés et séparés en deux groupes: les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10) et les caspases effectrices (3, 6, 7) (Curtin and Cotter, 2003). Les caspases initiatrices activent les effectrices et les effectrices ont comme rôle de cliver des protéines bien précises, induisant soit leur activation ou leur inactivation. Elles existent naturellement sous la forme de proenzymes inactives (elles sont alors appelées procaspases) qui devront être activées. Le mécanisme d'activation diffère pour les deux groupes de caspases.

- La voie extrinsèque (Type I)

La voie extrinsèque de l'apoptose est souvent appelée le « sentier des récepteurs de mort cellulaire » du fait que c'est la liaison entre un récepteur à la surface de la cellule et son ligand qui enclenche le processus. L'enclenchement de l'apoptose se fait quand un ligand se lie sur la portion N-terminal extracellulaire du récepteur. Ceci mène à la trimérisation du récepteur et son activation. Il y a alors recrutement de protéines *via* la portion C-terminal cytoplasmique du récepteur, parmi lesquelles on trouve des procaspases initiatrices.

- La voie intrinsèque (Type II)

Alors que la voie extrinsèque est déclenchée par des facteurs extérieurs à la cellule, la voie intrinsèque a pour éléments déclencheurs des signaux intracellulaires comme des dommages au niveau de l'ADN, un stress du réticulum endoplasmique, l'activation d'oncogènes, etc. (Opferman and Korsmeyer, 2003). *Via* différentes voies de signalisation intracellulaire, ces signaux convergent en un point dans la cellule : la mitochondrie. Malgré le fait que la mitochondrie soit essentielle à la vie cellulaire, elle joue un rôle tout aussi important dans l'apoptose. Lorsque des signaux de mort y parviennent, il y a perméabilisation de la membrane mitochondriale et libération de plusieurs protéines dans le cytosol dont le cytochrome c. C'est une protéine participant normalement à la chaîne de transport des électrons dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Saelens et al., 2004).

Puisque la sortie de diverses protéines hors de la mitochondrie est une étape si importante dans l'apoptose, il n'est pas surprenant de voir qu'il existe dans la cellule des protéines veillant au contrôle de l'intégrité mitochondriale. Une famille de protéines est particulièrement importante pour réguler ce phénomène, **la famille des protéines Bcl-2**.

- **La famille Bcl-2**

Elles contrôlent l'intégrité de la membrane mitochondriale. Chaque protéine a son rôle à jouer dans le processus apoptotique. Les membres de cette famille se divisent en deux groupes, les pro-apoptotiques, et les anti-apoptotiques (Strasser, 2005).

Les anti-apoptotiques

Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 sont Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1, Boo/DIVA et Mcl-1; Bcl-2 et Bcl-x_L étant les membres les mieux connus (Strasser, 2005). Tous partagent certaines caractéristiques, telles qu'une région c-terminal d'environ 20 acides aminés hydrophobes. Bien que cette région montre peu d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés entre les membres de la famille, elle est essentielle pour assurer l'ancrage de ces protéines dans les membranes des organites (Schinzel et al., 2004). Les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 possèdent quatre domaines BH (Bcl-2 homology domain), de BH1 à BH4 (sauf Mcl-1 qui en possède seulement deux) (Strasser, 2005). Les domaines BH1, BH2 et BH3 forment un sillon hydrophobique dans lequel un domaine BH3 d'une autre protéine peut se lier (Sattler et al., 1997).

Les pro-apoptotiques

Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 se divisent en deux sous-familles: les protéines à multiple domaines BH (Bok, Bcl-x_S, Bcl-G_L, Bfk, Bak et Bax) et les protéines contenant seulement le domaine BH3 (Bid, Bad, Bim/BOD, PUMA/BBC3, NOXA,...). Comme leur nom l'indique, les protéines BH3 ont comme seule homologie avec les autres membres de la famille Bcl-2 leur domaine BH3, un petit domaine de 9 à 16 acides aminés (Strasser, 2005).

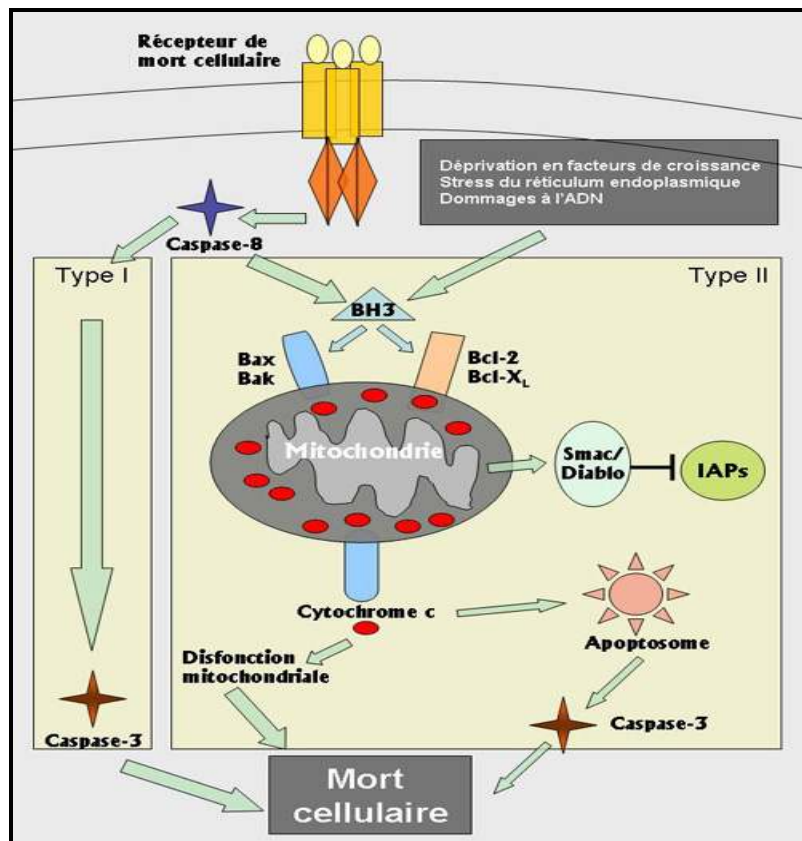


Figure 7: Représentation schématique du déroulement de la voie extrinsèque (Type I) et de la voie intrinsèque (Type II) de l'apoptose (Source : archimede.bibl.ulaval.ca)

Apoptose pathologique

L'importance de l'apoptose fait que toute dérégulation peut-être mortelle pour l'organisme. Ainsi, une apoptose inappropriée peut contribuer au développement et à la progression de diverses pathologies, qu'elles soient liées à une inhibition de ce programme comme dans la majorité des cancers et des maladies auto-immunes ; ou à un excès comme dans certaines dégénérescences du système nerveux (ex : maladie d'Alzheimer) (**Tableau 4**).

Maladies associées à un défaut d'apoptose	Maladies associées à un excès d'apoptose
1- Cancers : <ul style="list-style-type: none"> - Lymphomes folliculaires - Carcinome avec mutation du gène p53 - Tumeurs hormo-dépendantes (Cancers du sein, des ovaires et de la prostate) 	1- SIDA
2- Maladies auto-immunes	2- Troubles neurodégénératifs : <ul style="list-style-type: none"> - Maladie d'Alzheimer - Maladie de Parkinson
	3- Ischémie <ul style="list-style-type: none"> - du myocarde - cérébrale

Tableau 4: Liste des maladies dues à un défaut ou un excès d'apoptose

- Perturbation de la prolifération

Le maintien de l'homéostasie tissulaire repose sur deux mécanismes physiologiques que sont la division cellulaire et l'apoptose. La prolifération cellulaire s'oppose à la mort cellulaire programmée afin de maintenir constant le nombre de cellules dans un organisme adulte. La prolifération anarchique et excessive, tout comme un défaut d'apoptose des cellules, pourraient aboutir à la tumorigénèse (**Figure 8**).

Le développement du cancer de la prostate a été plus souvent considéré comme résultant d'un défaut d'apoptose. Néanmoins, des altérations de la prolifération seraient également impliquées. En effet, parallèlement à l'échappement thérapeutique suite aux traitements anti-androgéniques, une évolution du phénotype paracrine de l'épithélium vers un phénotype autocrine est observée. Il est de surcroît démontré que les tumeurs androgéno-indépendantes prolifèrent plus que celles qui demeurent sensibles aux androgènes (Zhou et al., 2004).

Ceci est corrélé à une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance (EGF, NGF, NT3, NT4/5 etc...) et du nombre de récepteurs tyrosine kinases (Fong et al., 1992; Montano and Djamgoz, 2004; Prewett et al., 1996). Les travaux de Stattin *et al.* décrivent notamment que l'IGF-1 qui accroît la prolifération et diminue l'apoptose des cellules prostatiques est présent à un taux élevé dans les tumeurs prostatiques et est ainsi associé à un risque plus élevé de cancer de la prostate (Stattin et al., 2004). Des travaux de notre laboratoire ont montré que l'EGF induit une augmentation de la prolifération cellulaire corrélée entre autres à une hausse du taux de calcium réticulaire (Legrand et al., 2001). De surcroît, de nombreux autres facteurs tels que stat-3, NFkB, la vitamine D régulant la prolifération des cellules prostatiques tant au niveau de l'entrée dans le cycle cellulaire que de l'induction d'apoptose et des voies de signalisation des facteurs de croissance suscités voient leur expression varier dans le sens d'une augmentation de la prolifération (Lee et al., 2004; Stewart and Weigel, 2004; Suh and Rabson, 2004). Un travail récent du laboratoire a de surcroît démontré que l'ATP extracellulaire, *via* les récepteurs purinergiques de type P2Y couplés à la PLC, induit un arrêt de la croissance des cellules épithéliales cancéreuses androgéno-indépendantes (Vanoverbergh et al., 2003). Actuellement, les études s'orientent donc vers : (1) la recherche et la confirmation de nouvelles cibles et (2), le développement d'analogues de la vitamine D3 qui inhibe la prolifération prostatique et dont le taux diminue lors de la cancérisation, d'inhibiteurs de stat-3 grâce à la stratégie des ARN interférents etc...

- Différenciation neuroendocrine

Depuis peu, un intérêt important s'est porté sur la différenciation neuroendocrine dans le cancer de la prostate car elle semble avoir une signification pronostique bien que les avis à ce sujet soient divergents (Abrahamsson, 1999b). En effet, l'évolution de la prostate vers un phénotype cancéreux s'accompagne d'une augmentation du nombre de foyers de cellules neuroendocrines (Cohen et al., 1991); (di Sant'Agnese and Cockett, 1996); (Tarle et al., 1994). Les cellules neuroendocrines représentent d'ailleurs un index de l'évolution du cancer : dans le cas d'un sujet atteint d'un cancer prostatique présentant une différenciation neuroendocrine (par multiplication de ces cellules), le taux de survie après six ans est inférieur à 6 %, alors qu'il atteint 96 % dans le cas des cancers sans différenciation neuroendocrine. Comme nous l'avons précédemment mentionné, ces cellules ne possèdent pas de récepteurs aux androgènes et sont donc androgéno-indépendantes (Krijnen et al., 1993). Ceci pourrait expliquer en partie le phénomène d'échappement hormonal en association avec le défaut d'apoptose.

Les cancers de la prostate avec différenciation neuroendocrine sont de très mauvais pronostic. Plusieurs phénomènes pourraient être à l'origine de cette différenciation neuroendocrine. Des études récentes montrent que les traitements anti-androgéniques augmentent le nombre de cellules neuroendocrines dans les tumeurs (Abrahamsson, 1999a). Les traitements ne feraient donc que sélectionner des cellules neuroendocrines androgéno-indépendantes aux dépens des cellules androgéno-dépendantes. Une autre hypothèse est que les cellules neuroendocrines tumorales, présentant un dysfonctionnement de sécrétion (défaut ou hyper sécrétion), pourraient par une stimulation paracrine anormale des cellules saines, les rendre ainsi tumorales (Nakada et al., 1993). Finalement, il a été suggéré que l'acquisition des caractéristiques neuroendocrines s'effectue au cours de la progression tumorale. Ainsi, suite à une transformation maligne, une cellule épithéliale ou basale développerait des caractéristiques neuroendocrines et serait alors régulée par des mécanismes androgéno-indépendants. Souvent les cancers prostatiques présentant une différenciation neuroendocrine sont caractérisés par la présence de foyers de cellules neuroendocrines au sein de cellules malignes non neuroendocrines.

Le cancer neuroendocrine pur.

Une étude démontre que la transformation spécifique des cellules neuroendocrines de la prostate saine provoque l'apparition d'un cancer neuroendocrine pur (Garabedian et al., 1998). Cette pathologie rare (<5% de tous les cancers de la prostate) touche les sujets plus

précocement que l'adénocarcinome (entre 30 et 40 ans). Elle est généralement associée à un très mauvais pronostic (Freschi et al., 2004). Les causes de la transformation de ces cellules neuroendocrines sont inconnues et les traitements sont sans effets.

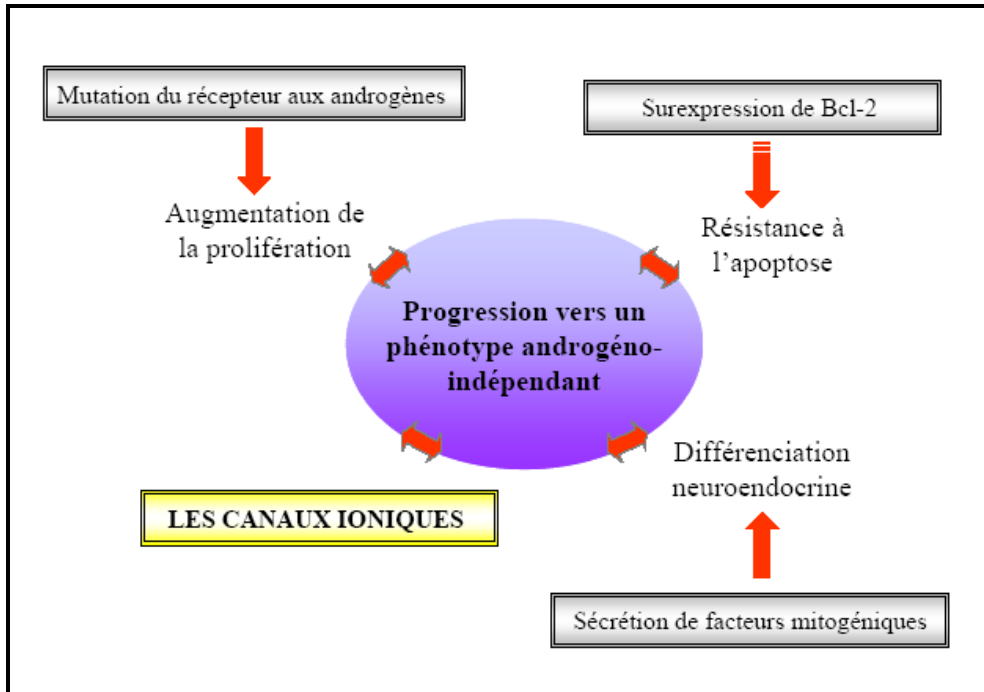


Figure 8 : Représentation schématique de la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses suite à une augmentation de la prolifération, de l'induction de la différenciation neuroendocrine et d'une résistance à l'apoptose. Ces transformations cancéreuses sont souvent accompagnées d'une modification d'expression des canaux ioniques et par conséquent, d'une réponse cellulaire anormale.

3.4- Les métastases

Elles se développent par migration des cellules tumorales soit par voie lymphatique, soit par voie sanguine (hématogène). Le cancer de la prostate est caractérisé par un tropisme important pour le tissu osseux. En effet, 95 % des patients qui décèdent du cancer de la prostate sont porteurs de métastases osseuses et, dans la plupart des cas, décèdent de complications liées à ces métastases (fractures, compression médullaire, envahissement et épuisement de la moelle osseuse). Les os sont ainsi, avec les ganglions lymphatiques pelviens et lombo-aortiques, le site le plus fréquent de dissémination métastatique. D'autres localisations, comme le foie et le poumon, sont possibles.

3.5- Epidémiologie du cancer de la prostate

Le nombre de cas de cancer de la prostate a augmenté régulièrement au cours des vingt dernières années. Le cancer de la prostate est une des principales causes de décès chez l'homme. Il s'agit de la deuxième forme de cancer la plus fréquente chez l'homme laquelle représente, selon les estimations, 12 % de tous les nouveaux cas de cancer masculin diagnostiqués chaque année dans la Communauté européenne et 10 % de tous les décès par cancer. En Europe, 238 000 hommes ont fait l'objet d'un diagnostic de cancer de la prostate en 2005 et 85 000 en sont décédés la même année. L'incidence du cancer de la prostate est faible au Japon et modérée en Amérique centrale et en Afrique de l'Ouest. L'incidence est plus élevée en Amérique du Nord et en Europe du Nord. Selon les prévisions, le cancer de la prostate dépassera le cancer broncho-pulmonaire comme principale cause de décès chez l'homme au cours des prochaines années. En 2005, près de 7 millions de personnes sont décédées d'un cancer et près de 11 millions de nouveaux cas ont été diagnostiqués dans le monde.

3.6- Facteurs de risque

Un facteur de risque est un élément qui augmente le risque de développer une maladie. Il y a différentes sortes de facteurs de risque. Certains sont immuables, comme l'âge ou le sexe. Certains sont liés à l'environnement. D'autres, encore, sont dus à des choix personnels comme l'usage de tabac, l'abus d'alcool ou le régime alimentaire. Chaque cancer a des facteurs de risque différents. Toutefois avoir un ou plusieurs facteurs de risque ne signifie pas que vous allez développer la maladie.

a- Les facteurs de risques constitutionnels

Parmi les facteurs de risques constitutionnels on trouve **l'âge**. En effet, le cancer de la prostate est une affection dont la fréquence croît avec l'augmentation de la longévité. La majorité des cancers de la prostate sont découverts après 65 ans. C'est la 2^{ème} cause de mortalité par cancer entre 60 et 75 ans, la première après 75 ans. **Les antécédents familiaux** interviennent également. En effet, Le risque de développer un cancer de la prostate est 2 à 5 fois plus important si votre père ou (un de vos) frère en a eu un. **L'origine ethnique** est également un facteur de risque où il a été montré que l'incidence du cancer de la prostate varie d'un continent à l'autre et d'une population à l'autre. Il est par exemple beaucoup plus fréquent chez les populations noires américaines. A l'inverse, les populations caucasiennes et asiatiques ont un risque moindre de développer un cancer de la prostate. Il est probable que des facteurs environnementaux soient en cause.

b- Les facteurs de risques environnementaux

De multiples études ont tenté d'identifier des facteurs de risque du cancer prostatique dans l'environnement. Parmi les facteurs de risques environnementaux on trouve l'alimentation. Les importantes variations géographiques de l'incidence du cancer de la prostate suggèrent le rôle important que peuvent jouer certains facteurs environnementaux dans le développement d'un cancer de la prostate. La variation la plus frappante est celle qui sépare les Etats-Unis du Japon. En effet, l'incidence du cancer de la prostate est faible au Japon et forte aux Etats-Unis (224 cas pour 100.000 hommes aux Etats-Unis et moins de 20 cas pour 100.000 hommes au Japon). D'autres facteurs plus incertains interviennent tels que l'obésité, le manque d'exercice, l'usage de tabac, l'exposition à des radiations.

3.7- La classification oncologique

Plusieurs systèmes de gradation sont couramment utilisés pour classer les cancers en fonction de leur degré oncologique : le système Tumeur, Node, Metastasis (**TNM**) qui évalue la localisation et la taille de la tumeur, la classification de Whitmore – Jewett et le score de Gleason qui prend en compte l'état de différenciation du tissu cancéreux.

a- Le système TNM

Le système de gradation TNM a été développé en 1977 par Ammon et coll (Ammon et al., 1977), mais n'est couramment utilisé que depuis les années 90. Ce système évalue la taille de la tumeur et sa propagation extra-capsulaire (**T**) (**Tableau 5**), dans les ganglions lymphatiques (**N**) et dans les métastases lointaines (**M**).

LA LETTRE T (Tumeur)	LA LETTRE N (ganglion ou Node en anglais)
Tx : La tumeur primitive ne peut être évaluée T0 : Pas de tumeur primitive décelable T1 : Découverte fortuite (tumeur non perçue à l'examen clinique ou non visible en imagerie) T1a : occupant 5 % ou moins du tissu réséqué T1b : occupant plus de 5 % du tissu réséqué T1c : Tumeur découverte par ponction biopsie (à l'occasion d'une élévation du PSA) T2 : Tumeur restant limitée à la glande T2a Tumeur envahissant un lobe T2b Tumeur envahissant les deux lobes T3 : Extension au-delà de la capsule T3a : extracapsulaire T3b : aux vésicules séminales T4 : Extension aux organes adjacents (col vésical, sphincter urétral, rectum, paroi pelvienne) ou tumeur fixée	N0 : absence de métastase ganglionnaire N1 : atteinte ganglionnaire régionale
	LA LETTRE M (Métastase)
	M0 : absence de métastase à distance M1 : métastases à distance M1a ganglions non régionaux M1b os M1c autres sites

Tableau 5: Représentation des valeurs T (Tumeur), N (Ganglion) et M (Métastases)

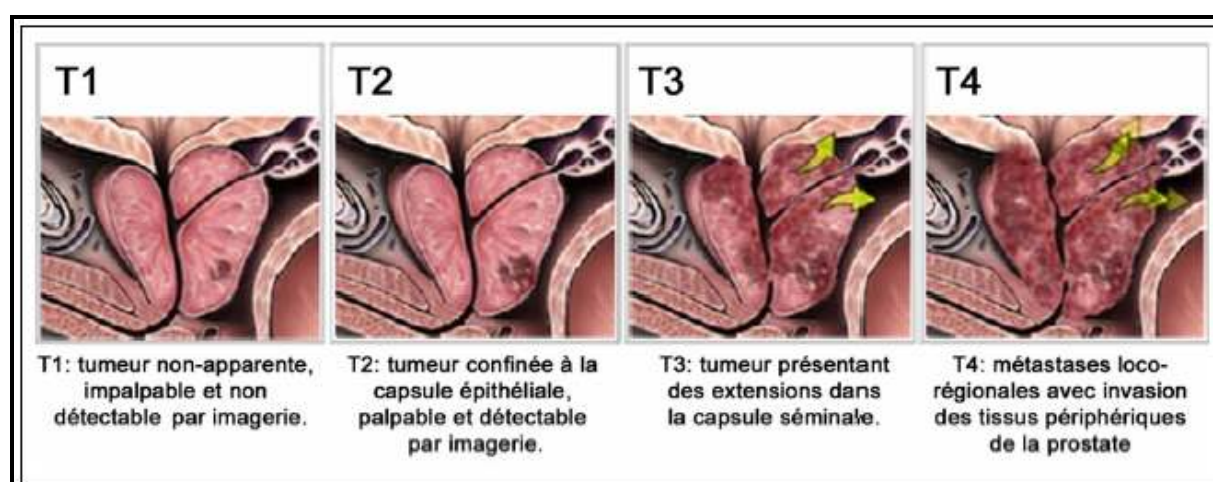


Figure 9: Représentation des tumeurs de statut T1 à T4 (système TNM) dans la prostate.

Les différents stades T1 caractérisent de petites tumeurs impalpables et difficilement détectables par échographie. Les tumeurs de stade T2 sont plus étendues, mais confinées à la capsule épithéliale. Elles sont détectables par palpation et peuvent être prélevées avec une aiguille à biopsie. Le stade T3 représente des tumeurs ayant dépassées la barrière de la lame basale et se propageant dans la prostate et dans les vésicules séminales. Le dernier stade (T4) définit les métastases loco-régionales, c'est à dire les métastases ayant gagnées des organes périphériques tels que la vessie (**Figure 9**). La propagation des métastases loco-régionales aux

ganglions lymphatiques est définie par le statut N (N0-N3) en fonction de leur taille et de la distance de propagation, alors que le statut M (M0-M1) représente les métastases lointaines dans les organes comme le foie, les os et le cerveau.

b- Le système de gradation de Gleason

En 1974, Gleason et Mellinger créèrent leur système de gradation du cancer de la prostate (Gleason and Mellinger, 1974). Ce système repose sur les degrés de différenciation des cellules. Le système de gradation de Gleason est le plus utilisé. Il distingue 5 grades correspondant à des tumeurs de différenciation décroissante. Les caractéristiques des 5 grades sont présentées dans **le tableau 6** ci-dessous.

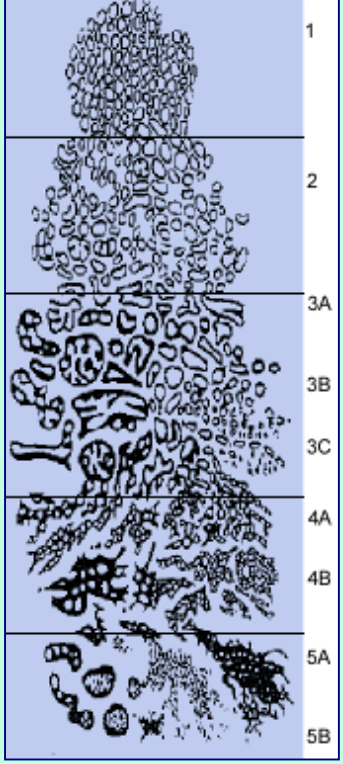
Grade	Glandes tumorales/épithélium	Aspects histologiques	
1	Prolifération monotone de glandes simples, arrondies, étroitement regroupées.	Nodules arrondis aux bords bien dessinés.	
2	Glandes simples, arrondies, plus dispersées.	Masses vaguement arrondies, aux bords mal définis.	
3A	Glandes simples, de taille moyenne, de forme, de taille et d'espacement irréguliers.	Masses irrégulières aux bords déchiquetés.	
3B	Glandes simples, de très petite taille, de forme, de taille et d'espacement irréguliers.	Masses irrégulières aux bords déchiquetés.	
3C	Massifs épithéliaux cribriformes ou papillaires, à bords réguliers.	Zones irrégulières constituées de cylindres massifs et arrondis.	
4A	Massifs épithéliaux de glandes fusionnées.	Massifs et cordons irréguliers de glandes fusionnées.	
4B	Même aspect que 4A, avec présence de cellules claires.	Massifs et cordons irréguliers ; aspect d'hypernéphrome.	
5A	Massifs arrondis, papillaires ou cribriformes avec nécrose centrale.	Cylindres et massifs arrondis disposés de façon variable, avec nécrose (« comédocarcinome »).	
5B	Adénocarcinome anaplasique.	Massifs très irréguliers.	

Tableau 6 : Caractéristiques et aspects histologiques des différents grades (1 à 5B) de cancer de la prostate

E- Diagnostic

La détection précoce d'un cancer de la prostate permet de mettre en œuvre un traitement curatif. A partir des années 1980, l'avènement de nouvelles techniques diagnostiques a permis de détecter des cancers de la prostate à un stade très localisé, alors qu'aucun symptôme ne les signalait. La diffusion de ces techniques serait en grande partie responsable de l'augmentation du nombre de diagnostics de cancers de la prostate recensés.

1- Examen clinique

Le geste diagnostique le plus simple et le plus efficace est le toucher rectal. il s'agit d'un test simple et généralement indolore effectué par le généraliste. Le médecin palpe la prostate pour apprécier la régularité de ses contours et sa consistance à travers le rectum. Par cet examen simple, le médecin peut mettre en évidence des zones anormales indurées (noyaux) suspectes. L'examen permet aussi de juger si la maladie s'est étendue aux organes de voisinage comme la vessie, le rectum ou aux tissus environnants.

2-Examen biologique : dosage du taux de PSA (Prostate Specific Antigen)

Il s'agit d'une analyse sanguine très simple pour mesurer le taux d'une substance connue sous le nom d'antigène prostatique spécifique (PSA). Le PSA a été caractérisé au début des années 1970. C'est une enzyme (protéase) produite par les cellules de la prostate. Cette enzyme évite la coagulation du liquide séminal et est responsable notamment de la liquéfaction du sperme. Stennman a montré en 1991 que le PSA est présent dans le sérum sous plusieurs formes : une forme liée à l'alpha-1 antichymotrypsine (ACT) et à l'alpha-2 macro globuline (AMG) et une forme libre. Chez l'homme porteur d'un cancer de la prostate, le PSA lié est plus élevé que chez l'homme porteur d'une hypertrophie bénigne. Ainsi, le rapport PSA libre sur PSA total est diminué en cas de cancer. Le PSA est sécrété aussi bien par les cellules normales de la prostate que par les cellules tumorales (**Figure 10**). Néanmoins le taux du PSA sanguin augmente dans le cancer de la prostate. La mesure du taux de PSA est donc utilisée pour évaluer le risque de cancer de la prostate. Toutefois, ce test n'est guère concluant : certains hommes atteints d'un cancer de la prostate n'ont pas un taux de PSA élevé alors que deux tiers des hommes dont le taux de PSA est élevé n'ont pas de cancer de la prostate. Bien que ces tests puissent révéler la présence d'un cancer de la prostate, le seul moyen d'établir un diagnostic définitif est de pratiquer une biopsie qui permet au médecin

d'examiner les cellules de la prostate au microscope.

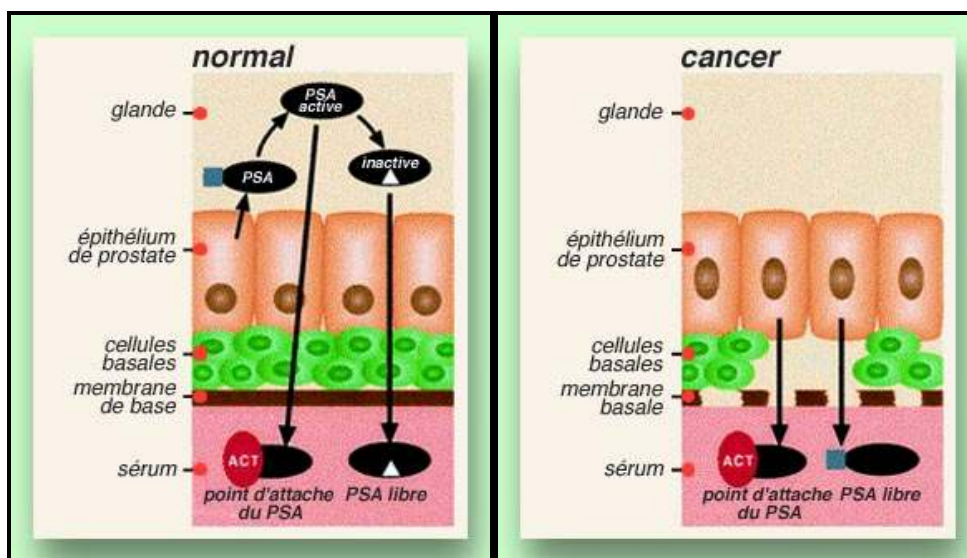


Figure 10 : Production de la PSA dans le tissu prostatique sain (à gauche) et dans le cas d'un tissu prostatique cancéreux (à droite). (ACT: *alpha-1 antichymotrypsine*)

La valeur du taux de PSA doit faire suspecter l'existence d'un cancer de prostate. Plus le taux de PSA est élevé, plus le risque de cancer de la prostate est grand comme l'indique le tableau 7 ci-dessous.

Valeur du PSA (ng/ml)	Risque total de cancer (%)	Stade de cancer
3 à 7	25	Très précoce et curable >80% des cas)
7 à 30	65	Précoce mais curable >50% des cas
30 à 100	90	Avancé
100 à 1000	100	Tardif

Tableau 7 : Valeur du taux de PSA en fonction du grade du cancer de la prostate

3- Les prélèvements tissulaires prostatiques

Les prélèvements permettent d'analyser au microscope des cellules et tissus prélevés. Ces analyses anatomo-pathologiques donnent des informations précises sur le type de cancer et ses caractéristiques. La biopsie prostatique est réalisée par un urologue. Elle consiste en une ponction souvent effectuée par voie transrectale avec un guidage par échographie.

F- Les traitements du cancer

La découverte de l'androgéno-dépendance du cancer de la prostate par Huggins et ses collaborateurs en 1941 a permis de développer de nombreuses thérapies consistant à diminuer le taux d'androgènes circulants. En effet, le retrait des androgènes, par castration chimique et/ou chirurgicale, entraîne la mort cellulaire programmée des cellules prostatiques androgéno-dépendantes (Colombel et al., 1996). Cependant, cette technique, efficace dans un premier temps, aboutit dans certains cas à un échappement thérapeutique dû à l'évolution des cellules tumorales vers un état androgéno-indépendant. A partir de ces cellules tumorales se développe une tumeur résistante à la privation hormonale et à la chimiothérapie. De tels cancers sont très agressifs et échappent à tout traitement actuellement connu.

Il existe deux types de traitements utilisés contre le cancer prostatique : les traitements curatifs et les traitements palliatifs. Le traitement curateur consiste en une prostatectomie chirurgicale ou en une radiothérapie externe. Le traitement palliatif comprend le traitement hormonal, la radiothérapie externe mais également le traitement des complications et des métastases. Il est à noter qu'il n'existe actuellement aucune chimiothérapie ayant fait la preuve de son efficacité. En effet, les cellules cancéreuses prostatiques sont connues pour leurs faibles taux de prolifération, et les agents chimiothérapeutiques actuels sont impuissants. **Dans ce contexte, le développement de nouvelles cibles thérapeutiques est nécessaire pour améliorer à la fois la survie et la vie quotidienne des patients.**

1- Traitements curatifs

La prostatectomie radicale est une technique chirurgicale visant à enlever la totalité du tissu pathologique prostatique et est utilisée dans les traitements du cancer. Enfin la radiothérapie externe qui est utilisée dans les cas de cancer permet par irradiation de détruire des tissus ciblés (Rodriguez-Covarrubias et al., 2008). Bien que le traitement le plus utilisé reste la prostatectomie radicale par chirurgie dans les cas de cancer, l'utilisation de traitements palliatifs peut s'avérer plus adéquate dans certaines configurations.

2- Traitements palliatifs

Les traitements palliatifs visent avant tout à réduire le taux d'androgènes circulants ou à empêcher leur action par hormonothérapie. En effet, il est parfaitement établi que les androgènes régulent la croissance des cellules prostatiques (Feldman and Feldman, 2001).

Dans la plupart des cas, les thérapeutiques anti-androgéniques sont :

- **Des inhibiteurs de la 5 α -réductase** (Finastéride): La 5 α -réductase est l'enzyme responsable de la transformation de la testostérone en son métabolite actif : la 5 α -DHT au niveau prostatique (Thorpe et al., 2007).
- **La castration (orchidectomie) ou rétrocontrôle chimique, (Figure 11)** qui va diminuer les taux sériques d'androgènes grâce à des analogues de la LH-RH ce qui permet de réduire la synthèse de testostérone par les testicules en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui régule cette synthèse (Soga et al., 2007).

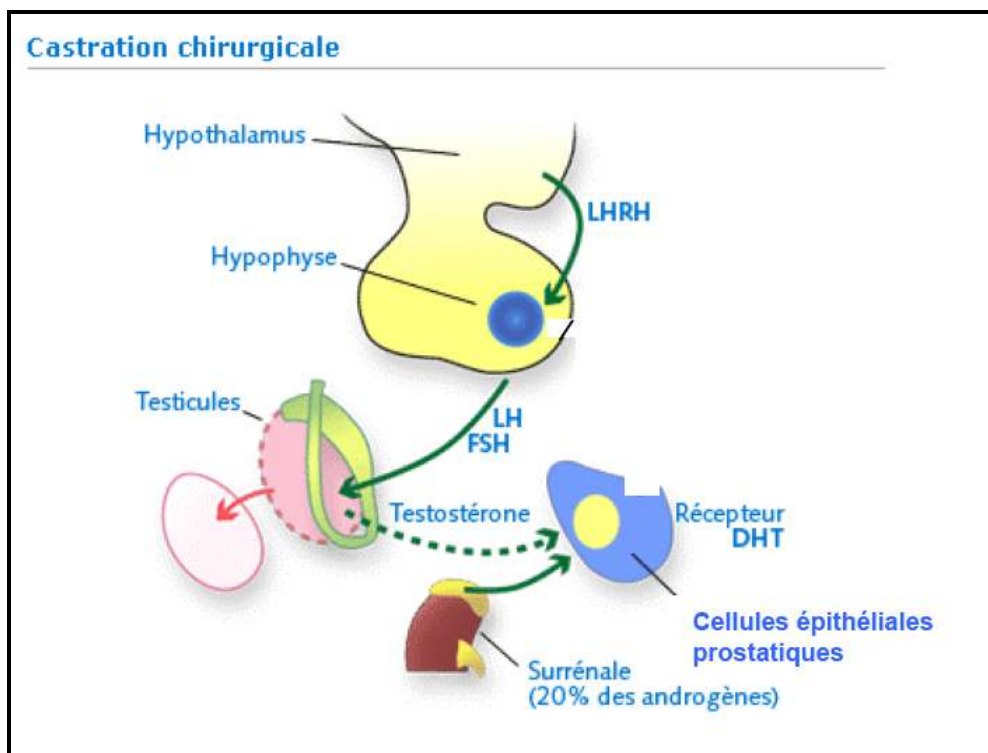


Figure 11: Représentation schématique de la castration chirurgicale ou orchidectomie

- **L'utilisation des androgènes** (avec les stéroïdiens : Androcur®, Cyprostat®, Megace® et les non stéroïdiens : Eulexin®, Nilandron®, Casodex®). Ils ont pour but d'empêcher l'action des androgènes au niveau des organes cibles en se liant à leurs récepteurs de façon compétitive (Baltogiannis et al., 2004).
- **L'utilisation des oestrogènes** constitue une autre façon de provoquer un arrêt de synthèse de testostérone par les testicules en inhibant la sécrétion hypophysaire de LH (Fluchter et al., 2007).

G- L'avenir dans le traitement du cancer de la prostate

La compréhension des phénomènes moléculaires impliqués dans l'évolution des cellules tumorales vers l'échappement hormonal représente un axe de recherche essentiel pour le contrôle clinique de l'échappement thérapeutique. La recherche de nouveaux marqueurs et cibles thérapeutiques pour palier à cet échappement s'avère donc cruciale. Des études récentes indiquent que les altérations de l'homéostasie calcique et de la modulation du fonctionnement des canaux ioniques pourraient jouer un rôle important dans la régulation des processus contrôlant la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse. Nous allons présenter l'importance de l'homéostasie calcique et de sa régulation par les canaux ioniques.

II- L'homéostasie calcique : implication dans la physiopathologie cellulaire

Le rôle du calcium (Ca^{2+}) dans l'ensemble des processus de signalisation cellulaire est largement reconnu. L'homéostasie calcique, à la base de la signalisation calcique, est un équilibre entre influx, efflux et stockage des ions Ca^{2+} . Sur le plan physiologique, la signalisation calcique intervient dans l'évolution du phénotype cellulaire (prolifération, différenciation, apoptose...) (Munaron et al., 2004a; Munaron et al., 2004b; Wang and El-Deiry, 2004), dans l'activité cellulaire (contraction, sécrétion..) ou encore dans l'excitabilité cellulaire (Berridge et al., 2003). Ainsi, chaque phénotype cellulaire, normal ou pathologique, est caractérisé par une « signature calcique » particulière (reflétant la cinétique, l'amplitude et la localisation subcellulaire des signaux calciques). Les signaux calciques sont donc régulés très finement à la fois dans le temps, l'espace et en amplitude (Berridge et al., 1998) (Figure 12).

Nous définirons le « calciosome » comme le répertoire des acteurs impliqués dans l'homéostasie calcique. Notre hypothèse est que la signature calcique de chaque cellule dépend de l'activité globale de ce calciosome. De nombreux acteurs de l'homéostasie calcique sont d'ores et déjà identifiés et étudiés : canaux et pompes calciques, chélateurs calciques, enzymes dépendants du calcium, ...etc.

Bien que plusieurs études montrent que les altérations de l'homéostasie calcique et de la modulation du fonctionnement des canaux ioniques pourraient jouer un rôle important dans la régulation des processus contrôlant la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse, aucune approche utilisant les canaux ioniques comme cible thérapeutique n'est actuellement envisagée dans le cadre des traitements des cancers de

la prostate. Nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux canaux calciques et à leur(s) rôle(s) dans la progression du cancer prostatique.

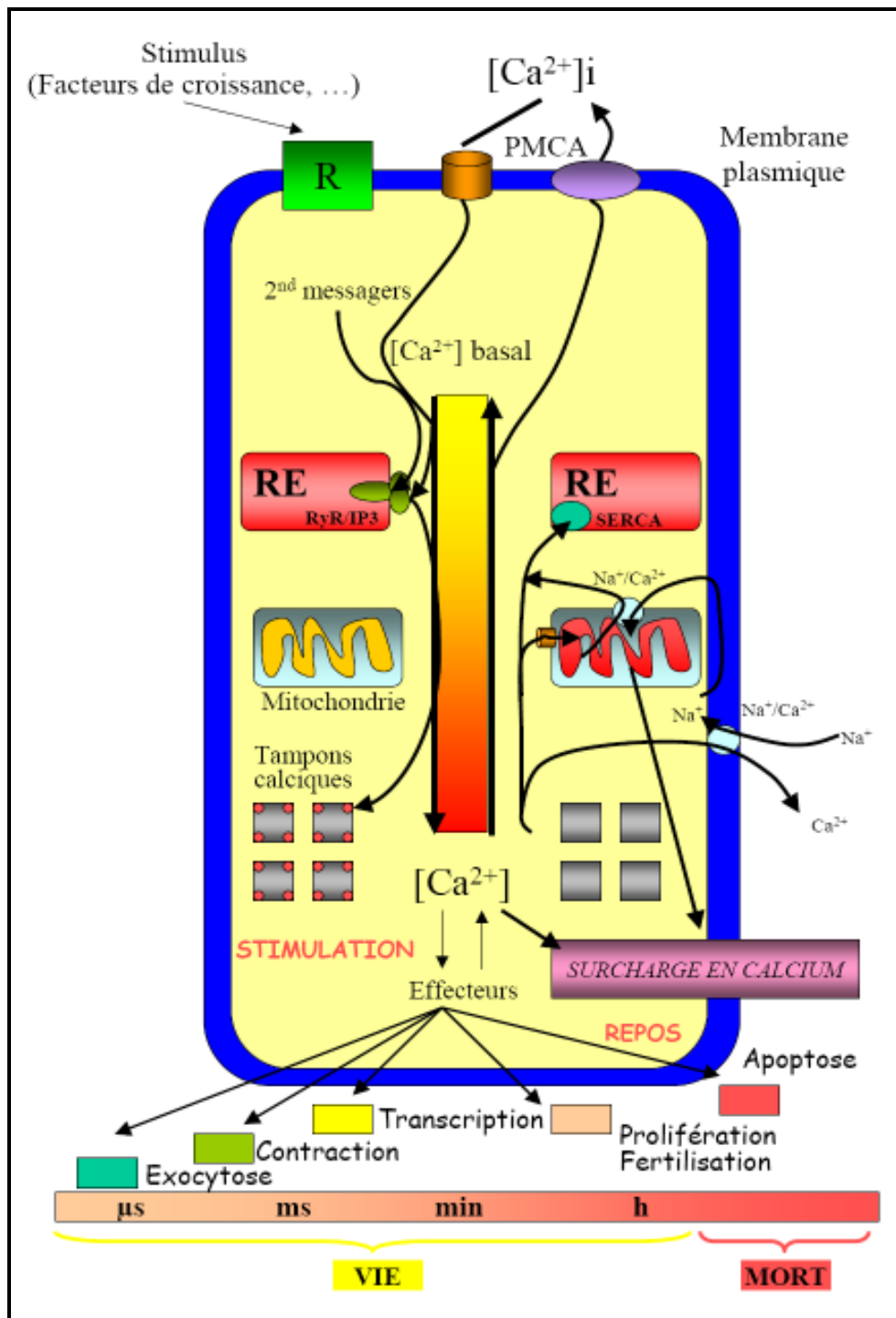


Figure 12: Représentation schématique de la propagation des signaux calciques et des effets physiologiques de la signature calcique en fonctions de ces propriétés (cinétique, amplitude). Adapté de Berridge (Berridge et al., 2003).

A- Prolifération et calcium

Il est actuellement connu qu'un signal calcique prolongé constitue un signal de croissance pour de nombreux types cellulaires (Berridge, 1995). Des altérations des voies de signalisation calcique impliquées dans la prolifération cellulaire conduisent ainsi au développement de certains cancers. A l'inverse, la prolifération cellulaire peut être réduite si la genèse ou l'action des signaux calciques est affectée.

Un excès de prolifération est souvent lié à des mutations de la voie de signalisation calcique activée par la plupart des facteurs de croissance. Une surexpression de la PLC, une augmentation d'activité de protéines kinases synthétisant les phosphoinositides, une réduction du catabolisme de l'inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃) ont été décrites dans certains carcinomes colorectaux ou leucémies humaines (Homma et al., 1994; Mengubas et al., 1994). Ainsi, de nombreuses thérapies anti-cancéreuses ainsi que des substances immunosuppressives ont pour cibles directes les protéines impliquées dans la voie de signalisation calcique.

La prolifération cellulaire peut être stimulée par différents agonistes agissant sur des récepteurs couplés aux protéines G (Rozengurt, 1992) qui agissent sur la PLC β 1 qui génère du diacylglycérol (DAG) qui active la protéine kinase C (PKC) et de l'IP₃ qui entraîne la vidange réticulaire. La PKC active le gène c-fos (Nishizuka, 1992).

Par ailleurs, outre la voie de la PLC, les facteurs de croissance activent des récepteurs tyrosine kinase, ce qui va activer par exemple la voie des MAP kinases ("mitogen-activated protein kinase") (Garcia-Sainz et al., 1999). Cependant, les facteurs de croissance ne sont pas les seuls facteurs physiologiques connus pour stimuler la prolifération et entraîner une élévation du taux de calcium cytosolique (Spielberg et al., 1991). Par ailleurs, il a été démontré que l'entrée calcique est essentielle pour la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Shah et al., 1994). La compréhension des phénomènes moléculaires impliqués dans l'évolution des cellules tumorales vers l'échappement hormonal représente un axe de recherche essentiel pour le contrôle clinique de l'échappement thérapeutique. La recherche de nouveaux marqueurs et cibles thérapeutiques pour palier à cet échappement s'avère donc cruciale. Des études récentes indiquent que les altérations de l'homéostasie calcique et de la modulation du fonctionnement des canaux ioniques pourraient jouer un rôle important dans la régulation des processus contrôlant la prolifération, la différenciation et l'oncogenèse. Nous allons présenter l'importance de l'homéostasie calcique et de sa régulation par les canaux ioniques.

B- Principales sources de calcium

Au niveau de la membrane plasmique, différents types de canaux et pompes calciques régulent les échanges d'ions calcium entre les milieux intra et extracellulaires (Figure 13). Par exemple, les cellules dites excitables, c'est-à-dire pouvant générer des potentiels d'action, comme les neurones ou les cellules musculaires, possèdent des canaux calciques voltage-dépendants (VOC pour Voltage-Operated Channel) qui s'ouvrent lors d'un changement de potentiel membranaire et provoquent une entrée de calcium (Berridge, 1996). Il existe aussi des canaux calciques chimio-dépendants (ROC pour Receptor-Operated Channel) que l'on retrouve dans les cellules excitables et également dans les cellules non excitables (Berridge, 1996). Ces canaux s'ouvrent en réponse à la fixation d'un ligand (hormones, neurotransmetteurs, seconds messagers) sur le canal et permettent un influx de calcium dans la cellule. Les canaux SOC (Store-Operated Channel), activés suite à la libération du calcium contenu dans le réticulum sont, quant à eux, largement présents dans les cellules non excitables (Parekh and Penner, 1997). La membrane plasmique possède également des pompes appelées PMCA (pour Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) et des transporteurs (comme l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) pour faire sortir le calcium hors de la cellule et ainsi maintenir le gradient de concentration des ions calcium de part et d'autre de la membrane plasmique.

Au niveau du réticulum endoplasmique, d'autres canaux et pompes calciques contrôlent les flux d'ions calcium entre le cytosol et le milieu intra-réticulaire (Berridge, 1996). Les récepteurs à la ryanodine ainsi que les récepteurs IP_3 permettent, suite à leur activation, la libération du calcium contenu dans le réticulum. Des travaux récents montrent que le NAADP est également capable de libérer du calcium (Lee, 2000; Lee and Aarhus, 2000). Le NAADP dont le récepteur n'a pas encore été identifié, libère du calcium d'une réserve insensible à la thapsigargine (TG, inhibiteur des pompes SERCA, voir ci-après), réserve qui peut être physiquement séparée de celles mobilisées par l' IP_3 et l'ADPRc (Genazzani and Galione, 1997; Lee, 2000). En outre, différentes protéines réticulaires comme la calnexine ou la calréticuline sont capables de lier le calcium dans la lumière du RE (Arnaudeau et al., 2002). Leur affinité pour le calcium est faible, de l'ordre de 1 mM, mais comme elles sont présentes dans le RE en quantité importante, cela représente une grande capacité de stockage d'ions calcium. Ensuite, des pompes calciques utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP (SERCAs, Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase), accumulant des ions calcium dans le réticulum et restaurant les réserves calciques

intracellulaires sont présentes. Il a également été décrit une fuite passive du calcium réticulaire compensant la recapture permanente du calcium par les pompes présentées ci-dessus (Hofer et al., 1996; Mogami et al., 1998; Van Coppenolle et al., 2004b). Les mitochondries et le noyau représentent également des stocks calciques intracellulaires non négligeables. Dans le cadre de cette thèse nous nous focaliserons sur l'étude du RE qui est la réserve calcique intracellulaire majeure, et des échanges au niveau de la membrane plasmique.

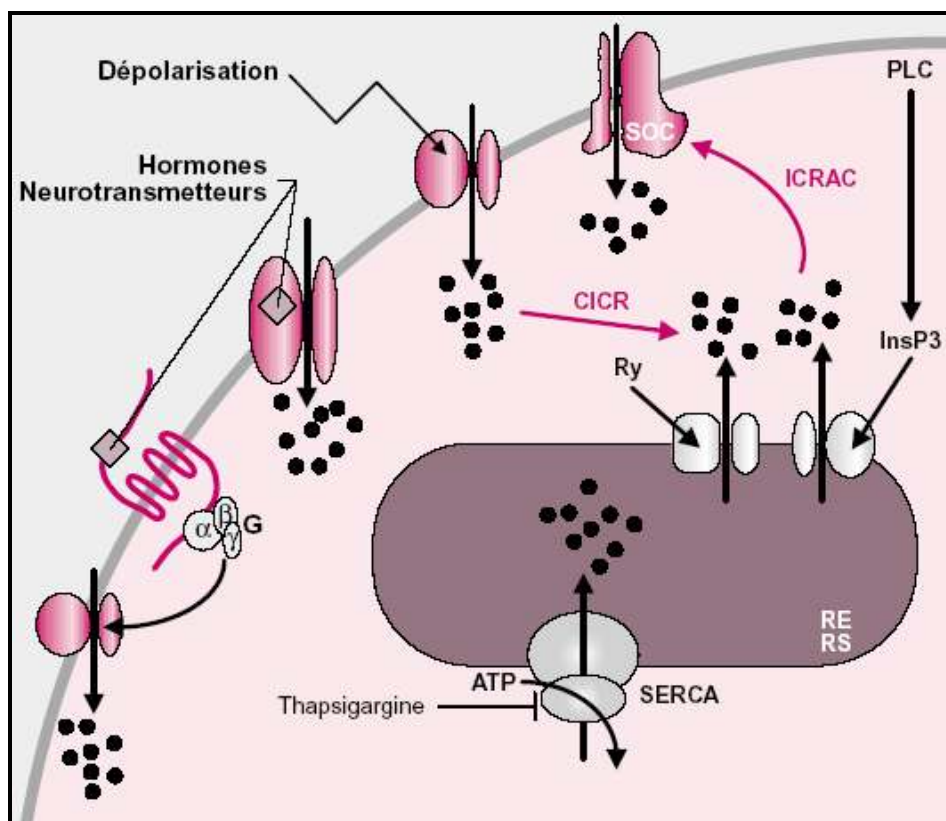


Figure 13 : Sources de calcium et voies d'entrée dans le cytosol. (Les points noirs désignent les ions calciques) Le calcium peut entrer depuis le milieu extracellulaire par (de gauche à droite) : un canal couplé *via* une protéine G à un récepteur (métabotrope) à 7 domaines transmembranaires, un récepteur canal (ionotrope, ROC ; Recepteur-Operated Channel), un canal sensible au potentiel (VOC ; Voltage-operated channel), ou un canal activé par les récepteurs intracellulaires (SOC ; store-operated calcium channel). Le réticulum endoplasmique (RE) peut libérer du calcium par les récepteurs de l'InsP3 (InsP3R) ou par les canaux sensibles à la ryanodine (RyR). Ces réserves internes sont maintenues par l'activité des SERCA (smooth ER calcium ATPase), qui pompent le calcium à l'inverse du gradient de concentration en consommant de l'énergie. Ces SERCA sont la cible de la thapsigargine. Le CICR (calcium-induced calcium release) est l'activation des canaux InsP3R et RyR par l'ouverture des canaux sensibles au potentiel. Inversement, les SOC de la membrane plasmique s'ouvrent lorsqu'ils sont activés par les canaux InsP3R et RyR.

C- Caractéristiques des signaux calciques

1- Régulation spatio-temporelle des signaux calciques

Le calcium, messenger des plus versatiles, est un agent universel de signalisation intracellulaire régulant la vie et la mort de la cellule. Cet ion polyvalent génère des signaux très finement régulés, à la fois dans le temps, dans l'espace et en amplitude (**Figure 14**) (Berridge et al., 1998) .

- Outre la provenance du calcium (milieu extracellulaire ou stocks intracellulaires, (Berridge, 1993; Clapham and Sneyd, 1995), la nature des signaux calciques (événements localisés, vagues calciques intracellulaires, vagues calciques intercellulaires) sont autant de moyens d'activer différents processus physiologiques. Les événements localisés, encore qualifiés d'élémentaires, peuvent être initiés par des canaux de la membrane plasmique ou réticulaire, et participent notamment à la sécrétion vésiculaire, la mitose etc... . Ces événements élémentaires peuvent recruter d'autres canaux et ainsi générer des vagues calciques globales intracellulaires, voire intercellulaires, impliquées dans la prolifération, l'expression génique etc... . La localisation cellulaire des canaux est également essentielle car elle permet de cibler, pour des événements élémentaires similaires, des processus cellulaires différents, voire opposés. Par exemple, la relaxation des cellules musculaires lisses est due à l'activation de canaux potassiques par des pics calciques élémentaires, localisés à proximité de la membrane. Quand ces pics calciques ont lieu plus profondément dans la cellule et qu'ils sont coordonnés pour générer une vague calcique, ils entraînent la contraction musculaire (Nelson et al., 1995b; Porter et al., 1998).

- Les signaux calciques doivent être régulés dans le temps : bien que les augmentations du taux de calcium soient nécessaires pour constituer un signal, une augmentation trop prolongée peut engendrer la mort cellulaire. Les cellules délivrent donc des signaux de faible amplitude ou plus couramment, des pics calciques transitoires. Ceux-ci peuvent être uniques (lors de la sécrétion vésiculaire ou de la contraction musculaire) ou, si le signal doit être maintenu sur une période plus longue, répétés. Ces signaux correspondent alors à des oscillations dont la fréquence et la longévité sont modulées en fonction de l'effet escompté. Cette régulation des oscillations en termes de fréquence est cruciale pour la cellule. Un exemple bien connu est l'activation de gènes distincts en fonction de la fréquence de ces oscillations (Dolmetsch et al., 1998).

- Un signal calcique peut être décomposé en événements calciques élémentaires. On peut donc considérer que c'est l'intégration de ces signaux en un signal d'amplitude

supérieure au seuil d'activation des protéines effectrices qui déclenche une fonction cellulaire. On observe en effet que chaque protéine sensible au Ca^{2+} possède une affinité spécifique pour cet ion qui détermine à la fois la $[\text{Ca}^{2+}]$ à partir de laquelle suffisamment de protéines effectrices pourront être activées pour déclencher une fonction cellulaire et à la fois la $[\text{Ca}^{2+}]$ au-delà de laquelle ces protéines ne sont plus activées de façon spécifique. Il apparaît alors logique que la $[\text{Ca}^{2+}]$ atteint par le signal, celui-ci activera certaines protéines effectrices et pas d'autres.

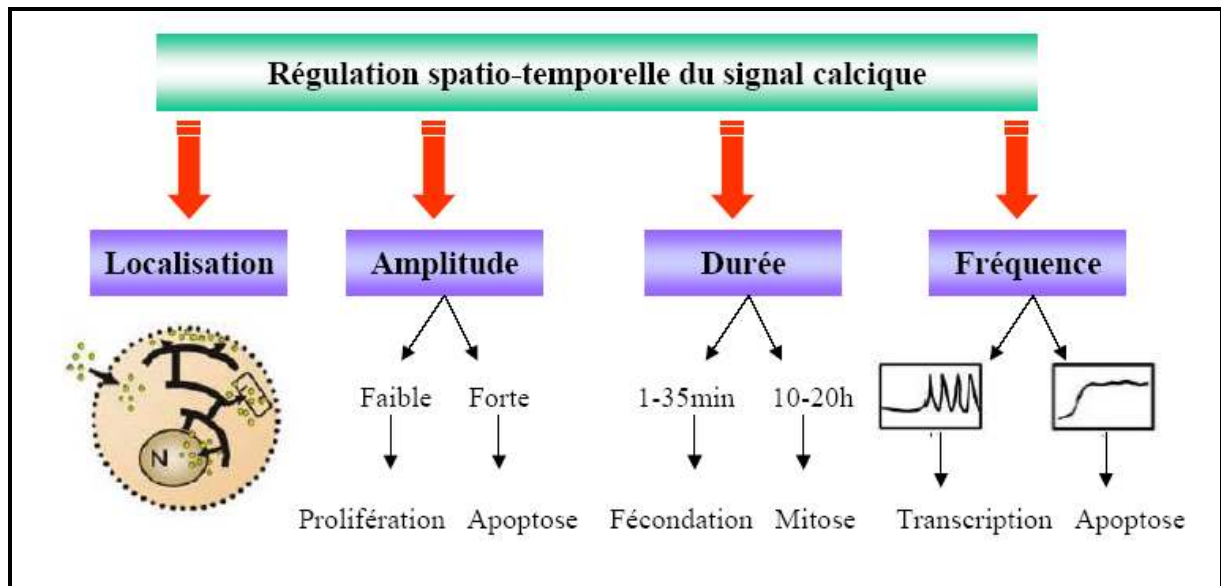


Figure 14 : Régulation spatio-temporelle du signal calcique. Cette régulation est caractérisée par une « signature particulière » qui reflète la cinétique (durée et fréquence), amplitude et localisation cellulaire du signal calcique (Source : Prevarskaya N et al., 2007 ; Review).

2- Genèse et maintien des oscillations calciques

Dans la plupart des cellules non excitables, de nombreux récepteurs des hormones ou des neurotransmetteurs sont couplés aux PLC par l'intermédiaire de protéines G ou par leur activité tyrosine kinase. En présence d'agonistes, les PLC hydrolysent les phosphoinositides (préférentiellement le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PIP_2) et produisent du diacylglycérol et l' IP_3 . L' IP_3 est un second messager intracellulaire qui peut alors rapidement diffuser dans le cytosol jusqu'à son récepteur, le récepteur IP_3 , situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique libérant le calcium séquestré (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2000a; Berridge et al., 2000b). Cette libération rapide et transitoire des stocks calciques intracellulaires correspondant à la vidange du RE est suivie d'un influx lent et soutenu de calcium à partir du milieu extracellulaire *via* les canaux SOC, appelé « entrée capacitive » (Berridge, 1995; Clapham, 1995; Parekh and Penner, 1997; Putney, 1999). Bien que plusieurs hypothèses aient été émises, la nature du signal permettant l'entrée capacitive

est encore mal connue. Cette entrée de calcium représente un moyen de remplir à nouveau les réserves calciques intra-réticulaires (**Figure 15**) (Gill et al., 1996; Lewis, 2001; Parekh and Penner, 1997; Putney and McKay, 1999).

Déclenchée par des stimuli extracellulaires (hormones, facteurs de croissance) ou externes tels que les agents pathogènes, l'entrée capacitive constitue également un signal pour la cellule qui peut être impliqué dans la prolifération ou encore l'apoptose. Or, ces processus physiologiques nécessitent des signaux calciques maintenus dans le temps. Comme les réserves calciques intracellulaires sont limitées, le maintien d'un signal calcique prolongé nécessite un influx calcique transitoire d'origine extracellulaire, à travers les canaux de type SOC situés dans la membrane plasmique. Il existe donc un cycle « membranaire » : le calcium entre par les canaux SOC et est déchargé par les pompes Ca^{2+} ATPases de la membrane plasmique, et un cycle « réticulaire » : le calcium est libéré par les récepteurs IP_3 et capturé par les pompes SERCA. Les oscillations calciques régulières résultent donc de l'interaction entre ces cycles. Le degré d'implication de ces deux cycles dépend du modèle cellulaire étudié. Dans les lymphocytes, l'entrée calcique d'origine extracellulaire joue un rôle plus prépondérant que la vidange réticulaire par rapport aux autres modèles cellulaires tels que les fibroblastes (Berridge, 1995; Dolmetsch and Lewis, 1994; Maltsev et al., 1994).

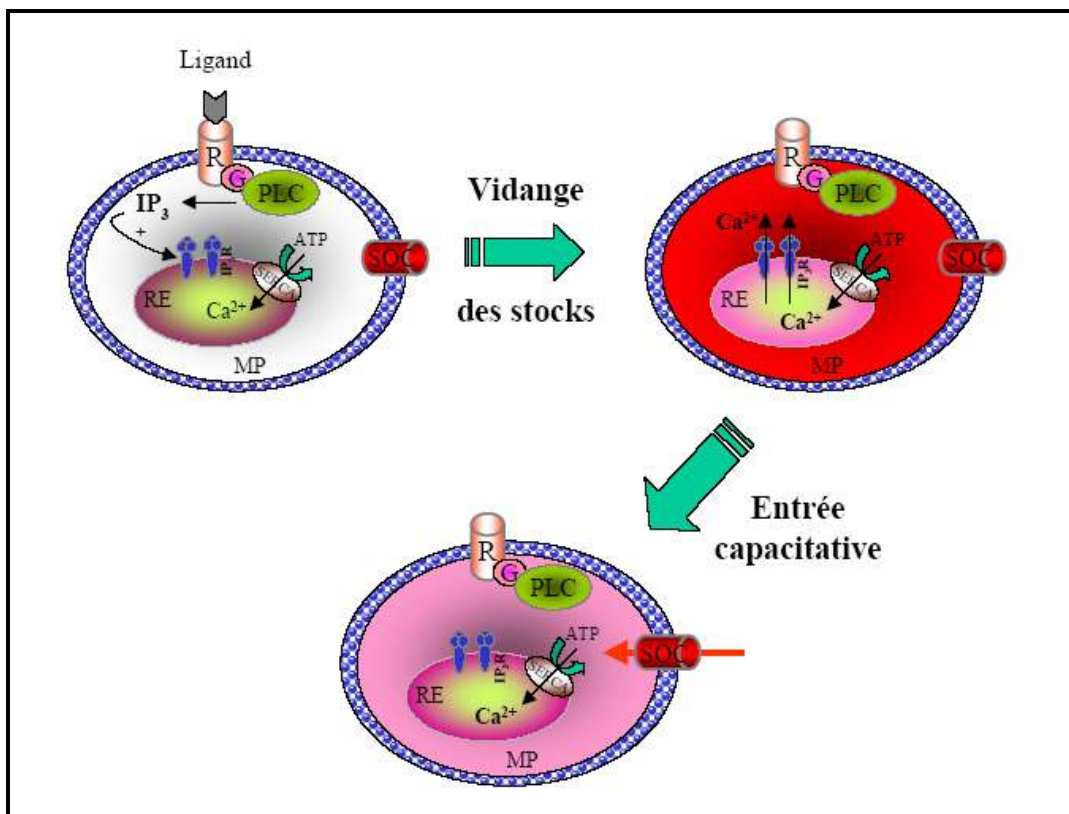


Figure 15 : Mécanisme de l'entrée capacitive. La production d'IP₃ suite à la stimulation d'un récepteur induit la vidange réticulaire. Celle-ci serait détectée par un « Ca²⁺ sensor » dans la lumière du réticulum endoplasmique. Les canaux SOC alors activés permettent une entrée de Ca²⁺ dite « capacitive » afin de remplir les stocks calciques intracellulaires. (R) récepteur ; (G) protéine G ; (PLC) Phospholipase C ; (IP₃) Inositol 1, 4, 5 triphosphate ; (RE) réticulum endoplasmique ; (MP) membrane plasmique ; (SERCA) sarcoplasmic endoplasmic réticulum Ca²⁺ ATPase.

Dans les cellules non excitables, les oscillations calciques s'expliquent notamment par le fonctionnement du récepteur IP₃. Dans un cadre physiologique, l'IP₃ contrôle à la fois la vidange réticulaire et l'entrée capacitive en agissant sur le récepteur IP₃ (Berridge, 1993). Ce second messager peut agir de deux manières. A des concentrations élevées, il induit une vidange massive du RE alors qu'à de faibles concentrations, notamment lorsqu'il est produit par la PLC, l'IP₃ vidange faiblement le RE et sensibilise son récepteur au calcium qui agit comme co-agoniste. Dans cet état excitable, le récepteur IP₃ est très sensible au calcium qui provoque un processus régénératif : le phénomène de « calcium-induced calcium release » (CICR), (Berridge, 1993; Roderick et al., 2003). Le CICR permet d'amplifier et de propager des événements calciques microscopiques en signaux calciques détectables. Le calcium déclenche, *via* les récepteurs IP₃ qui finiront par se désensibiliser au calcium, une vidange réticulaire correspondant à un pic calcique transitoire. Cette vidange induit le remplissage des

réserve calcique après chaque pic : le calcium provient de la phase de recouvrement du précédent pic et du milieu extracellulaire *via* des canaux SOC. Une fois que le récepteur IP₃ est à nouveau sensible au calcium, celui-ci provoque une nouvelle oscillation et ainsi de suite.

Le rôle de l'entrée capacitive dans le maintien des oscillations calciques est variable. En effet, dans certains modèles cellulaires, les oscillations persistent en l'absence de l'influx (Lechleiter and Clapham, 1992; Rooney et al., 1989; Sneyd et al., 1993) alors que d'autres, il s'avère indispensable (Martin and Shuttleworth, 1994; Yule and Gallacher, 1988). Ces effets sont dépendants de l'agoniste et du moment où le calcium extracellulaire est retiré (Petersen et al., 1991; Yule and Gallacher, 1988). De récents travaux de Shuttleworth *et al.* ont proposé un modèle expliquant certaines controverses. De faibles changements dans le contenu total de calcium dans la cellule (cytoplasme, RE et les tampons calciques) ont une grande influence sur les oscillations. En effet, l'influx calcique extracellulaire contrôle les oscillations (la fréquence notamment) en régulant le contenu calcique total, notamment celui du RE. Les oscillations surviennent lorsque le calcium stocké (dans le RE) dépasse un seuil. Ces données sont applicables à tous les modèles cellulaires (Shuttleworth, 2004).

D- Calcium et transcription

De nombreux facteurs modifient la concentration intracellulaire en calcium. Ce calcium est mobilisé comme nous l'avons vu précédemment soit par l'activation de canaux ou par une libération à partir de réserves internes. C'est en 1986 que Greenberg et ses collaborateurs ont montré qu'une entrée de calcium dans la cellule était capable de provoquer l'expression de certains gènes.

La durée de vie du signal calcique est très courte comparée aux mécanismes mis en jeu pour obtenir l'expression des gènes. On considère que les cibles immédiates du calcium sont des gènes codant pour des facteurs de transcription de courte durée de vie (jun, fos). La transcription de ces gènes précoces peut se faire sans synthèse de protéines. L'état de phosphorylation d'un facteur de transcription peut moduler sa localisation subcellulaire, sa stabilité, son activité transcriptionnelle, son association avec des cofacteurs, voire contribuer au remodelage ciblé de la chromatine. Nombre de ces effets sont relayés par des enzymes dont l'activité est stimulée par la fixation du calcium à une calmoduline. Toutefois, la calmoduline n'est pas toujours le médiateur, le calcium peut agir directement sur un facteur de transcription (DREAM).

1- Calcium et localisation des facteurs de transcription

La transcription peut être contrôlée au niveau de la localisation de facteurs de transcription. C'est le cas pour le facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of Activated Tcells) qui intervient dans différentes cellules pour contrôler l'expression des gènes cibles comme les cytokines (IL2,3,4) (Pan F et al., 2007) (Figure 16).

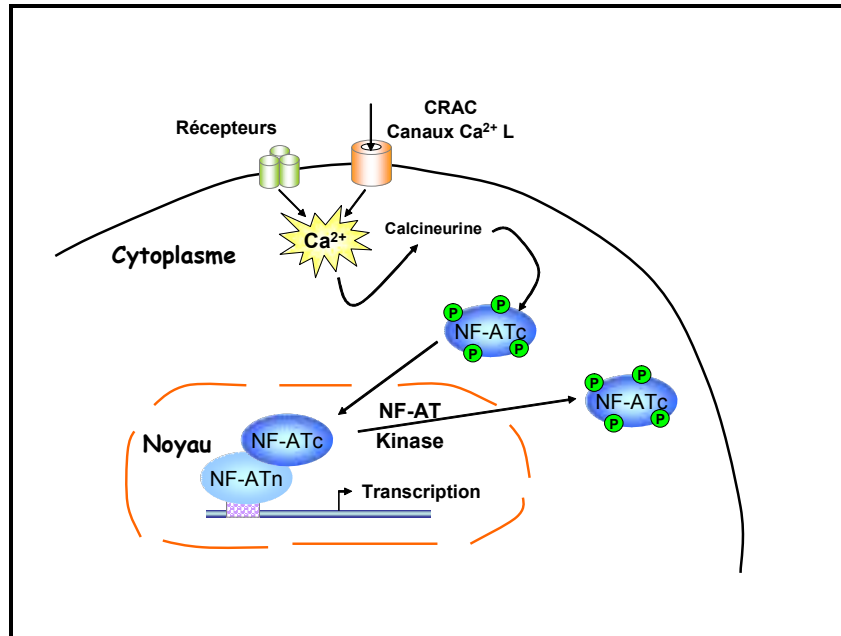


Figure 16: Représentation schématique de la translocation calcium-dépendante du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated Tcells).

Ce facteur de transcription est un complexe constitué de 2 protéines: Une protéine nucléaire (NF-ATn) et une NF-ATc qui est capable de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Cette translocation est sous la dépendance d'une augmentation de calcium intracellulaire qui va activer la calcineurine (serine/thréonine phosphatase, calmoduline binding protein). La calcineurine va déphosphoryler le facteur NFATc sur des sérines particulières et permettre l'activation ou l'exposition de 2 signaux de localisation nucléaires (NLS). Le facteur NFATc dans le noyau est capable d'interagir avec le facteur nucléaire (NFATn) pour former un complexe de transcription actif. Ces mêmes sérines sont la cible de Kinases (GSK 3, JNK, caséine kinase) qui viennent s'opposer à l'effet de la calcineurine et sont responsables du renvoi de NF-ATc dans le cytoplasme. L'activation soutenue de la calcineurine est nécessaire pour le maintien de NF-ATc dans le noyau. De nombreuses observations montrent que la transcription sous la dépendance des facteurs NFAT n'est effective que si d'autres voies de signalisation sont sollicitées de façon conjointe (Werlen et al., 1998). En fait, il semblerait que dans des conditions physiologiques, NFATc ne soit pas capable de lier avec une affinité suffisante les séquences d'ADN qu'il est sensé reconnaître. Cette liaison serait obtenue par

synergie avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1 (Macian et al., 2001) qui jouerait alors le rôle de NFATn.

2- Modulation de l'expression transcriptionnelle

Les facteurs de transcriptions de la famille « leucine zipper » forment des dimères (homo ou hétérodimère) grâce à une séquence spécifique possédant une structure en hélice α . Parmi les membres de cette famille on trouve le facteur de transcription CREB dont la régulation par les voies calcium dépendantes a été très étudiée. La régulation de la transcription par le facteur CREB fait intervenir la CaM Kinase IV (CaMK IV) qui est nucléaire. L'action de la CaM Kinase IV suit en fait un mécanisme en deux étapes.

Dans une première étape suite à l'augmentation de calcium au niveau nucléaire, la CaM Kinase phosphoryle CREB qui peut alors interagir avec le co-facteur CBP. Dans une seconde étape CBP est lui-même activé par la kinase c'est ce complexe activé qui permet alors la transcription. De plus une autre protéine p300 similaire à CBP est aussi requise pour avoir un complexe transcriptionnel actif. CREB interagit par son domaine Q2 avec des éléments de la machinerie basale (TAF) et CBP est capable d'interagir avec RHA (possède une activité hélicase) permet de recruter et stabiliser PolII sur son site. Le produit du proto-oncogène *c-fos*, appartiennent à la classe de gènes de réponse précoce (IEG, *Immediate Early Gene*) qui code pour un facteur de transcription et qui joue le rôle de *commutateur général*, permettant à la cellule d'intégrer les signaux provenant des nombreuses voies de transduction intracellulaires. Dans les cellules de phéochromocytome (PC₁₂), l'activation de *c-fos* intervient très rapidement après un influx de calcium provoqué par l'ouverture de canaux calciques de type L, après une simple dépolarisation membranaire. Dans ce système, l'expression de *c-fos* est sous le contrôle du facteur de transcription CREB.

3- Régulation directe de l'expression des gènes par le calcium: DREAM

Le mode d'action de la protéine DREAM, représente un mécanisme direct de régulation de l'expression des gènes par le calcium (Figure 17). DREAM est une protéine de 32 kDa capable de fixer le calcium. Elle possède 4 sites de fixations de type EF hand (Carrion AM et al., 1999).

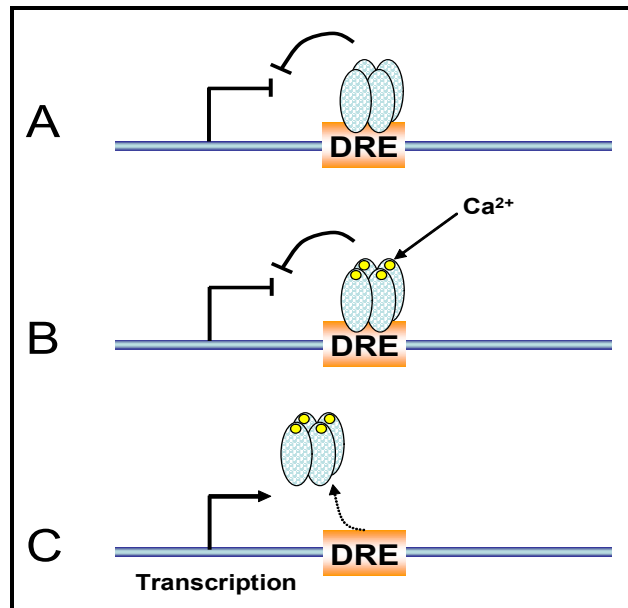


Figure 17 : mécanisme d'action de DREAM. (A) DREAM est fixé de manière constitutive sur les séquences DRE et réprime la transcription. (B) L'augmentation de Ca^{2+} modifie l'affinité de DREAM pour DRE. (C) DREAM se détache et permet la transcription.

La caractéristique principale de cette « calcium binding » protéine est sa capacité à se fixer sur une séquence spécifique sur l'ADN. Cette séquence est située en aval du site d'initiation de la transcription (+ 40 dans la partie 5' non-traduite du gène); d'où son nom de Downstream Regulatory Element (DRE). La fixation du facteur DREAM sur la séquence DRE réprime la transcription des gènes cibles.

DREAM est fixée de manière constitutive sur la séquence DRE sous forme d'un tétramère. Lorsque DREAM est présent sur l'élément DRE la transcription est inhibée. Lors d'une augmentation de calcium, la fixation du calcium au niveau des sites EF hand va induire un changement de conformation de la protéine, ce changement modifie la fixation sur la séquence DRE sans pour autant modifier la stabilité du tétramère. Dans ces conditions le site DRE est libéré ce qui permet d'initier ou de continuer la transcription. DREAM est donc un répresseur transcriptionnel capable de détecter des variations de calcium au niveau du noyau et de réguler directement l'expression de gènes cibles. Une étude a montré que c-fos serait une cible de ce répresseur dépendant du calcium (Carrion et al., 1999). DREAM interagit également avec le canal potassique Kv4 (An et al., 2000).

4- Modulation de l'expression génique calcium-dépendante

Un certain nombre de paramètres affectant le signal calcique peut moduler l'expression génique. Ce sont :

- l'amplitude et la durée du signal

- sa forme, en particulier la fréquence des oscillations
- la localisation, on a vu précédemment l'importance des variations au niveau du noyau ou du cytoplasme
- le site d'entrée (canaux L par exemple)

Par exemple, le promoteur de fos contient 2 éléments majeurs capables de répondre à des variations du niveau de calcium intracellulaire :

- L'élément SRE (serum responsive element)
- L'élément CRE (c-AMP ou calcium responsive element).

CRE est occupée de façon constitutive par CREB (CRE binding protein) sous forme de dimère inactif. SRE contient des séquences de liaison pour SRF (serum response factor) ainsi qu'une séquence capable d'interagir avec des protéines de la classe des TCF (Ternary complexe factors)

Ces 2 sites sont les cibles des voies de transduction calcium dépendantes en particulier après une entrée de calcium par des canaux calciques de type L. Toutefois il existe une différence dans leur réponse au calcium entre ces 2 sites.

Il a été montré sur une lignée de cellule (lignée pituitaire) que le site SRE était impliqué dans le contrôle de la transcription suivant une variation de calcium cytoplasmique alors que le site CRE répondait à une variation de calcium nucléaire. Ces deux sites fonctionnant de manière indépendante (Bading et al., 1997).

Le calcium paraît donc être un facteur majeur notamment pour le contrôle de la prolifération cellulaire. Deux types de canaux ioniques membranaires peuvent intervenir dans l'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire ; les canaux calciques permettant l'entrée du calcium et les canaux potassiques intervenant dans l'entrée de calcium en modulant le potentiel de membrane de la cellule et en favorisant la force électromotrice pour le calcium.

III- Les canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie calcique intracellulaire

A- Les canaux calciques

1- Généralités

Les canaux calciques forment des pores permettant le passage rapide et sélectif d'ions calcium au travers de la membrane plasmique. Le flux d'ions au travers de ces canaux, qui est fonction du gradient électrochimique, crée un courant calcique. Dans la mesure où les ions calcium sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule, l'ouverture des canaux calciques résulte donc en un influx d'ions calcium dans la cellule ; cet influx participant à la dépolarisation de celle-ci. L'ouverture des canaux ioniques est conditionnée par un effecteur primaire qui définit la famille d'appartenance de chacune des classes de canaux ioniques. En l'occurrence l'effecteur primaire des canaux ioniques activés par la dépolarisation membranaire est *le voltage*. L'activation d'un canal ionique résulte en un changement de conformation de la protéine qui conditionne les transitions entre l'état fermé et l'état ouvert du canal. Les canaux activés par la dépolarisation membranaire fonctionnent donc comme des portails dont l'ouverture est finement régulée par le changement de polarité membranaire. Ils participent à la propagation de l'information électrique et à l'excitabilité cellulaire. Leurs rôles sont bien démontrés dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la contraction musculaire, l'activité pacemaker cardiaque, la neurotransmission, la sécrétion d'hormone et la prolifération cellulaire.

2- Les canaux calciques voltages-dépendants

Dans de nombreux cas les canaux Ca^{2+} sont activables par des variations de potentiel membranaire. Ce sont des canaux dits voltage-dépendants. Ces canaux sont présents aussi bien sur des cellules excitables que non excitables. Lorsque la membrane est à son potentiel de repos (-70 mV), les canaux calciques sont fermés; sous l'effet d'une dépolarisation, ces canaux s'ouvrent et le calcium entre dans la cellule suivant le gradient électrochimique. C'est une diffusion passive. Les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire, tout comme les canaux sodiques et potassiques forment une superfamille de protéines. Sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques, cette famille est subdivisée en deux classes (**Tableau 8**) : les canaux à « bas seuil d'activation » (**BSA**) activés par des valeurs de potentiel de membrane (V_m) faiblement négatives et les canaux à « haut seuil d'activation » (**HSA**)

activés par des valeurs de potentiel de membrane (V_m) fortement négatives. La classe des canaux BSA regroupe exclusivement les canaux de type T alors que la classe des canaux HSA comprend les canaux de type L, P/Q, N, et R. Nous détaillerons plus loin chacune de ces familles. Chacun de ces canaux présente des propriétés biophysiques et pharmacologiques propres. Au niveau structural, les canaux calciques voltages-dépendants se composent d'une sous unité principale α_1 , centrée autour de sous unités auxiliaires β , γ et $\alpha_2\delta$ (**Figure 18**) dont les principales fonctions sont de moduler l'expression membranaire de la sous unité α_1 , son comportement biophysique ainsi que ses propriétés pharmacologiques.

La diversité fonctionnelle des canaux ioniques activés par la dépolarisation membranaire est donc parallèle à la grande diversité de sous unités canalaire. Ces sous unités canalaire comportant quatre domaines transmembranaires. Les régions hydrophiliques N- et C-terminales, ainsi que celles reliant chaque domaine, sont intracellulaires et participent à la régulation de l'activité de ces canaux. Ces protéines canalaire jouent non seulement le rôle de pore du canal, mais comprennent également les sites de liaison des différents ligands de ces canaux (ex. les dihydropyridines -DHP- pour les canaux calciques). Les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire sont codés par dix gènes qui s'organisent en trois sous-familles phylogénétiquement distinctes :

- Une première famille comprend les canaux à **haut seuil d'activation de type L** (Ca_v1), sensibles aux DHP pour lesquels les produits de quatre gènes ont été identifiés : les sous unités α_{1C} , α_{1D} , α_{1S} -la première sous unité clonée- et la sous unité α_{1F} identifiée lors du séquençage d'un cosmide couvrant le chromosome X en Xp11. La sous unité α_{1F} est homologue à α_{1D} .
- Une deuxième famille correspond aux canaux à **haut seuil d'activation dits "neuronaux"** (type non-L; Ca_v2) générés par les sous unités α_{1A} , α_{1B} , et α_{1E} qui codent respectivement pour les canaux de type P et Q, de type N et de type R (pour revue, Catterall, 2000).
- Une troisième famille correspond **aux canaux à bas seuil d'activation** (ou type T pour transitoire; Ca_v3). Les trois sous unités codant pour des canaux de type T, α_{1G} , α_{1H} , et α_{1I} , ont été clonées grâce à une stratégie de criblage bioinformatique permettant d'identifier de nouvelles séquences faiblement homologues à celles isolées auparavant (pour revue, (Chemin et al., 2001).

Sous unité α_1 Haut Seuil d'Activation (HSA)	Courant	Pharmacologie	Localisation tissulaire
α_{1S} ($Ca_v1.1$) α_{1C} ($Ca_v1.2$) α_{1D} ($Ca_v1.3$) α_{1F} ($Ca_v1.4$) α_{1A} ($Ca_v2.1$)	Type L	Dihydropyridine Phénylalkylamines Benzothiazépines	Muscle squelettique Neurones, cœur, muscle lisse Neurone, cœur, cellule endocrine Rétine
	Type P/Q	ω -agatoxine IIIA ω -conotoxine GVIA/MVIA	Neurone, cellules pancréatiques β
α_{1B} ($Ca_v2.2$)	Type N	ω -agatoxine (IVA/IIIA) ω -conotoxine MVIIIC	Neurone
α_{1E} ($Ca_v2.3$)	Type R	Nickel, Cadmium	Neurone, cellule endocrine
Sous unité α_1 Bas Seuil d'Activation (BSA)	Courant	Pharmacologie	Localisation tissulaire
α_{1G} ($Ca_v3.1$) α_{1H} ($Ca_v3.2$) α_{1I} ($Ca_v3.3$)	Type T	Benzimidazoles Amiloride Kurttoxine Nickel	Neurone, cœur, muscle lisse, cellule endocrine, spermatozoïde Neurone, cœur, muscle lisse, foie, cellule endocrine Neurone, spermatozoïde

Tableau 8: Classification moléculaire, pharmacologie et localisation tissulaire des canaux calciques voltage-dépendants.

De plus, l'épissage alternatif génère de nombreuses isoformes pour chacune de ces sous unités. Les canaux calciques comprennent également des sous unités auxiliaires qui jouent un rôle régulateur très important sur l'activité de ces canaux. C'est le cas en particulier des sous unités β des canaux calciques activés pour de fortes dépolarisations membranaires ("haut seuil" ou HVA pour *high-voltage-activated* : Ca_v1 et Ca_v2), qui contrôlent l'adressage membranaire, les cinétiques d'activation et d'inactivation ou encore les propriétés d'activation et d'inactivation à l'équilibre de ces canaux. De nombreuses sous-unités régulatrices des canaux calciques ont été clonées. A l'heure actuelle, ont été identifiés : 1) 4 gènes codant pour des sous-unités β , 2) 3 gènes codant pour des sous-unités α_2 - δ , 3) 8 gènes codant pour des sous-unités γ (pour revue, (Walker et al., 1998).

En résumé, les canaux calciques voltage-dépendants (HSA et BSA) se composent d'une sous unité principale α_1 (Figure 18, en bleu) formant le pore ionique. Elle se compose de quatre domaines (domaines I à IV) constitués chacun par six segments transmembranaires (S1 à S6). Ces quatre domaines sont reliés entre eux par des boucles cytoplasmiques reliant les domaines I à II (boucle I-II), II à III (boucle II-III) et III à IV (boucle III-IV). Les

segments S4, riches en résidus basiques arginines et lysines, constituent le senseur de voltage (« voltage sensor »). Les boucles extracellulaires et transmembranaires reliant les segments S5 et S6 (boucles P, en rouge) forment le pore ionique. L'insert représente l'organisation « tridimensionnelle » de cette sous unité α_1 . Les sous unités régulatrices des canaux HSA sont également représentées. Ces sous unités auxiliaires modulent les propriétés biophysiques de la sous unité α_1 . La sous unité β (Figure 18, en rouge) est entièrement cytoplasmique et interagit avec la sous unité α_1 *via* une séquence AID présente sur la boucle I-II. La sous-unité γ (Figure 18, en orange) est entièrement membranaire et glycosylée. La sous-unité $\alpha_2\delta$ (Figure 18, en vert) est essentiellement extracellulaire et ancrée à la membrane plasmique (MP) par la partie δ de la protéine. Les parties α_2 et δ sont reliées entre elles *via* deux ponts disulfures.

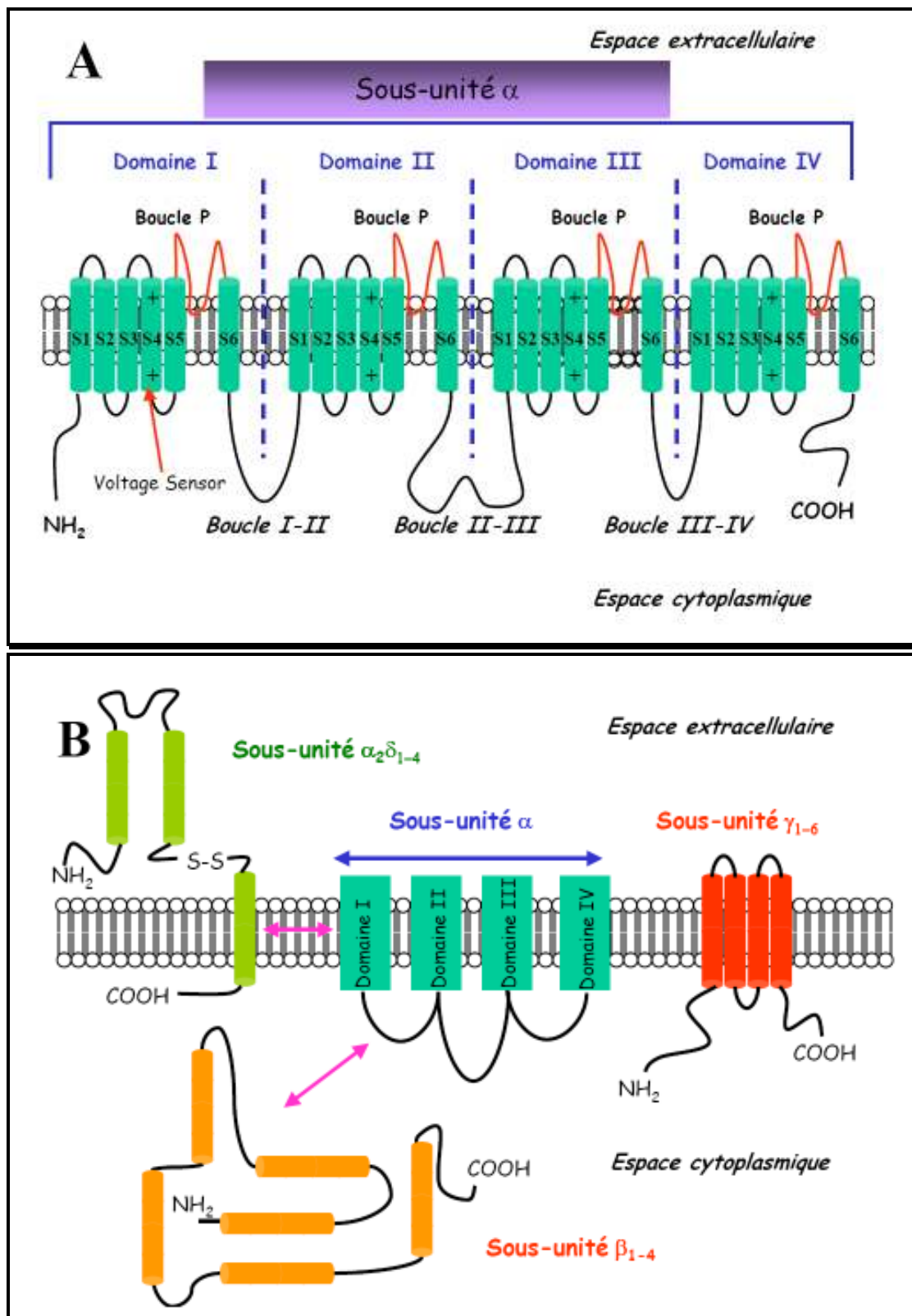


Figure 18. Organisation membranaire des canaux calciques dépendants du voltage (A) et des sous unités régulatrices (α (en vert), β (en rouge) et γ (en orange)) (B). *S-S*: pont disulfure ; *NH₂*: extrémité aminoterminal ; *COOH*: extrémité carboxyterminale.

3-Les canaux calciques voltages indépendants

3.1- Canaux calciques chimio-dépendants : ROC et SOC.

Malgré d'intenses efforts de recherche, la nature moléculaire des canaux SOC's ainsi que celle des canaux couplés par exemple aux protéines G ou à l'ATP (canaux purinergiques), de type ROC's, s'avèrent difficile à établir. Les membres de la famille de canaux TRP (« Transient Receptor Potential ») sont actuellement les meilleurs candidats pour remplir ces deux fonctions.

3.2- Les canaux TRP : Généralité

Le terme TRP a été initialement utilisé pour caractériser un mutant de drosophile montrant une réponse de photo-transduction perturbée (Minke et al., 1977). Actuellement 28 membres de la superfamille TRP ont été identifiés chez les mammifères et sont classés dans six familles différentes : **TRPC** pour « Canonical », **TRPV** pour « Vanilloid », **TRPM** pour « Melastanin », **TRPML** pour « Mucolipins », **TRPP** pour « Poycystins » et **TRPA** pour « Ankirin Transmembran Protein ». Ce sont des homotétramères ou des hétérotétramères dont chaque sous unité est composée de six segments transmembranaires (**Figure 19**). La boucle entre les segments 5 et 6 forme le pore du canal. Les canaux TRP sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques dont la liste est régulièrement mise à jour (Owsianik et al., 2006) ; ces canaux sont notamment impliqués dans la thermosensation (TRPV1 à V4, TRPM8, TRPA1), dans la mécanosensation (TRPV4, TRPML3), ou encore dans la gustation (TRPV5).

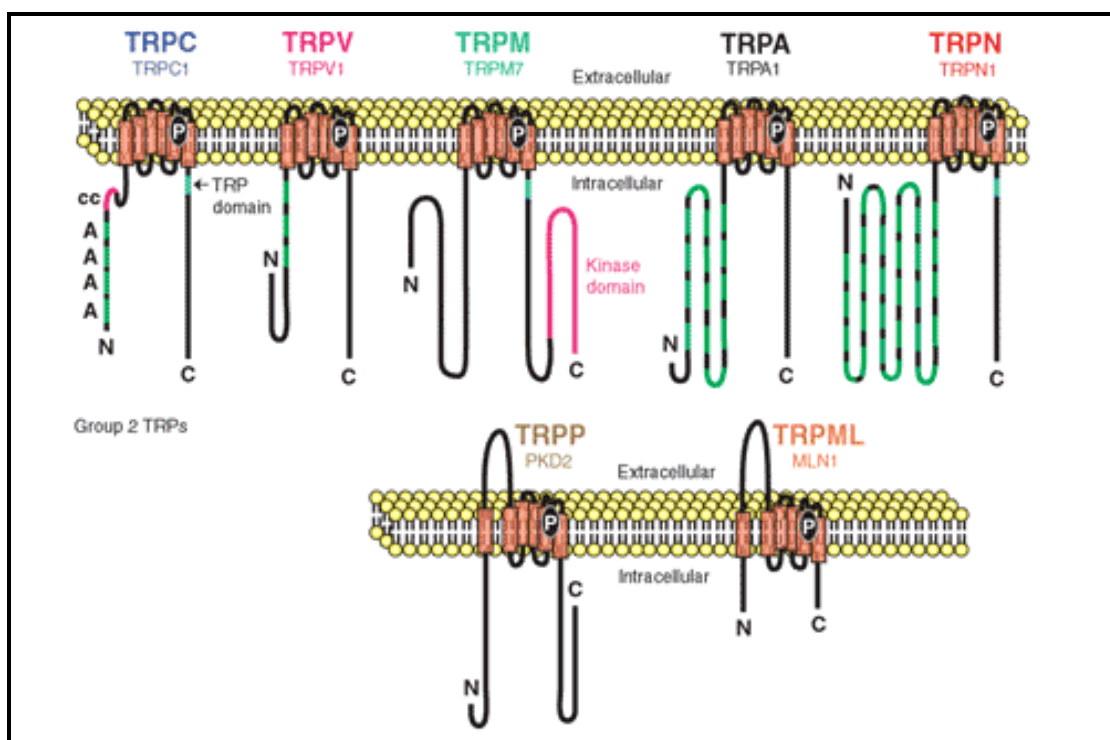


Figure 19: Structure générale des canaux constituant la famille des TRP. Plusieurs domaines sont indiqués : (A) répétitions d'ankyrines ; (cc) « coiled coil domain », « Protein kinase domain » (uniquement pour les canaux TRPM6 et TRPM7).

3.3- Diversité moléculaire des canaux TRP : TRPC (Canonical)/ TRPM (Melastatin)/ TRPV (Vanilloid)/ TRPN (AnkTM1)/ TRPP (Polycystin)/ TRPML (Mucolipins) et TRPA (Ankyrine)

Les membres de la superfamille des canaux cationiques TRP possèdent un haut degré de conservation chez tous les organismes métazoaires qui furent soumis au séquençage génomique. Actuellement, chez les Mammifères, cette famille de gènes codant les protéines TRP regroupe à présent 28 membres (Birbaumer et al., 2003). Toutes ces protéines sont similaires sur le plan structural à la protéine TRP de la drosophile. Sur la base de l'analyse de la séquence primaire, ces canaux sont classiquement regroupés en six sous-familles : TRPC (1-7) pour Canonique ou Classique en raison de leur forte homologie avec la protéine TRP chez la drosophile ; TRPV (1-6) en référence au premier membre de cette famille (TRPV1 ou récepteur aux Vanilloïdes) qui fut identifié comme un canal activé par le principal composant irritant du piment rouge, la capsaïcine ; TRPM (1-8) en référence également au premier membre de cette famille (TRPM1 ou Mélastatine) qui fut initialement cloné comme un gène réprimé dans une lignée cellulaire murine de mélanome ; TRPML pour les mucolipines ; TRPP (1-5) issus à l'origine de deux gènes *polycystic kidney diseases 1* et 2 (PDK1 pour TRPP1, et PDK2 pour TRPP2) regroupe actuellement cinq membres chez l'Homme ; et enfin,

TRPN (TRPA1 ou ANKTM1) qui ne comprend actuellement qu'un seul membre chez l'Homme et se distingue des autres TRP par la présence au niveau du domaine N-terminal de plusieurs domaines ankyrine répétés (Montell, 2003).

3.4- Fonctions et rôles des canaux TRP dans la physiologie et la physiopathologie cellulaire

De nombreux travaux indiquent que les canaux cationiques non voltage-dépendants de la famille TRP sont des acteurs clefs de l'homéostasie calcique (Clapham et al., 2001; Montell, 2001). Des études ont également suggéré une implication de l'homéostasie calcique dans les mécanismes de cancérisation et d'évolution des cancers (Vanden Abeele et al., 2003); (Thebault et al., 2003). **Les canaux TRP pourraient donc jouer un rôle clef dans la progression du cancer. Ceci semble être le cas pour un canal de la sous-famille V, le canal TRPV6, dans le cancer de la prostate.**

L'étude de la (des) fonction (s) des canaux TRP dans la physiologie cellulaire fait l'objet de nombreux travaux actuels et a permis d'identifier de nombreux rôles de ces canaux dans la physiologie et la physiopathologie de la cellule. Il a par ailleurs été démontré que des altérations fonctionnelles de ces canaux ainsi que des variations quantitatives de leur expression peuvent perturber la physiologie de la cellule jusqu'à l'apparition de pathologies.

a. Les canaux TRPV

Quatre membres de la famille des canaux TRPV (TRPV1-4) fonctionnent en tant que détecteurs de chaleur ($T \geq 37^{\circ}\text{C}$). Exprimé dans les petits neurones sensoriels, TRPV1 s'active rapidement pour des températures avoisinant les 43°C et est sensible aux composés vanilloïdes alors que TRPV2, présent dans les grands neurones sensoriels est actif pour des températures nocives supérieures à 53°C . TRPV3, principalement exprimé dans le système nerveux central, les neurones sensoriels et les kératinocytes, est sensible à la température à des seuils inférieurs à ceux observés pour TRPV1 et 2 (entre 22 et 40°C). TRPV4 constitue un canal sensible à de faibles variations de température ainsi qu'à des changements d'osmolarité (Benham et al., 2003; Caterina et al., 2000). Son activation semble dépendre de sa localisation et d'un (de) messenger(s) intracellulaire (Watanabe et al., 2002a; Watanabe et al., 2002b). Les canaux TRPV2, TRPV3 et TRPV4 ont été isolés de par leur forte homologie de séquence par rapport à TRP-V1. Leurs modes d'activation sont divers mais semblent tous en relation avec les mécanismes de perception sensorielle tels que la thermoception (TRPV1, V2 et V3) ou l'osmoception (TRPV4). De plus il apparaît que ces canaux peuvent être activés par différents

types d'acides gras intracellulaires tels que l'anandamide pour TRPV1 ou l'acide epoxyeicosatrienoïque, un produit de dégradation de l'anandamide. Néanmoins les mécanismes moléculaires permettant à ces molécules d'ouvrir ces canaux restent encore à élucider. TRPV5 et TRPV6 sont des membres plus éloignés des précédents. Ils forment des canaux hautement sélectifs pour le calcium découverts initialement dans les épithélia intestinaux, rénaux et placentaire où ils permettraient la réabsorption de calcium (Gunthorpe et al., 2002; Hoenderop et al., 2001; Peng et al., 1999).

Le canal TRPV6 est codé par le gène *trpv6* humain qui est localisé sur le chromosome 7q33-34. La protéine formant le canal TRPV6 est constituée de 725 acides aminés ; elle présente comme la plupart des protéines TRP, 6 régions transmembranaires et des extrémités amino et carboxy terminales intracellulaires (Figure 20).

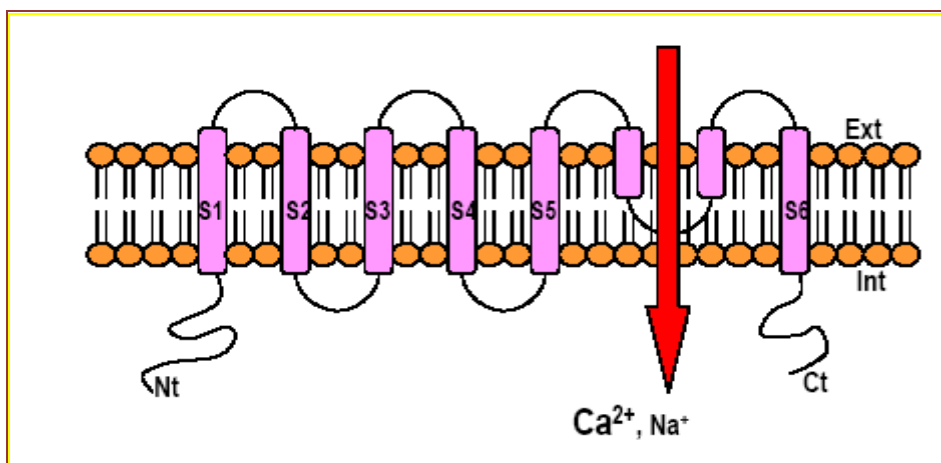


Figure 20: Représentation schématique de la structure générale d'un monomère de TRP : 6 segments transmembranaires, les deux boucles terminales sont cytosoliques, le pore ionique se situe entre les derniers segments transmembranaires.

Le canal TRPV6 est principalement exprimé dans des épithéliums impliqués dans le transport du calcium et joue un rôle très important dans l'absorption du calcium par les intestins et les reins (den Dekker et al., 2003). Situé dans la membrane plasmique (Peng et al., 2003), ce canal est caractérisé par une forte sélectivité au calcium ((Perméabilité au calcium/ Perméabilité au sodium > 100), c'est à dire que le canal laisse passer 100 ions calcium pour 1 ion sodium). Dans les conditions physiologiques, TRPV6 est constitutivement actif (Vennekens et al., 2000), c'est à dire que le canal, lorsqu'il est exprimé à la membrane, est activé en absence de stimulus et permet une entrée de calcium. Des sites de fixation de la protéine calmoduline (CaM) existent dans la séquence de TRPV6. La CaM est connue pour jouer un rôle régulateur dans l'activité du canal TRPV6 dans des modèles d'expression hétérologue (Lambers et al., 2004; Niemeyer et al., 2001a). Plusieurs sites putatifs de

phosphorylation par la kinase A (PKA), la protéine kinase C (PKC) ont également été identifiés dans la séquence de TRPV6, ce qui pourrait influencer la probabilité d'ouverture de ce canal.

b. Les canaux TRPN, TRPML, TRPP1 et TRPP2.

Exprimé dans les neurones sensoriels, le canal TRPN (ou TRPA1) est décrit comme sensible aux températures froides (<15°C) et est activé par des agents inflammatoires tels que des cannabinoïdes (Bandell et al., 2004). De plus, TRPN pourrait remplir la fonction de ROC couplé à la PLC. Une nouvelle fonction de TRPN en tant que mécano-transducteur dans l'audition a récemment été suggérée (Jordt et al., 2004; Story et al., 2003). Malgré ces nombreuses et diverses fonctions, TRPN n'est pour l'instant pas impliqué dans des processus pathologiques.

Les trois membres chez les mammifères, TRPML 1-3 sont relativement courts, moins de 600 acides aminés. TRPML1 inclut un domaine lipase. Constitutivement actifs, ces canaux voient leur activité augmentée par le Ca^{2+} , inhibée par l'acidose et bloquée par l'amiloride. Ils sont nécessaires pour la formation et le recyclage des lysosomes. TRPML2 et TRPML3 sont peu caractérisés. TRPML3 serait important pour la maturation des cellules ciliaires ainsi que pour le transport des vésicules intracellulaires.

La mucopolidose de type IV est une maladie neurodégénérative résultant d'un défaut de stockage des lysosomes. Une analyse des mutations responsables de cette pathologie a révélé un gène codant une protéine, nommée mucolipin1, appartenant à la famille des mucolipines dont la fonction demeure inconnue. La mucolipin1 présente de nombreuses homologies avec les canaux TRPML (Minke and Selinger, 1996); (Xu et al., 2000); (Bach, 2001).

La famille des canaux TRPP (Polycystine) comprend deux groupes, les canaux PKD1 (*polycystic kidney disease 1*)-like - TRPP1-like, incluant TRPP1, PKDREJ, PKD1L1, PKD1L2 et PKD1L3 ainsi que les PKD2 (*polycystic kidney disease 2*)-like - TRPP2-like incluant PKD2, PKD2L1 et PKD2L2 aujourd'hui renommés TRPP2, TRPP3 et TRPP5 respectivement. Ces deux groupes sont structurellement très différents. TRPP1 comprend 11 segments transmembranaires, un très long domaine extracellulaire et un domaine carboxy-terminal qui interagit avec celui de TRPP2. Très probablement ces deux protéines doivent être couplées pour former un canal actif. TRPP2 est nécessaire pour les mouvements ciliaires et est impliqué dans le développement du cœur, des muscles squelettiques et des reins. TRPP3 est impliqué dans le développement de la rétine et des poils.

Les canaux TRPP1 et P2 ont été clonés à l'origine comme des gènes responsables d'une maladie familiale autosomique dominante affectant les reins (Birnbaumer et al., 2003; Veldhuisen et al., 1999). Des altérations de TRPP2 affectent également le développement embryonnaire murin (Pennekamp et al., 2002).

c. Les canaux TRPC

Le clonage des gènes TRP de *Drosophila* a conduit à l'identification de canaux homologues chez les vertébrés. Ces canaux ont été appelés TRP-C (C pour classique). A l'heure actuelle, sept gènes codant pour des canaux TRP-C ont été identifiés et il est probable qu'ils représentent tous les gènes de cette classe. Cette famille est subdivisée en TRPC1, TRPC2, TRPC3/6/7 et TRPC4/5. Ces canaux sont tous activés en réponse à une stimulation des récepteurs activant diverses isoformes de la phospholipase C, PLC, et sont notablement modulés par la calmoduline et diverses autres protéines fixant le Ca^{2+} (Zhu, 2005). Typiquement les canaux TRPC3/6/7 sont activés plus spécifiquement par le diacylglycérol, DAG, tandis que le mécanisme d'activation des TRPC1/4/5 par la PLC reste controversé (Figure 21).

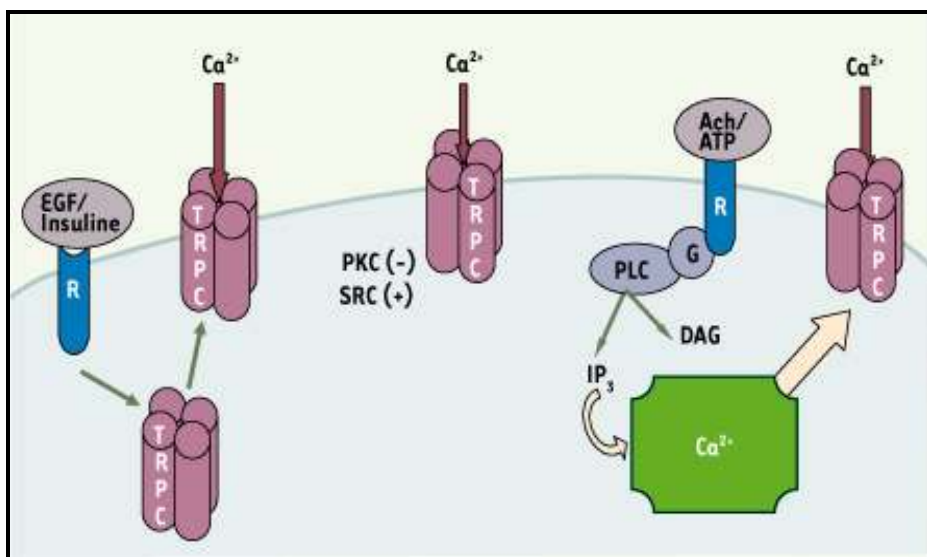


Figure 21 : Mécanismes d'activation des canaux TRPC. L'activité de ces canaux, perméables au Ca^{2+} et aux autres cations, peut être accrue au moins potentiellement de trois façons : (1) par une voie de transduction du signal impliquant la PLC et la production de DAG à la suite de la stimulation de divers récepteurs (muscariniques, purinergiques, etc.) et médiée par une protéine G ; (2) par translocation suite à l'activation de récepteurs sensibles à l'EGF et à l'insuline (à gauche), et (3) par la vidange des réservoirs calciques intracellulaires (à droite) (source : www.edk.fr/reserve/revues/ms_papier).

Il a été suggéré que tous ces canaux canoniques sont activés par la déplétion des réservoirs du Ca^{2+} intracellulaire (Vazquez et al., 2004). De plus, le canal TRPC1 est identifié comme un composant des canaux sensibles à l'étirement chez les vertébrés. TRPC1, en particulier, pourrait être associé à Orai1 (protéine responsable de l'entrée capacitive de Ca^{2+} . Protéine constitutive de la membrane plasmique de 33 kDa, ayant 4 domaines transmembranaires qui peuvent former un canal) et former un complexe TRPC1-Orai1-STIM1 (*stromal interacting molecule*, protéine constitutive de la membrane du réticulum endoplasmique de 77 kDa, ayant un seul domaine transmembranaire, et sans séquence de type canal ionique) contribuant à la fonction SOC (Ambudkar et al., 2007). TRPC6 a été la première protéine de cette famille dont on a démontré qu'elle était un élément essentiel de l'activation des canaux cationiques non sélectifs activés par la stimulation α_1 -adrénergique précédemment décrite dans le muscle lisse de la veine porte du lapin (Inoue et al., 2006). Le même rôle est dévolu à TRPC3 dans l'artère de l'oreille tandis que, dans ce même tissu, l'angiotensine active les canaux TRPC1 et TRPC6 par des voies spécifiques de transduction du signal, respectivement dépendantes ou non de la PKC (Saleh et al., 2006). Enfin, l'insuline induit la translocation de TRPC3 dans les cardiomyocytes ventriculaires de souris tandis que cet effet apparaît nettement réduit dans un modèle de souris diabétique, *ob/ob* (Fauconnier et al., 2007). TRPC3 est colocalisé avec VAMP2 (*vesicle-associated membrane protein 2*), une protéine SNARE qui régulerait l'expression à la surface de TRPC3 lors d'une stimulation par un agoniste (Eder et al., 2007; Lemonnier et al., 2006; Singh et al., 2004). Ces canaux TRPC peu sélectifs permettent aussi une entrée de Na^+ . Les modifications du gradient sodique vont interférer avec la distribution des ions Ca^{2+} notamment par l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Ainsi une modeste élévation du Na^+ associée à une faible dépolarisation peut être suffisante pour induire une entrée de Ca^{2+} . De plus, il apparaît que le TRPC3 et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ forment un complexe protéique activable par la PLC dans les cardiomyocytes de rat (Eder et al., 2007). De façon similaire, l'association étroite de TRPC7, ré-exprimé dans des cellules HEK, avec la pompe calcique du réticulum sarcoplasmique, SERCA, permet un contrôle local de la concentration calcique et prévient l'inhibition du canal par les ions Ca^{2+} entrant par ce canal lors de son activation (Lemonnier et al., 2006).

d. Les canaux TRPM.

Les canaux TRP-**M** tiennent leurs noms du canal TRP-M1 ou **m**élastatine. Ce canal a été initialement isolé lors d'un criblage différentiel de gènes dont l'expression décroît dans les mélanomes. Il existe 8 membres dans cette famille (TRP-M1 à TRP-M8) qui peuvent être

sous divisés en 4 sous-groupes sur des critères d'homologie de séquence. Les TRP-M sont des protéines beaucoup plus grosses que les autres TRP (plus de 1000 et jusqu'à 2000 acides aminés contre 400 à 700 pour les autres familles). Leurs modes d'activation sont très variés. Par exemple le canal TRP-M2 est activé par l'ADP-ribose intracellulaire tandis que le canal TRP-M8, son plus proche homologue, est activé par le froid et le menthol. Il est à noter que les canaux TRP-M2 et TRP-M7 possèdent dans leurs extrémités carboxyterminales une région à activité enzymatique. Ainsi TRP-M7 possède aussi une activité kinase qui intervient par un mécanisme d'autophosphorylation dans l'activation du canal. TRPM4 quant à lui est un canal cationique non perméable au calcium, activé par une élévation du calcium intracellulaire.

TRPM2 est un canal calcique qui possède une activité ADP-ribose pyrophosphatase (Perraud et al., 2001) et qui est sensible au nicotinamide adenine dinucleotide (NAD). L'activité de TRPM2 est régulée par les voies de signalisation du peroxyde d'hydrogène et du TNF α ce qui suggère que ce canal détecte des changements de l'équilibre d'oxydo-réduction dans la cellule et qu'il participe au stress oxydant dans les polynucléaires neutrophiles (Perraud et al., 2001; Perraud et al., 2004). Il a été démontré que le canal TRPM2 est impliqué dans l'apoptose (Yang et al., 2006; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2006).

TRPM1 est largement exprimé dans les tissus sains bien qu'il ait été initialement décrit comme un suppresseur de tumeur potentiel dans le mélanome (Miller et al., 2004). Ses propriétés électrophysiologiques sont inconnues à l'heure actuelle. La fonction de TRPM3, constitutivement actif dans les systèmes de surexpression et sensible à l'osmolarité, est également peu connue (Grimm et al., 2003; Lee et al., 2003). TRPM4 est exprimé dans le rein et le système nerveux central. Avec TRPM5, ce sont les seuls canaux TRP sélectifs aux monovalents (Hofmann et al., 2003; Launay et al., 2002). TRPM5 a été décrit comme un canal permettant la transduction du goût (sucré, salé, saveur). Toutefois, bien que sa présence dans l'estomac, l'intestin grêle et le pancréas demeure inexploquée, il existerait un lien fonctionnel entre TRPM5 et le syndrome de Beckwith-Wiedemann (Prawitt et al., 2000; Prawitt et al., 2003; Zhang et al., 2003b).

Dans les neurones sensoriels et les nocicepteurs, TRPM8 a été décrit comme canal sensible aux températures froides (<25°C~30°C) et à des agents mimant le froid tels que le menthol et l'iciline. Toutefois, la distribution tissulaire de TRPM8 suggère que ce canal est plus qu'un senseur de la température. Toutefois, TRPM8 est présent dans la prostate est un organe. Or la prostate n'est pas sujet aux variations de température décrites comme

activatrices de TRPM8. Bien que TRPM8 fasse l'objet de nombreuses études, sa fonction prostatique reste inconnue.

Comme nous venons de le voir, la famille des canaux TRP constitue un remarquable ensemble de canaux se caractérisant par une extrême diversité tant au niveau de leurs fonctions que de leurs rôles dans la physiopathologie cellulaire (Figure 22). Récemment, plusieurs travaux ont reporté que cette diversité fonctionnelle des canaux TRP est notamment sous-tendue par des modes d'activation particuliers ainsi que par une régulation précise de leur activité.

e- Les canaux TRPA

Les canaux TRP-A tiennent leurs noms d'Ankyrine. Le seul représentant de cette famille chez les mammifères, TRPA, est activé par le froid intense et par les substances « piquantes » contenant de l'isothiocyanate et de l'allicine, comme l'ail et l'oignon, ainsi que par l'élément psychoactif de la marijuana ; mais il est insensible au menthol et à la capsaïcine. Il serait aussi responsable de la transduction mécanosensible impliquée dans la réponse auditive des mammifères.

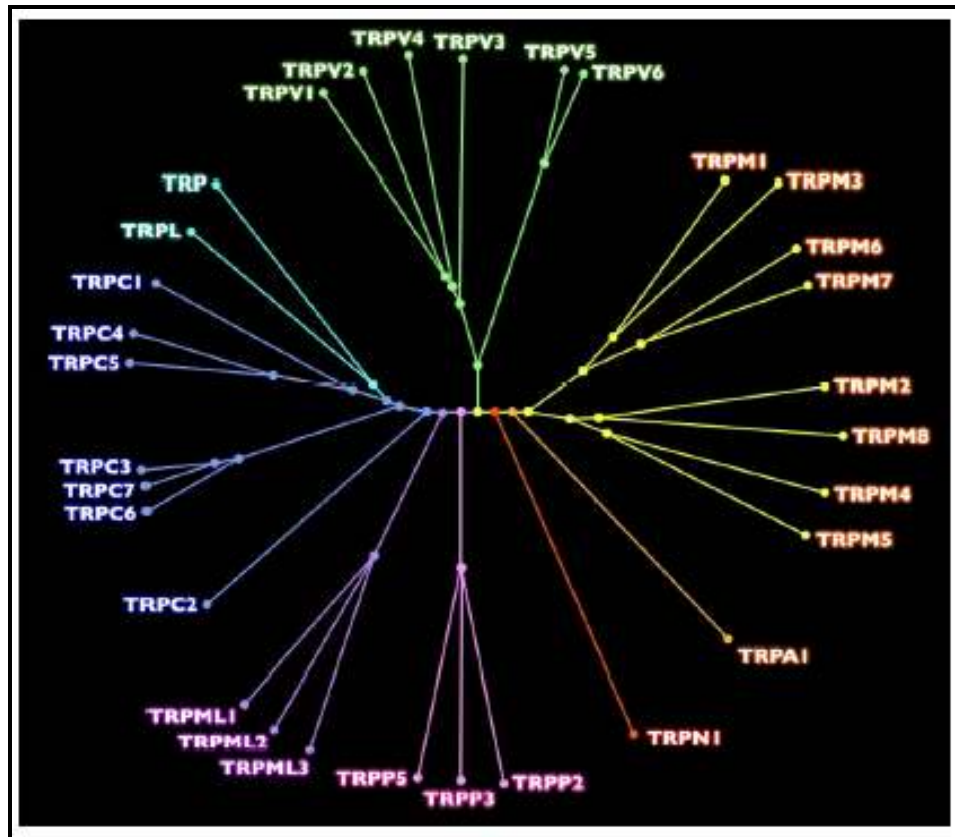


Figure 22 : Arbre phylogénétique de la famille des canaux TRP humains. (Le gène humain codant pour le canal TRP-C2 étant un pseudogène, son orthologue murin a été utilisé). Sur un critère d'homologie les canaux TRP ont été regroupés en trois sous-familles : Les TRP-C pour "classique", les TRP-V pour "vanilloïde", et les TRP-M pour "Mélastatine".

3.5- Les protéines STIM et Orai.

Des données obtenues au niveau des différents systèmes cellulaires suggèrent que les canaux cationiques de la famille des TRP ne peuvent à eux seuls assurer les courants SOC. Il a été récemment démontré que l'intervention des canaux calciques dans le courant SOC ne se limite pas à la famille des TRP. En effet, deux protéines, STIM (Stroma Interacting Molecule) (Liou et al., 2005) et Orai ou CRACM (Calcium Release-Activated Channel Modulator) (Feske et al., 2006), ont été récemment identifiées et leur participation dans le courant calcique de type SOC a été mise en évidence (**Figure 23**). Deux isoformes de la protéine STIM sont actuellement connues (STM1 et STM2). Ce sont des protéines à un domaine transmembranaire localisées dans la membrane du réticulum. Des travaux récents montrent que STIM1 peut jouer le rôle d'un « sensor de calcium » dans le réticulum et participer dans les voies de signalisation conduisant à l'activation des canaux SOC. D'autres auteurs suggèrent une localisation sous-membranaire de la STIM1 suite à la vidange des stocks

calciques intracellulaires (Liou et al., 2005). Quant à la protéine STIM2, son rôle dans la modulation du courant SOC reste encore controversé dans les différents systèmes cellulaires étudiés jusqu'à ce jour. D'après les auteurs (Soboloff et al., 2006), STIM2 joue le rôle d'inhibiteur du courant SOC induit par STIM1.

Quant aux protéines Orai (CRACM), ce sont des protéines membranaires à 4 domaines transmembranaires avec des extrémités N- et C-terminales intracellulaires avec un supposé « pore » situé entre les segments transmembranaires TM2 et TM3 (Feske et al., 2006). Trois isoformes de cette famille sont actuellement connues : Orai1, Orai2 et Orai3 (ces protéines étant nommées d'après les trois gardiens de la porte du paradis dans la mythologie grec). La protéine Orai1 a été identifiée par Feske et al. (2006) (Feske et al., 2006) par un screening combiné de l'utilisation des ARN interférents et l'étude des mutations géniques chez les patients atteints d'une immunodéficience sévère. Cette pathologie était associée à une non-fonctionnalité des canaux ioniques impliqués dans le courant CRAC dans les lymphocytes T. Des travaux récents montrent que STIM1 et Orai1 jouent un rôle important dans le contrôle du courant CRAC (Feske et al., 2006; Liou et al., 2005). D'autres auteurs ont montré que STIM1 et Orai1 interagissent fonctionnellement pour moduler le courant CRAC, le canal calcique dans ce système étant constitué d'Orai1 (Peinelt et al., 2006). En appui à ces observations, Mercer et al. (2006) (Mercer et al., 2006) ont montré que dans les cellules surexprimant STIM1 ou Orai1, l'entrée capacitive de calcium reste inchangée comparées aux cellules non-transfectées alors que dans les cellules co-exprimant STIM1 et Orai1, cette entrée capacitive de calcium est amplifiée de 400%. Par ailleurs, Huang et al. (2006) (Huang et al., 2006) ont montré que STIM1 pouvait également s'associer avec l'extrémité C-terminale de TRPC1 et moduler ainsi les courants CRAC et SOC endogènes suggérant une interdépendance entre cette nouvelle voie de signalisation impliquée dans le SOC et celles impliquant les protéines de type TRP. Reste à savoir si la prédominance de ces différentes voies dépend des types cellulaires et/ou de la physiologie ou la physiopathologie des cellules considérées.

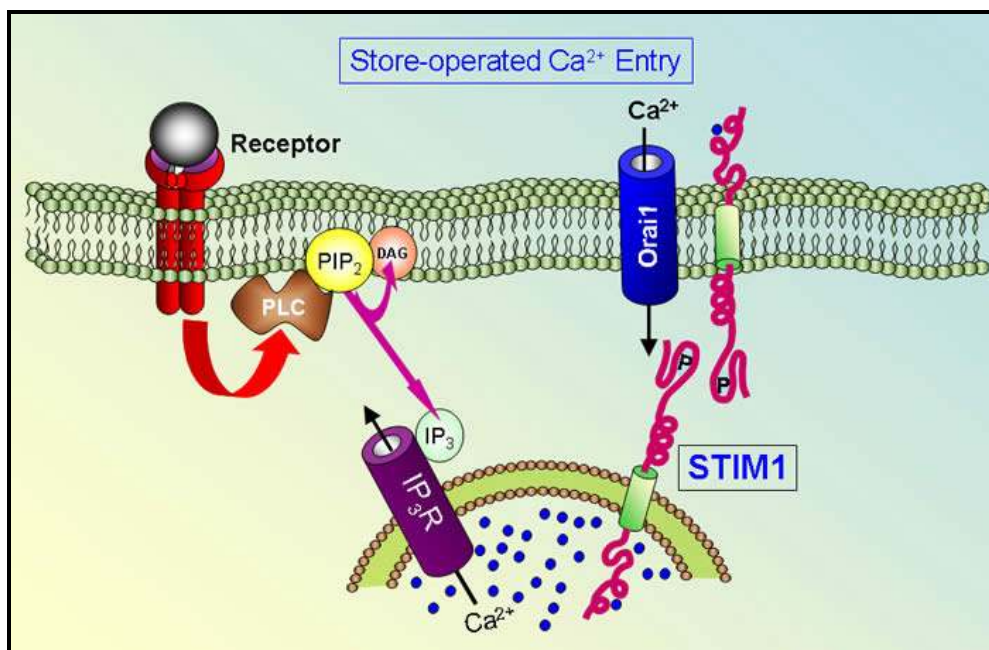


Figure 23: Implication des protéines STIM1 et Orai1 dans le courant SOC (Store Operated Channel).

Des études indiquent que des altérations d'expression des canaux ioniques pourraient jouer un rôle dans l'oncogenèse. Ainsi, les variations quantitatives et/ou fonctionnelles de canaux ioniques perturbent l'état physiologique de la cellule et peuvent mener à l'incidence d'une pathologie appelée canalopathie (Niemeyer et al., 2001b). Ces canalopathies attirent aujourd'hui de plus en plus l'attention des chercheurs et des cliniciens car ces pathologies imputables aux canaux ioniques sont responsables notamment de la mucoviscidose, de certaines myotonies, de syndromes d'hypocalcémies, de développements tumorales ou d'hypertensions.

Les canaux ioniques représentent de bonnes cibles pharmacologiques potentielles en raison de leur localisation à la surface cellulaire, où ils peuvent aisément être accessibles par les médicaments. De plus, la localisation tissu-spécifique de ces canaux et leur structure variable pourrait rendre le traitement des canalopathies possible, sans effets considérables sur les autres organes.

4- Les canaux calciques et le cancer

Plusieurs travaux récents ont montré que les changements de l'expression des canaux calciques de type TRP jouaient un rôle important dans de nombreuses maladies (Kiselyov et al., 2007) telles que le cancer ([Tableau 9](#)).

TRP	Gène humain	Localisation chromosomique	Maladies associées	Référence bibliographiques
TRPC6	<i>TRPC6</i>	11q21-q22	Cancer de la prostate, du sein	(Thebault et al., 2006) (Guilbert et al., 2008)
TRPV6	<i>TRPV6</i>	7q33-q34	Cancer de la prostate	(Wissenbach et al., 2004) (Peng et al., 2001)
TRPM1	<i>TRPM1</i>	15q13-q14	Mélanome cutané	(Fang and Setaluri, 2000) (Duncan et al., 1998)
TRPM8	<i>TRPM8</i>	2q37.1	Cancer de la prostate, du sein, du colon, du poumon et de la peau	(Zhang and Barritt, 2004; Zhang and Barritt, 2006) (Fuessel et al., 2003) (Tsavaler et al., 2001b)

Tableau 9 : Liste non exhaustive de l'implication des canaux TRP dans le cancer (*Source : « TRPpathies » Kiselyov K et al., 2007- Review*)

La première preuve que l'expression des canaux de type TRP est corrélée avec certains types de cancers est venue de l'analyse de l'expression du canal TRPM1. L'expression du gène TRPM1 est inversement corrélée avec l'agressivité des cellules malignes de mélanome, ce qui pourraient refléter les capacités de TRPM1 à agir comme un gène suppresseur des tumeurs (Duncan et al., 1998 ; Fang et Setaluri, 2000). Récemment, il a été montré que cette diminution d'expression est due à la régulation transcriptionnelle par le MITF, facteur essentiel dans la transcription de mélanocyte (Zhiqu et al., 2004).

Un deuxième membre de la famille de TRPM, le gène TRPM5 serait responsable du syndrome de Beckwith-Wiedemann, une maladie impliquée dans une prédisposition aux tumeurs d'enfance (Prawitt et al., 2000). Le canal TRPM1 serait impliqué dans le mélanome (Duncan et al., 1998). TRPM1 est largement exprimé dans les tissus sains bien qu'il ait été initialement décrit comme un suppresseur de tumeur potentiel dans le mélanome (Miller et al., 2004). Ses propriétés électrophysiologiques sont inconnues à l'heure actuelle. Le dernier membre de la famille TRPM fait l'objet d'intenses investigations car il est exprimé dans plusieurs tumeurs, notamment celles de la prostate. En effet, en cherchant un nouveau marqueur pronostique du cancer de la prostate (Tsavaler et al., 2001a) ont découvert un nouveau canal calcique : TRPM8. D'après ces auteurs, contrairement à TRPV6, le gène *trpm8* n'est pas exprimé dans la prostate saine et hyperplasique mais serait exclusivement transcrit dans la prostate cancéreuse. De plus, il semblerait que sa spécificité d'expression soit identique à celle du Prostate Spécifique Antigen (PSA) (Fuessel et al., 2003). Le TRPM8 est à peine discernable dans le tissu sain prostatique (Tsavaler et al., 2001b). Une autre étude récente (Henshall et al., 2003) montre une augmentation importante de l'expression de *trpm8* dans les cancers prostatiques androgéno-dépendants, en revanche, l'expression de *trpm8* est

perdue dans les cancers prostatiques avancés androgéno-indépendants. TRPM8 est également exprimé dans les neurones sensoriels innervant la peau.

Le canal TRPV6 est fortement exprimé dans des stades avancés du cancer de la prostate avec peu ou pas d'expression dans le tissu sain et bénin (Bodding et al., 2003; Bodding et al., 2002; Fixemer et al., 2003; Lehen'kyi et al., 2007; Peng et al., 2001). De plus, une étroite corrélation entre une surexpression de l'ARNm des canaux de type TRPV6 et le degré de malignité des tumeurs a été démontrée (Wissenbach et al., 2004; Wissenbach et al., 2001). Dans ce cadre, les ARNm et/ou les protéines TRPV6 et TRPM8 pourraient être utilisés comme marqueurs pronostiques ou diagnostiques pour la détection des cancers épithéliaux.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, deux types de canaux ioniques membranaires peuvent intervenir dans l'entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire ; les canaux calciques, qui permettant l'entrée du calcium et les canaux potassiques intervenant dans l'entrée de calcium en modulant le potentiel de membrane de la cellule et en favorisant la force électromotrice pour le calcium.

B - Les canaux potassiques

Les canaux K^+ permettent la diffusion facilitée et sélective des ions potassiques à travers la membrane plasmique. Dans des conditions physiologiques, le flux est presque systématiquement dirigé vers l'extérieur et maintient le potentiel électrique de la membrane à une valeur proche de celle du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ($E_{K^+} : -80mV$). Il existe une grande diversité de canaux K^+ qui se distingue par différents mécanismes de modulation de leur activité. Cette diversité est à l'origine de nombreux rôles physiologiques : contrôle de l'homéostasie du K^+ , du volume cellulaire et de la sécrétion des hormones, contrôle de la forme et de la fréquence des potentiels d'action, de la réponse immunitaire et de la prolifération cellulaire, l'apoptose et la motilité cellulaire.

Les canaux K^+ sont des complexes protéiques multimériques composés de sous-unités membranaires α formant le pore ionique et de sous unités auxiliaires. Cet ensemble peut interagir lui-même avec des protéines de régulation (kinases, phosphatases, protéines G), de transport (protéines vésiculaires), d'adressage et du cytosquelette. La nature de ces protéines et leurs interactions déterminent les propriétés électrophysiologiques et la distribution subcellulaire de l'unité fonctionnelle ainsi formée. L'étude des canaux ioniques dans leur environnement natif par la technique du patch-clamp a révélé l'existence d'une grande diversité de courants K^+ aux propriétés fonctionnelles et pharmacologiques distinctes.

1- La superfamille des canaux potassiques : Généralités

Les canaux potassiques sont composés de protéines transmembranaires, les sous-unités α , et transportent sélectivement les ions potassium (K^+). Le contrôle et la modulation de l'activité de ces canaux ioniques résultent de la variation du potentiel transmembranaire, de l'action de messagers intracellulaires tels l'IP3, le DAG ou les protéines G, ainsi que de l'action de diverses substances telles que le calcium ou le magnésium. Cette activité peut être couplée à des récepteurs membranaires soit directement, soit *via* des messagers

intracellulaires. Comme nous le montrerons par la suite, les canaux K^+ présentent une grande diversité fonctionnelle et structurale.

Cette diversité fonctionnelle repose d'abord sur une grande diversité génique. Dans le génome humain, plus de 77 gènes codant des sous unités α ont été identifiés, faisant des canaux potassiques la classe des canaux ioniques où la diversité structurale et fonctionnelle est la plus importante (**Figure 24**). Ils jouent un rôle important dans le processus de prolifération cellulaire (Kotecha and Schlichter, 1999; Pardo et al., 1999; Schmidt et al., 1999) et un grand nombre de gènes des canaux potassiques ont été identifiés dans les différents tissus (Deal et al., 1996; Warmke and Ganetzky, 1994).

Malgré cette diversité génique, ces sous unités α ne forment que 4 classes différentes de protéines membranaires possédant toutes au moins un domaine P intervenant dans la formation du filtre de sélectivité du pore (P). Ce domaine a été conservé au cours de l'évolution, de la bactérie à l'homme, et constitue une signature permettant notamment d'identifier de nouveaux canaux K^+ à partir des séquences obtenues par les programmes de séquençage systématique (Coetzee et al., 1999). La partie responsable de la sélectivité au potassium est une petite séquence (TXGYG) d'acides aminés localisée dans la région du pore (P). De façon générale, les canaux potassiques associent 4 sous unités α afin de constituer un arrangement tétramérique délimitant en son centre un « filtre » sélectif au potassium.

La diversité des courants potassiques est obtenue par :

- l'association hétéromultimériques de différentes sous unités,
- la présence de sous unités auxiliaires régulatrices ou sous unité β

2- Diversité structurale des canaux potassiques

Les récents progrès de la biologie moléculaire ont permis d'identifier les structures moléculaires des sous unités protéiques α composant les canaux K^+ . Parmi les canaux K^+ clonés trois familles structurales ont été définies d'après les homologies de séquence, le nombre de segments transmembranaires (STM) et le nombre de domaine P constituant le pore ionique.

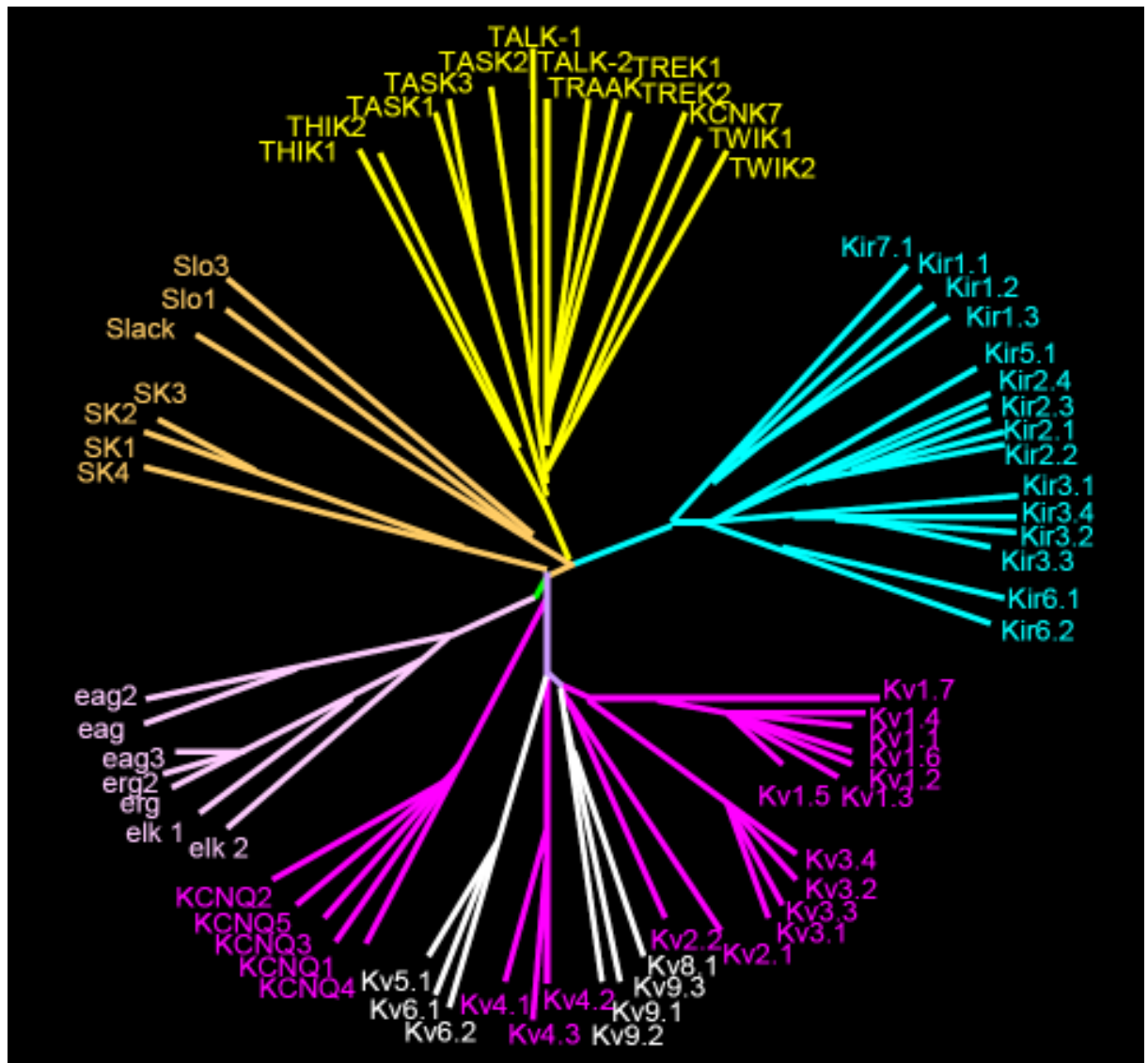


Figure 24 : Arbre phylogénétique des canaux potassiques où apparaissent les trois familles structurales définies d'après le nombre de segments transmembranaires (TM) et de portion participant à la formation du pore ionique (le segment P) : 4TM 2P, 2TM 1P et 6 TM 1P.

2.1- Canaux potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 domaine pore

Cette famille, également appelée *Shaker*, contient 43 sous unité α différentes qui regroupent les canaux voltage-dépendants (Kv) et les canaux potassiques calcium dépendants (K_{Ca}) (**tableau 10**). Ces polypeptides possèdent une partie centrale hydrophobe à six segments transmembranaires (STM) (**Figure 27, A**). Les segments S5 et S6 délimitent le domaine pore (P). Le canal fonctionnel est constitué par l'association de quatre de ces sous unités α (tétramères). Dans le cas des canaux voltage dépendants, des études sur la relation structure-fonction ont révélé que le quatrième segment (S4) était responsable de la sensibilité au potentiel grâce à la présence d'acides aminés chargés tel que la lysine et l'arginine. Une

dépolarisation adéquate induit alors un mouvement « de pagaie » de ce segment vers l'extérieur et provoque ainsi l'ouverture du canal (voir revue de Dolly & Parcej 1996 (Dolly and Parcej, 1996)) (**Figure 25**). L'assemblage des sous unités α des canaux Kv est contrôlé par une région située dans la portion N-terminale cytoplasmique. Cette région est appelé T1 (Shen and Pfaffinger, 1995) ou NAB (Xu et al., 1995) et permet la fixation des sous unités régulatrices de type $K_v\beta$. Dans cette famille on trouve les canaux de type KCNA, KCNB, KCNV, KCNC, KCND, KCNF, KCNG, KCNH, KCNN, KCNQ, KCNS, KCNT et KCNU et KCNM. Cette dernière classe est particulière et est appelée « sous-famille de canaux *slo* » comprenant slo 1 (BK_{Ca} , appartenant initialement aux 6STM, 1P), Slo2 (SLICK : Sequence Like an Intermediate Conductance Potassium channel et SLACK : Sequence Like A Calcium-Activated K^+ channel) et slo3.

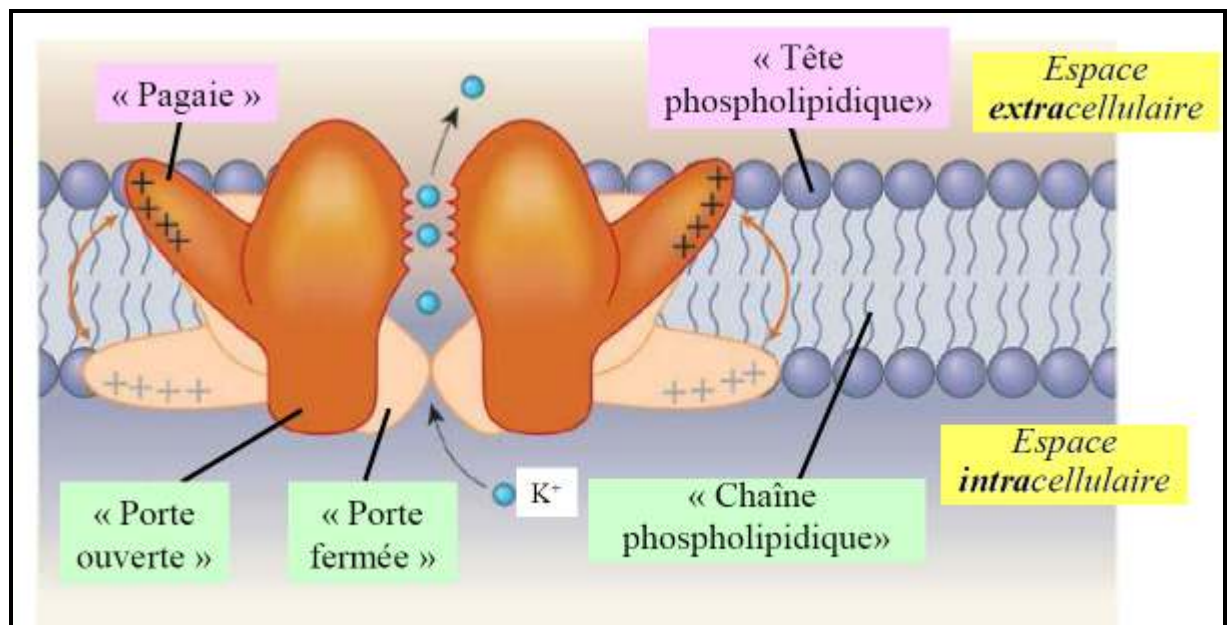


Figure 25: Mouvements de « pagaie » des segments S4 (« votage-sensor »). Les canaux potassiques voltage-dépendants contiennent un segment chargé positivement (S4), nommé « pagaie », qui bouge au sein de la bicouche phospholipidique constituant la membrane afin d'ouvrir le canal. (Lee, 2006).

- sous-famille Slo : le canal potassique BK_{Ca}

Comme nous l'avons précédemment mentionné, ce canal BK_{Ca} (Slo1, $KCa1.1$, maxi K, BK_{Ca}) faisait initialement partie des canaux 6STM-1P mais suite à la découverte d'un 7^{ème} segment (nommé S0) (**Figure 26**), le gène s'est retrouvé isolé dans une nouvelle famille de canaux potassiques : 7STM-1P (Meera et al., 1997). En fait, Slo1 n'est pas le seul gène codant

un canal 7STM-1P : 3 membres de cette famille ont été identifiés et présentent tous une conductance élevée au potassium : les canaux activés par dépolarisation et par le calcium intracellulaire (Slo1, γ : 260pS), les canaux activés par le calcium et le sodium (KCa4.1 [Slack, Slo2.2] γ : 25-65pS et KCa4.2 [Slick, Slo2.1] : γ : 141pS) et les canaux activés par la dépolarisation membranaire et le pH (KCa5.1 [Slo3] : γ : 106pS) (Wei et al., 2005).

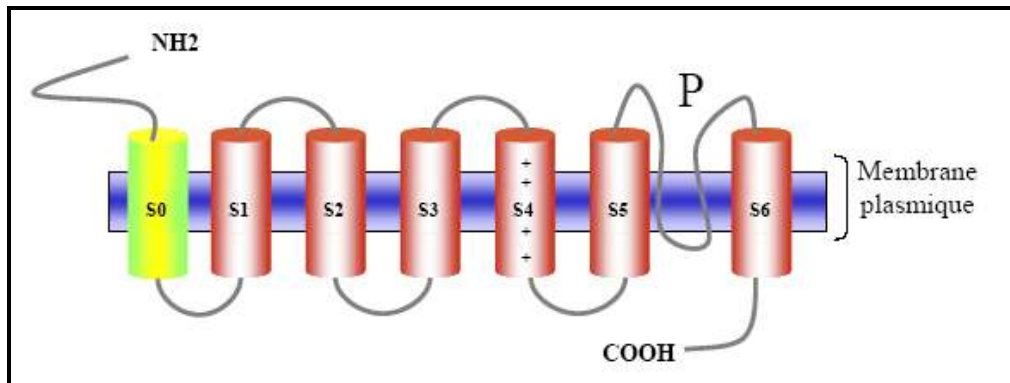


Figure 26 : Représentation schématique de la structure des canaux potassiques de la sous-famille *S/o* avec leurs 7 segments transmembranaires (S0-S6). Les segments S5-S6 délimitent le pore (P) du canal.

Famille	Gène humain	Nom du canal	Autre(s) nom(s)	Localisation chromosomique
KCNA	<i>KCNA1</i>	Kv1.1	RBK1, HUK(1), MBK1, RCK1, MK1, HBK1, AEMK	12p13.3
	<i>KCNA2</i>	Kv1.2	MK2, RCK5, NGK1, HuK(IV), BK2, BGK5, XSha2, HBK5, RAK,	1p13
	<i>KCNA3</i>	Kv1.3	HK4 MK3, HLK3, hPCN3, RCK3, RGK5, KV3, MBK3,	1p13.3
	<i>KCNA4</i>	Kv1.4	HuK(III), HGK5 RCK4, RHK1, HuK(II), HK1,	11p14.3-15.2
	<i>KCNA5</i>	Kv1.5	hPCN2, RK4, RK8, MK4 HK2, hPCN1, KV1, RK3,	12p13.3
	<i>KCNA6</i>	Kv1.6	HCK1, fHK, RMK2, HuK(II)	12p13.3
	<i>KCNA7</i>	Kv1.7	HBK2, RCK2,	19q13.3
	<i>KCNA9</i>	KCNQ1	KV2, MK1.6	
	<i>KCNA10</i>	Kv1.8	HAK6, MK6	1p13.3-22.1
			Kcn1, KCNA10, Kv1.10	
KCNB	<i>KCNB1</i>	Kv2.1	hDRK1, DHK1, MShab, DRK1	20q13.11-13.13
	<i>KCNB2</i>	Kv2.2	CDRK	8q12-13
	<i>KCNB3</i>	Kv8.1	Kv2.3, HNKA	8q22.3-22.4
KCNC	<i>KCNC1</i>	Kv3.1	NGK2, KV4, Raw2, Raw2a	11p14.3-15.2
	<i>KCNC2</i>	Kv3.2	RKShIIIA, Raw1, Kv3.2a, rKv3.2b, rKv3.2c	19q13.3-q13.4
	<i>KCNC3</i>	Kv3.3	RKShIIID, Kv3.3b	19q13.3
	<i>KCNC4</i>	Kv3.4	HKShIIIC, Raw3	1p21
KCND	<i>KCND1</i>	Kv4.1	mShal, RShal	Xp11.23
	<i>KCND2</i>	Kv4.2	Shal1, RK5	7q31
	<i>KCND3</i>	Kv4.3		1p13
KNCF/G	<i>KCNF1</i>	Kv5.1	IK8, KH1, KCNF1	2p25
	<i>KCNG1</i>	Kv6.1	K13, KH2	20q13
	<i>KCNG2</i>	Kv6.2	KCNF2	18q22-18q23
	<i>KCNG3</i>	Kv6.3	Kv10.1	2p21
	<i>KCNG4</i>	Kv6.4	Kv6.3	16q24.
KCNT	<i>KCNT1</i>	KCa4.1		9q34.3
	<i>KCNT2</i>	KCa4.2	Slack, Slo2	1q31.3
KCNU	<i>KCNU1</i>	KCa5.1		8p11.22

KCNV	<i>KCNV1</i>	Kv8.1	KCNB3, Kv2.3	8q22.3-8q24.1
	<i>KCNV2</i>	Kv8.2		9p24.2
KCNH	<i>KCNH1</i>	Kv10.1	eag1a, eag1b, KCNH1a, KCNH1b, meag, reag	1q32.1-32.3
	<i>KCNH2</i>	Kv11.1	erg1, herg, LQT2, HERG, Hergb	7q35-36
	<i>KCNH3</i>	Kv12.2	BEC1, Elk2	12q13
	<i>KCNH4</i>	Kv12.3	BEC2, elk1	17q21.31
	<i>KCNH5</i>	Kv10.2	eag2	14q24.3
	<i>KCNH6</i>	Kv11.2	erg2, herg2	17
	<i>KCNH7</i>	Kv11.3	erg3, herg3	2q24.3
	<i>KCNH8</i>	Kv12.1	elk1, elk3	3p24.3
KCNM	<i>KCNMA1</i>	KCa1.1	slo, BK _{Ca} , maxi K ⁺	10q22
KCNN	<i>KCNN1</i>	KCa2.1	SK1, SKCa1	19p13.1
	<i>KCNN2</i>	KCa2.2	SK2, SKCa2	5q23.1-23.2
	<i>KCNN3</i>	KCa2.3	SK3, SKCa3, hKCa3	1q21.3
	KCNN4	KCa3.1	SK4, Kca4, IK_{Ca1}, IK1	19q13.2
KCNQ	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	KCNA9, KVLQT1, LQT1	11p15.5
	<i>KCNQ2</i>	Kv7.2	KvEBN1	20q13.3
	<i>KCNQ3</i>	Kv7.3	KvEBN2	8q24.22-q24.3
	<i>KCNQ4</i>	Kv7.4		1p34
	<i>KCNQ5</i>	Kv7.5		6q14
KCNS	<i>KCNS1</i>	Kv9.1		20q12-13.2
	<i>KCNS2</i>	Kv9.2		8q22
	<i>KCNS3</i>	Kv9.3		2p24

Tableau 10 : Famille des canaux potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 pore et leurs sous unités régulatrices

2.2- Canaux potassiques à 2 segments transmembranaires et 1 pore

Cette deuxième famille, également appelée *Kir*, possède 15 membres plusieurs sous-familles telles que les canaux à rectification entrante simple, les Kir1 (ROMK1 à 3) et Kir2 (IRK1 à 3) et celle des canaux à rectification entrante sensibles aux protéines G, les Kir3 (GIRK1 à 4) (**Tableau 11**). Ces canaux sont constitués de sous unités comportant deux domaines transmembranaires S1 et S2, et d'un interdomaine H5, ou segment P, qui formerait le pore du canal (**Figure 27, B**). Le canal fonctionnel est constitué par l'association de quatre de ces sous unités α (tétramères). Ces canaux sont responsables du maintien du potentiel de membrane. Ils laissent principalement passer des courants entrants mais également des courants sortants car il y a un blocage des courants sortants par le Mg^{2+} et les polyamines intracellulaires. Les canaux potassiques inhibés par l'ATP (KATP) font partie de cette famille. Ils sont constitués

par l'assemblage d'un canal à rectification entrante (Kir6.2 et Kir6.1) et d'une sous unité récepteur aux sulfonylurées (Inagaki et al., 1995). Ils sont présents dans de nombreux types tissulaires et impliqués dans de nombreuses fonctions. Par exemple, le rôle du K_{ATP} des cellules β du pancréas est très bien caractérisé, il participe à la régulation de la glycémie en intervenant dans la transduction du signal qui suit une hyperglycémie et aboutit à la sécrétion d'insuline. Un rôle neuroprotecteur lors des ischémies a également été décrit. La fonction de ces canaux est de lier le potentiel de membrane au niveau énergétique de la cellule c'est à dire au rapport ATP/ADP (voir Lazdunski 1994 pour revue (Lazdunski, 1994)).

Famille	Gène humain	Nom du canal	Autre(s) nom(s)	Localisation chromosomique
KCNJ	<i>KCNJ1</i>	Kir1.1	ROMK1	11q24
	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	IRK1	17q23.1-24.2
	<i>KCNJ3</i>	Kir3.1	GIRK1, KGA	2q24.1
	<i>KCNJ4</i>	Kir2.3	IRK3, HIR, HRK1, hIRK2	22q13.1
	<i>KCNJ5</i>	Kir3.4	CIR, KATP1, GIRK4	11q23
	<i>KCNJ6</i>	Kir3.2b, Kir3.2d	BIR1, GIRK2B, GIRK2D, KATP2	21q22.1
	<i>KCNJ7</i>	withdrawn, see KCNJ6		
	<i>KCNJ8</i>	Kir6.1	uKATP-1	12p11.23
	<i>KCNJ9</i>	Kir3.3	GIRK3	1q21-23
	<i>KCNJ10</i>	Kir4.1, Kir1.2	BIR10, KAB-2	1q22-23
	<i>KCNJ11</i>	Kir6.2	BIR	11p15.1
	<i>KCNJ12</i>	Kir2.2	IRK2	17p11.1
	<i>KCNJ13</i>	Kir7.1, Kir1.4		2q37
	<i>KCNJ14</i>	Kir2.4	IRK4	19q13.1-13.3
	<i>KCNJ15</i>	Kir4.2, Kir1.3	ROMK3	21q22.2
	<i>KCNJ16</i>	Kir5.1	BIR9	17q23.1-24.2
	<i>KCNJN1</i>	Kir2.2v		17p11.2-p11.1

Tableau 11 : Famille des canaux potassiques à 2 segments transmembranaires et 1 domaine pore

2.3- Canaux potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 domaines pores

La troisième famille, également appelée *TWIK*, contient 17 membres formant des canaux K^+ qui peuvent être dépendants du pH, activés par les acides gras et par le stress mécanique, ou faiblement rectifiants entrants (**Tableau 12**). Ces sous unités α possèdent 4 STM et 2 domaines P ce qui permet de supposer qu'un canal fonctionnel est composé de l'assemblage de 2 sous unités α au lieu de 4 comme c'est le cas chez les autres familles de canaux potassiques (Lesage et al., 1996) (**Figure 27, C**). Dans le génome du nématode *Caenorhabditis elegans*, plus de 80 gènes codant pour des sous unités appartenant à ces 3 grandes ont été identifiés et

plus de la moitié sont de type TWIK. Ces résultats suggèrent que de nombreux membres de cette famille n'ont probablement pas encore été clonés chez les mammifères.

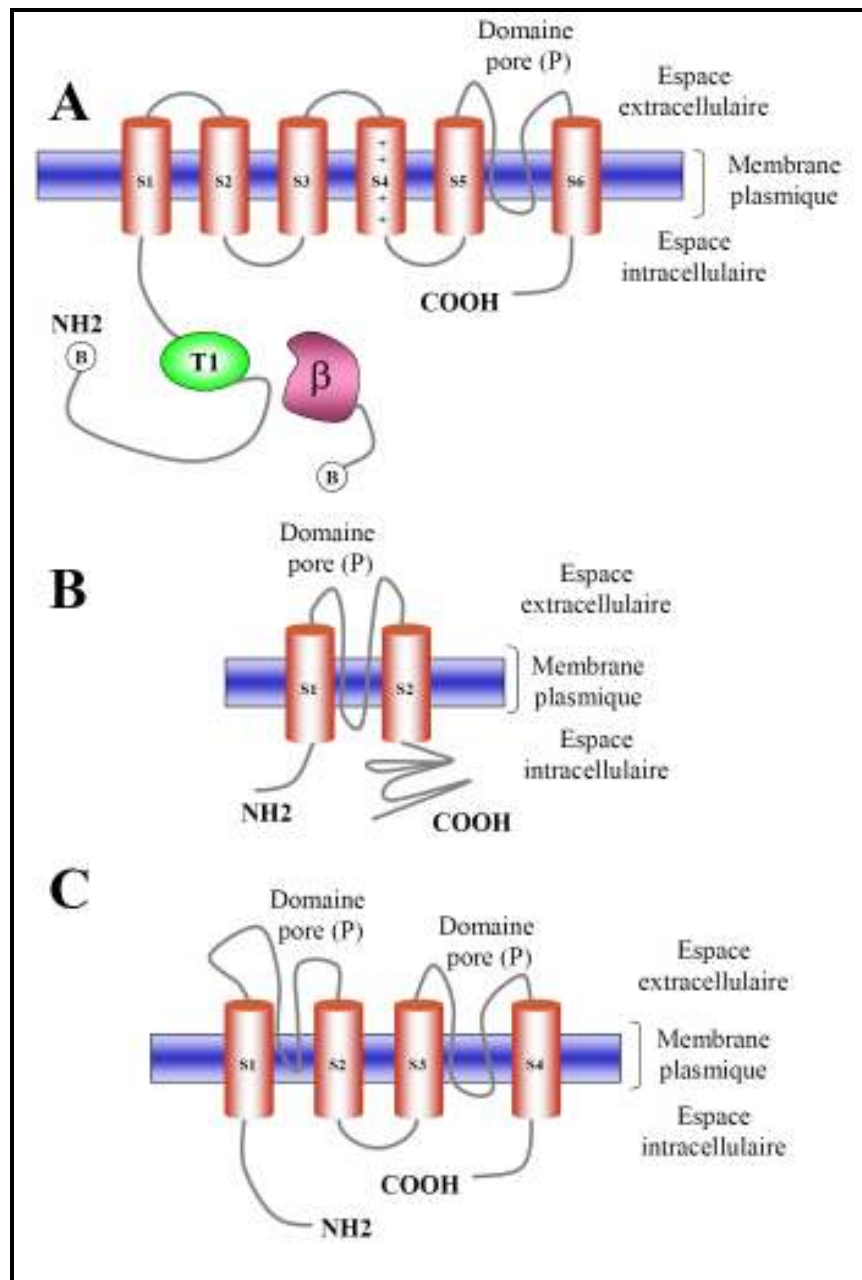


Figure 27 : (A) Représentation schématique de la structure d'un canal potassique à 6 segments transmembranaires (S) et 1 domaine pore (P). Des signes « + » sont représentés au niveau du segment S4 pour signifier son rôle de « voltage-sensor » chez les canaux potassiques voltage dépendants (K_v). Le domaine T1 (également appelé NAB) est le site de fixation des sous unités régulatrices $K_v\beta$. (B) Domaine d'inactivation des canaux K_v de type N également retrouvé au niveau de la sous unité régulatrice $K_v\beta 1$. (B) Représentation schématique de la structure d'un canal potassique à 2 segments transmembranaires (S) et 1 domaine pore (P). (C) Représentation schématique de la structure d'un canal potassique à 4 segments transmembranaires et 2 domaines pores.

Famille	Gène humain	Nom du canal	Autre(s) nom(s)	Localisation chromosomique
KCNK	<i>KCNK1</i>	K2p1.1	TWIK-1, hOHO, DPK	1q42-43
	<i>KCNK2</i>	K2p2.1	TREK-1, TPKC1	1q41
	<i>KCNK3</i>	K2p3.1	TASK-1, TBAK-1, OAT-1	2p23.3-24.1
	<i>KCNK4</i>	K2p4.1	TRAAK	
	<i>KCNK5</i>	K2p5.1	TASK-2	
	<i>KCNK6</i>	K2p6.1	TWIK-2, TOSS	11q13
	<i>KCNK7</i>	K2p7.1	kenk8	6p21
	<i>KCNK8</i>	K2p8.1		19q13.1
	<i>KCNK9</i>	K2p9.1	TASK-3	11q13
	<i>KCNK10</i>	K2p10.1	TREK-2	
	<i>KCNK11</i>	K2p11.1		8q24.3
	<i>KCNK12</i>	K2p12.1	THIK-2	14q31
	<i>KCNK13</i>	K2p13.1	THIK-1	
	<i>KCNK14</i>	K2p14.1		2p22-21
	<i>KCNK15</i>	K2p15.1	TASK-5, KT3.3	14q24.1-24.3
	<i>KCNK16</i>	K2p16.1	TALK-1	
	<i>KCNK17</i>	K2p17.1	TALK-2, TASK-4	20q12
				6p21.1-21.2
				6p21.1-21.2

Tableau 12 : Famille des canaux potassiques à 4 segments transmembranaires et 2 domaines pores

Outre les sous-unités α , d'autres polypeptides interviennent dans la formation des canaux K^+ : les sous-unités régulatrices β .

2.4- Les sous unités régulatrices

Comme nous l'avons précédemment indiqué, les canaux potassiques sont formés d'un assemblage de sous-unité α , dont le nombre varie suivant le type de canal, pour former un complexe multimérique. Cette association de sous unités α forme un canal fonctionnel avec un pore unique central. Toutefois leurs propriétés fonctionnelles et pharmacologiques sont modulées par leurs interactions avec des sous unités régulatrices ou sous unité β certaines sont cytoplasmiques d'autres intégrées à la membrane.

a- Les sous unités KCNE

Les protéines KCNE ne sont pas considérées comme des canaux potassiques (sous unité α) mais jouent le rôle de sous-unités β régulatrices de plusieurs canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) car elles ne forment pas à elles seules des canaux ioniques. En effet, les canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) sont modulés par au moins trois classes distinctes de protéines dont la famille KCNE. Dans le génome humain, les protéines KCNE

sont codées par 5 gènes (103 à 177 résidus d'acides aminés) désignés de KCNE1 à KCNE5 (Tableau 13).

Sous unité	Gène humain	Nom du canal	Localisation chromosomique
KCNE	<i>KCNE1</i>	minK/Isk	21q22.1-q22.2
	<i>KCNE2</i>	MiRP1	21q22.1
	<i>KCNE3</i>	MiRP2	
	<i>KCNE4</i>	MiRP3	
	<i>KCNE1L/5</i>	MiRP4	Xq22.3

Tableau 13 : La famille des sous-unités KCNE

KCNE1 joue un rôle important au niveau du cœur (Sanguinetti and Zou, 1997), KCNE2 au niveau du cœur (Abbott et al., 1999; Sesti et al., 2000), KCNE3 au niveau des muscles squelettiques (Abbott et al., 2001). En ce qui concerne KCNE4 et KCNE5, peu d'études ont été menées à ce jour. Les sous unités KCNE1, KCNE2 et KCNE3 agissent sur le fonctionnement des canaux Kv en influençant leur état « d'ouverture/fermeture », en jouant sur la sélectivité ionique ainsi que sur leur régulation, leur expression et leur pharmacologie (Sesti and Goldstein, 1998; Sesti et al., 2000). D'autre part, des travaux ont mis en évidence le lien entre des mutations au niveau des gènes KCNE1, KCNE2 et KCNE3 et certaines pathologies (Schulze-Bahr et al., 1997).

Les sous unités régulatrices KCNE sont caractérisées par un unique segment transmembranaire (S1) (Figure 28) qui avait été prédit par l'analyse des séquences des différents gènes de la famille KCNE. Ces peptides s'associent avec les sous unités α pour former un complexe stable et fonctionnel (Figure 29).

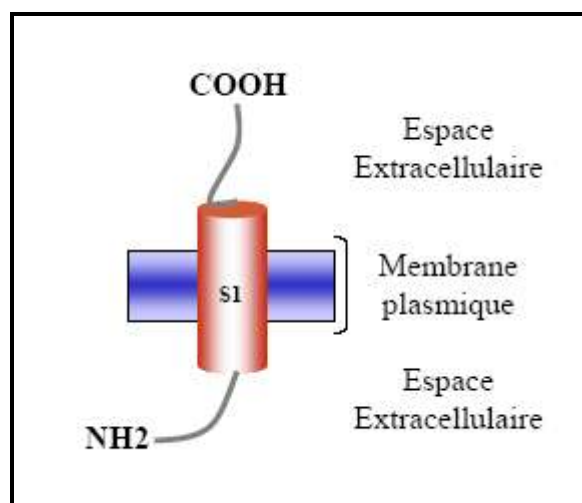


Figure 28 : Représentation schématique de la structure d'une sous unité régulatrice de type KCNE.

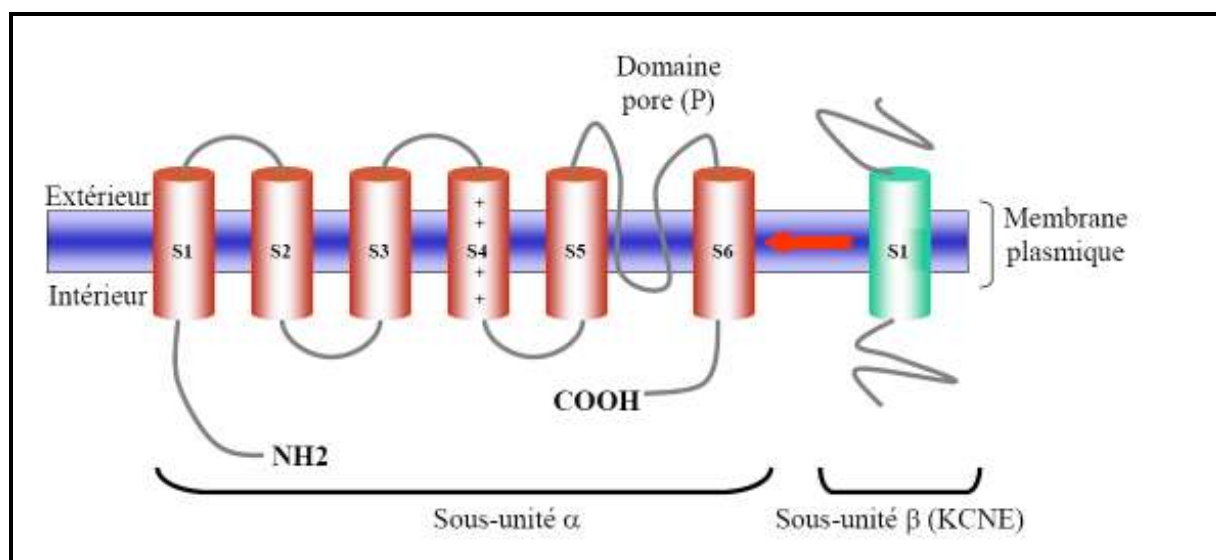


Figure 29 : Représentation schématique de l'interaction entre une sous unité α et une sous unité régulatrice β de type KCNE.

b- Les sous-unités β ($K_v\beta$)

Contrairement aux sous-unités α , il existe peu de sous-unités de type $K_v\beta$. En effet, seuls 3 gènes codant pour les sous unités β (**$K_v\beta_1$, $K_v\beta_2$, $K_v\beta_3$**) ont été identifiés (**Tableau 14**). Ces sous unités sont formé de 4 segments intracytoplasmiques (**Figure 30, A**). Chaque sous-unité possède, par épissage alternatif, plusieurs isoformes : $K_v\beta_1.1$, $K_v\beta_1.2$ et $K_v\beta_1.3$ pour la sous-unité $K_v\beta_1$, $K_v\beta_2.1$ et $K_v\beta_2.2$ pour la sous-unité $K_v\beta_2$ et $K_v\beta_3.1$ et $K_v\beta_3.2$ pour la sous-unité $K_v\beta_3$ (Pongs et al., 1999). Les sous-unités β modulent l'expression des sous-unités α au niveau de la membrane cellulaire (Nagaya and Papazian, 1997; Shi et al., 1996). Certaines sous-unités $K_v\beta$ ($K_v\beta_1$, $K_v\beta_2$) ont une homologie de séquence de leur partie N-terminale avec le domaine B (partie N-terminale) des sous-unités α des canaux potassiques voltage-dépendants de type N. Ce domaine B est responsable de l'inactivation du canal (Rettig et al., 1992).

Sous unité	Gène humain	Nom du canal	Localisation chromosomique
KCNAB (Sous-unité $K_v\beta$)	<i>KCNAB1</i>	$K_v\beta_1$ ($K_v\beta_1.1$, $K_v\beta_1.2$ et $K_v\beta_1.3$)	3q26.1
	<i>KCNAB2</i>	$K_v\beta_2$ ($K_v\beta_2.1$ et $K_v\beta_2.2$)	1p36.3
	<i>KCNAB3</i>	$K_v\beta_3$ ($K_v\beta_3.1$, $K_v\beta_3.2$ et $K_v\beta_3.3$)	17p13.1

Tableau 14 : La famille des sous-unités $K_v\beta$ ou KCNAB

c- Les sous-unités Slo β

Les sous-unités Slo β interagissent avec le canal BK_{Ca} . Ces sous unités possèdent deux segments transmembranaires dont les extrémités N et C terminales sont intracytoplasmiques

(Figure 30, B). Il existe 4 sous-unités de type Slo β : Slo β 1, Slo β 2, Slo β 3 et Slo β 4 également nommées KCNMB1 à 4 (Tableau 15).

Sous unités	Gène humain	Nom du canal	Localisation chromosomique
KCNM (sous-unité Slo β)	<i>KCNMB1</i>	Slo β 1	5q34
	<i>KCNMB2</i>	Slo β 2 (Slo β 2.1 et 2.2)	3q26.2-q27.1
	<i>KCNMB3</i>	Slo β 3 (Slo β 3.1, 3.2, 3.3 et 3.4)	3q26.3-q27
	<i>KCNMB3L</i>		22q11
	<i>KCNMB4</i>	Slo β 4	12q

Tableau 15 : La famille des sous-unités Slo β ou KCNM

L'interaction de la sous-unité α (BK_{Ca}) avec ces différentes sous-unités Slo β va modifier ses propriétés fonctionnelles et pharmacologiques. En effet, le canal BK_{Ca} est activé par le calcium intracellulaire et par le voltage. L'interaction de la sous-unité α avec la sous unité Slo β 1 induit une augmentation de la sensibilité au calcium mais une diminution de la sensibilité aux variations de voltage de la sous-unité α . La sous-unité Slo β 1 module également l'interaction de la sous unité α avec certaines toxines et activateurs (Dworetzky et al., 1996; Valverde et al., 1999). La sous-unité Slo β 2 (ainsi que la sous unité Slo β 3) possède un domaine d'inactivation dans sa partie N-terminale qui inactive, lors de son interaction avec la sous-unité α , le courant BK_{Ca}. D'autre part, la sous-unité Slo β 2 augmente la sensibilité de la sous-unité α pour le calcium comme la sous-unité Slo β 1. La sous-unité Slo β 3 possède 4 isoformes dont 3 confèrent un certain degré d'inactivation au canal BK_{Ca}. Par contre aucune des isoformes de la sous-unité Slo β 3 n'affecte la sensibilité de la sous-unité α pour le calcium. Enfin, la sous-unité Slo β 4 diminue la sensibilité de la sous-unité α pour le calcium.

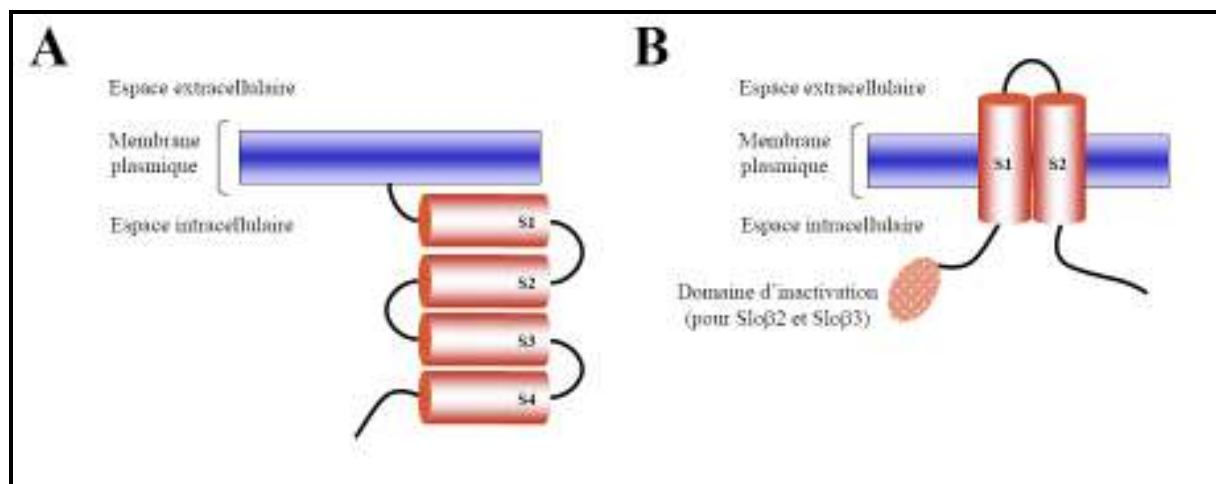


Figure 30 : Représentation schématique des sous-unités de type Kvβ avec leurs 4 segments intramembranaires (S1-S4) (A) et de type Sloβ avec leurs 2 segments intramembranaires (S1 et S2) et le domaine d'inactivation présent uniquement pour les sous-unités Sloβ2 et Sloβ3 (B).

3- Rôles physiologiques des canaux potassiques

3.1- Importance du potentiel de membrane et des signaux calciques dans la prolifération cellulaire

Les canaux potassiques contrôlent le potentiel de repos. Toute modification du potentiel de membrane aura des conséquences importantes sur la physiologie de la cellule. Il existe une corrélation claire entre potentiel de membrane et activité mitotique. En effet les cellules différenciées sont dépolarisées alors que les cellules en division sont hyperpolarisées, comme par exemple les cellules tumorales. Les cellules ayant recours aux facteurs de croissance et aux hormones pour entrer dans le cycle cellulaire possèdent un potentiel de membrane intermédiaire (Binggeli and Weinstein, 1986). La stimulation mitogénique provoque une brève hyperpolarisation en début de phase G1 suivie d'une dépolarisation dans la plupart des cellules. L'hyperpolarisation (qui accroît la force électromotrice du calcium) est nécessaire pour induire une entrée accrue de calcium en phase G1.

3.2- La prolifération cellulaire

Les canaux potassiques sont impliqués dans le processus prolifératif de nombreux types cellulaires. L'inhibition des canaux potassiques provoque une diminution de la prolifération cellulaire alors que la surexpression de ces canaux induit une augmentation de la prolifération cellulaire et une progression tumorale. Par ailleurs, les cellules en prolifération ont un potentiel de membrane plus négatif que les cellules différenciées. Enfin, dans de nombreux types cellulaires, les canaux potassiques de type Kca (IK_{Ca1}), Kv1.1, Kv1.3, hEAG seraient impliqués dans la progression au sein du cycle cellulaire (Figure 31, A).

L'identification des canaux potassiques impliqués dans la prolifération cellulaire s'effectue en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques. Néanmoins, leur spécificité n'est pas toujours suffisante. Par ailleurs, leur utilisation à forte concentration peut avoir des effets annexes. La solution actuelle la plus efficace consiste à utiliser des siRNA dirigés contre une protéine d'intérêt constituant le canal ou encore de surexprimer ce canal dans un modèle cellulaire afin d'en appréhender les conséquences. Il est difficile de corrélér la prolifération cellulaire avec un seul type de canal. Les cellules expriment le plus souvent de nombreux types de canaux potassiques, pouvant constituer des hétérotétramères, et faire la part de l'implication d'un type de canal vis-à-vis des autres n'est pas évidente.

a- Les canaux de type Kv

L'impact de ces canaux sur la prolifération cellulaire a essentiellement été étudié sur des cellules tumorales et principalement celles d'origine épithéliale (Abdul and Hoosein, 2002a; Abdul and Hoosein, 2002b). Ces canaux potassiques s'ouvrent suite à la dépolarisation de la membrane. Cela se produit au sein des cellules excitables lors de l'émission des potentiels d'action. Dans les cellules non excitables, le phénomène permettant l'ouverture de ces canaux est différent : il faut se référer au « courant de fenêtre » qui existe au sein des cellules cancéreuses notamment. En effet, ces dernières ont un potentiel de repos plus élevé par rapport aux cellules épithéliales différenciées (O'Grady and Lee, 2005; Pardo, 2004).

Néanmoins peu de choses sont connues sur le potentiel de membrane des cellules normales au sein du tissu sain. En effet, rien n'indique que le potentiel de membrane des cellules normales en culture primaire soit similaire à celui que l'on pourrait mesurer au sein du tissu d'origine. Enfin les hormones et les facteurs de croissance modulent l'activité des canaux potassiques. La prolactine augmente la probabilité d'ouverture d'un canal potassique de type Kv, *via* l'activation de $P59^{\text{fyn}}$, dans une lignée de cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP (Van Coppenolle et al., 2004a). Les hormones et les facteurs de croissance peuvent également induire la surexpression des canaux potassiques : c'est ce que produit l'IGF sur des canaux de type Kv au sein des cellules HEK293 (Kunzelmann, 2005).

Parmi les canaux Kv, on trouve la famille des canaux potassiques de type EAG (*ether-à-go-go*) a été décrite initialement puis clonée chez *Drosophila melanogaster* (Warmke et al., 1991). Deux des canaux de cette famille sont impliqués dans la prolifération cellulaire : EAG (Kv10.1) et HERG (« Human EAG-related K⁺ channel » ; Kv11). L'activité des canaux EAG et HERG est modulée au cours du cycle cellulaire chez l'embryon de Xénope (Day et al., 2001). Il ne semble pas que ceci soit un épiphénomène. En effet, ces canaux sont inhibés lors de la transition G2/M, ce qui provoque une dépolarisation de la membrane (Bruggemann et

al., 1997). Cette inhibition est induite par la cycline B et P34^{CDC2}. Par contre, l'activité de ces canaux est plus élevée lors de la transition M/G1. Par ailleurs, il a été démontré que les canaux EAG possèdent des sites consensus pour les MAP kinases (« Mitogen-Activated Protein Kinase »).

L'expression des canaux EAG-1 peut également être spécifique d'un tissu donné. Il a été montré que le canal EAG-1 n'est pas exprimé au niveau de l'utérus sain (Farias et al., 2004). Par contre, sa présence est systématique dans les tissus cervicaux cancéreux. Cela valide les travaux de Pardo et collaborateurs (Pardo et al., 1999) qui ont mis en évidence le rôle oncogénique de ce canal grâce à l'utilisation de souris nude. L'inhibition de l'expression des canaux EAG du sein réduit considérablement la prolifération cellulaire. A l'inverse, une surexpression des canaux EAG induit un développement tumoral plus important. EAG a par ailleurs été caractérisé dans d'autres types cellulaires comme dans les tumeurs mammaires (il est absent des cellules saines) (Ouadid-Ahidouch et al., 2001) et les neuroblastomes (Meyer and Heinemann, 1998). Les canaux de type EAG seraient activés en début de cycle cellulaire. La progression des cellules en phase G1 s'accompagne d'une entrée massive de calcium. Cette dernière inhibe EAG, mais active une autre conductance potassique (activée par le calcium) IK_{Ca1} qui a son tour provoque une augmentation du calcium intracellulaire (dans laquelle le canal TRPV6 est impliqué) et une progression du cycle cellulaire en phase G1/S. L'activation séquentielle de ces canaux potassiques induirait donc des variations de calcium intracellulaire sous forme d'oscillations. Les canaux de type HERG sont présents lors de la vie fœtale, essentiellement au niveau cardiaque. Ces canaux disparaissent à l'état adulte au sein des cellules différenciées, mais réapparaissent dans les cellules tumorales (Wang et al., 2002). Cela signifie que les canaux HERG jouent un rôle actif dans la régulation de la prolifération cellulaire.

b- Canaux K^+ activés par le calcium

Ces canaux sont présents dans un grand nombre de types cellulaires : la prostate (Abdul and Hoosein, 2002a), les cellules gliales (Basrai et al., 2002), l'estomac (Elso et al., 2004), l'utérus (Suzuki and Takimoto, 2004), le sein (Ouadid-Ahidouch et al., 2004a; Ouadid-Ahidouch et al., 2004b), etc....

Comme les canaux de type EAG, l'expression des canaux potassiques activés par le calcium peut-être dépendante du cycle cellulaire. Cela a clairement été démontré pour le canal IK_{Ca1} (Ouadid-Ahidouch et al., 2004b) au niveau des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. L'activité de ce canal est augmenté en phase G1 et en début de phase S. Ce phénomène est dû

en partie à un niveau d'ARNm codant pour ce canal plus élevé lors de ces phases du cycle cellulaire. Cela induit un influx de calcium plus important du fait de l'hyperpolarisation de la membrane qui en découle. Les hormones impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire peuvent moduler l'activité de ces canaux. Citons comme exemple l'oestradiol qui active un canal potassique de type BK_{Ca} dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Coiret et al., 2005).

3.3- Le volume cellulaire

Lors de la progression dans le cycle cellulaire, le volume des cellules change continuellement. Il existe donc des mécanismes de compensation. Les canaux potassiques et chlorure y participent. Il a été montré par l'équipe de J.M Dubois que les agents mitogènes stimulent la capture des nutriments et induisent le gonflement cellulaire. L'accroissement du volume cellulaire active des protéines kinases régulatrices comme ERK1 et ERK2 (Dubois and Rouzaire-Dubois, 2004; Rouzaire-Dubois and Dubois, 1998). Par contre l'augmentation du volume cellulaire provoque également un phénomène de dilution qui provoque une modification de l'activité enzymatique. Afin de rester dans les volumes physiologiques, les cellules font appel à des systèmes de régulation comme le RVD (« **R**egulatory **V**olume **D**ecrease ») : lors de l'augmentation du volume cellulaire, les canaux potassiques, mais aussi chlore (VRAC « **V**olume-**R**egulated **A**nion **C**hannel ») sont activés. Il en résulte une sortie massive de ces ions et ainsi une sortie d'eau donc une diminution du volume (Lemonnier et al., 2002). Par ailleurs l'importance de ces canaux dans le cadre du contrôle du volume cellulaire est soulignée par le fait qu'ils sont régulés en fonction du cycle cellulaire (Shen et al., 2000).

En conclusion, les hypothèses actuelles tendent à montrer qu'au cours de la division cellulaire, l'activation des canaux potassiques est transitoire (et est corrélée aux oscillations de concentration intracellulaire en calcium suite à l'activation des SOC) et ne modifie que peu la concentration interne en potassium de la cellule (Kunzelmann, 2005). L'augmentation du volume cellulaire accompagne la prolifération cellulaire. Néanmoins, les liens exacts entre l'activation des canaux potassiques, l'augmentation du volume cellulaire et la prolifération sont peu clairs.

3.4- L'apoptose

Les canaux potassiques sont également activés lors de l'apoptose (Figure 31B). Ceci est paradoxal lorsqu'on connaît leur rôle dans la prolifération cellulaire. Cependant, lors de

l'apoptose, il semblerait que l'activation des canaux potassiques se fasse de manière prolongée. En effet, l'apoptose s'accompagne souvent d'une vidange totale des stocks calciques et par conséquent d'une augmentation de la concentration intracytoplasmique en calcium (Skryma et al., 2000). Il en résulte un efflux de potassium et une diminution du volume cellulaire provoquant l'activation de caspases et de nucléases qui vont propager le signal apoptotique. Lors de l'apoptose il se produit de nombreuses modifications de concentrations ioniques intracellulaires. Néanmoins, il a été proposé que ces enzymes soient dépendantes des concentrations intracellulaires en potassium. Le potassium semble donc jouer un rôle clé dans la régulation des processus apoptotiques.

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de la prolifération cellulaire, les canaux potassiques sont également activés. HERG, par exemple, favorise l'apoptose induite par H_2O_2 et facilite par ailleurs la prolifération de cellules tumorales. L'explication de ce paradoxe résiderait dans le fait que l'apoptose soit également déclenchée par des récepteurs dits « de mort » par des molécules spécifiques (voie extrinsèque) ainsi que par des perturbations au niveau des mitochondries (voie intrinsèque). Ces phénomènes sont des événements précoces d'initiation de l'apoptose et ne se produisent pas lors de la prolifération cellulaire.

Lors de l'apoptose, il semblerait que l'activation des canaux potassiques soit beaucoup plus prononcée que celle qui survient lors de la prolifération cellulaire (Yu and Choi, 2000). Dans ce cas, le volume cellulaire diminue contrairement à l'augmentation de volume enregistré lors de la division cellulaire. De plus, le flux de potassium lors de l'apoptose est de loin beaucoup plus important que celui se produisant lors de la prolifération tumorale (Hughes et al., 1997). Au final, la concentration en potassium peut décroître jusqu'à 50mM voire même en dessous de cette concentration. En revanche, lors de la prolifération cellulaire, les modifications de la concentration intracellulaire en potassium se présentent sous forme d'oscillations autour d'un niveau de concentration plus élevé.

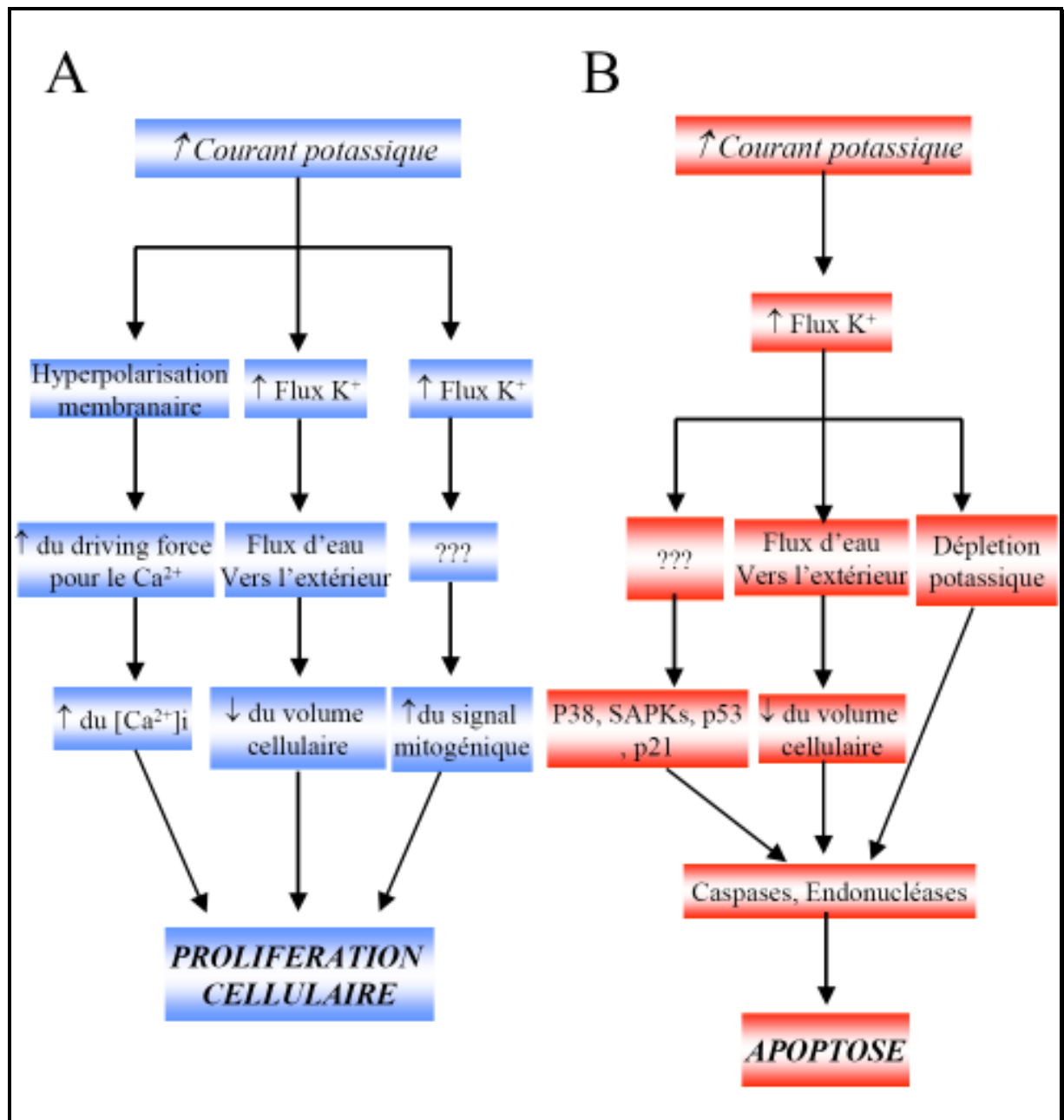


Figure 31 : Représentation des mécanismes par lesquels les canaux potassiques interviennent dans la prolifération cellulaire (A) et l'apoptose (B).

4- Les canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire : K_{Ca}

Les canaux potassiques calcium-dépendants, comme leur nom l'indique, sont dépendants pour leur ouverture de la concentration en calcium libre intracellulaire. Sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques, 3 classes ont été décrites : BK_{Ca} (large conductance channel), SK (small conductance channel) et IK (intermediate conductance channel). Au cours de nos travaux, nous nous sommes plus particulièrement intéressé au canal potassique calcium-dépendant à conductance intermédiaire : IK_{Ca1} .

4.1- BK_{Ca}

Le canal BK_{Ca} est exprimé dans de nombreux tissu et est impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la vasodilatation (Ghatta et al., 2006), la sécrétion d'hormones (Kunz et al., 2002; Orio et al., 2002), etc..... Cette diversité de fonctions physiologiques peut-être expliquée par les propriétés d'activation de ce canal (activé à la fois par une dépolarisation membranaire et une augmentation du calcium intracellulaire). Dans le muscle lisse par exemple, le canal est activé par l'élévation du taux de calcium intracellulaire et entraîne alors une hyperpolarisation de la cellule, et donc une inhibition de l'entrée de calcium par les canaux calciques voltage dépendants, d'où le relâchement du muscle lisse (Jaggar et al., 2000). Dans d'autres types cellulaires tels que le neurone, le canal BK_{Ca} serait davantage activé par une dépolarisation de la membrane (Storm, 1987). Toutefois les études menées pour comprendre l'implication du canal dans la réponse des cellules à des stimuli variés ont révélé l'existence de nombreuses voies de régulation de son activité selon le type cellulaire. Comme de nombreux canaux, le canal BK_{Ca} peut en effet être phosphorylé par différentes kinases comme la PKG dans les cellules endothéliales vasculaires (Mistry and Garland, 1998). Il peut également être modulé par l'association avec d'autres protéines (sous unités régulatrices) ou avec les protéines d'adhérences. Le canal BK_{Ca} peut également être activé par les gazs (Monoxyde de carbone).

De façon générale, le canal BK_{Ca} possède 11 domaines (notés de S0 à S10) (**Figure 32**) dont les domaines S0 à S6 sont enchâssés au niveau de la membrane plasmique.

La sous unité α est codée par un seul gène nommé Slo1 (ou *Slopowke*) qui, par plusieurs mécanismes tels que les épissages alternatifs des exons au niveau de l'ARNm mais aussi par la co-expression de cette sous unité avec des sous unités régulatrices (Slo β) génèrent une diversité fonctionnelle (Saito et al., 1997). Toutes ces sous unités α sont voltage et calcium-dépendantes. La séquence primaire du canal BK_{Ca} est relativement bien conservée chez les mammifères et possède un haut degré d'homologie avec les séquences des six domaines transmembranaires (S1-S6) de la famille des canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) (Jan and Jan, 1997). Schématiquement, la sous unité α du canal BK_{Ca} apparaît formée d'un « corps » regroupant les segments S0 à S6 et les segments cytosoliques S7 et S8, et d'une « queue » comprenant les segments cytosoliques S9 et S10 et l'extrémité C-terminale (Meera et al., 1997) (**Figure 32**). Les 4 segments hydrophobes (S7-S10) représentent presque 70% de la sous-unité α . L'extrémité NH_2 de chaque sous unité α est extracellulaire et

constitue le domaine d'association avec une sous unité β régulatrice (Wallner et al., 1996), tandis que l'extrémité est cytosolique (C-terminale). Comme tout canal voltage dépendant, la dépendance au voltage est conférée par le segment S4, en particulier par 3 résidus arginine présents dans cette région (Arg207, Arg210 et Arg213 ; (Diaz et al., 1998). Dans les conditions physiologiques, le canal BK_{Ca} peut être activé par une dépolarisation membranaire et une augmentation du calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). Ceci suggère que le mécanisme sensible au voltage au niveau de ce canal n'est peut-être pas le même que celui des canaux « uniquement » voltage-dépendants. Il existe au niveau de la séquence de BK_{Ca}, une séquence dite « voltage sensor » qui permet l'activation de BK_{Ca} par une dépolarisation membranaire. Le « voltage sensor » est localisé au niveau du segment transmembranaire 4 (S4). Toutefois, lorsque l'on enlève la partie sensible au calcium, le canal BK_{Ca} s'active quand même avec la dépolarisation. Ce canal est plus « voltage sensor » que « calcium-dépendant ».

Une région de l'extrémité C-terminale de cette même sous-unité serait plutôt un « senseur » de calcium et régulerait l'activité du canal en fonction de la concentration cytosolique de cet ion (Wei et al., 1994). En effet, en dépit de sa sensibilité au calcium, la séquence primaire de la sous-unité α ne peut pas contenir de séquence consensus pour lier le calcium. Des mutations au niveau des 28 acides aminés de la séquence reliant les segments 9 et 10 suggèrent que cette région pourrait servir de site de fixation au calcium et participer ainsi à l'activation du canal BK_{Ca}. Cette région a été nommée « calcium bowl » (Krause et al., 1996) ou domaine RCK1 (**R**egulator of the **C**onductance of **K**⁺ channels). Le « calcium bowl » contient de nombreux résidus chargés négativement et il est très conservé phylogénétiquement. Le « calcium bowl » est très sélectif pour le calcium mais certains travaux laissent penser qu'il existerait au moins encore une région qui lierait le calcium contribuant ainsi à l'activation du canal BK_{Ca} (Schreiber and Salkoff, 1997).

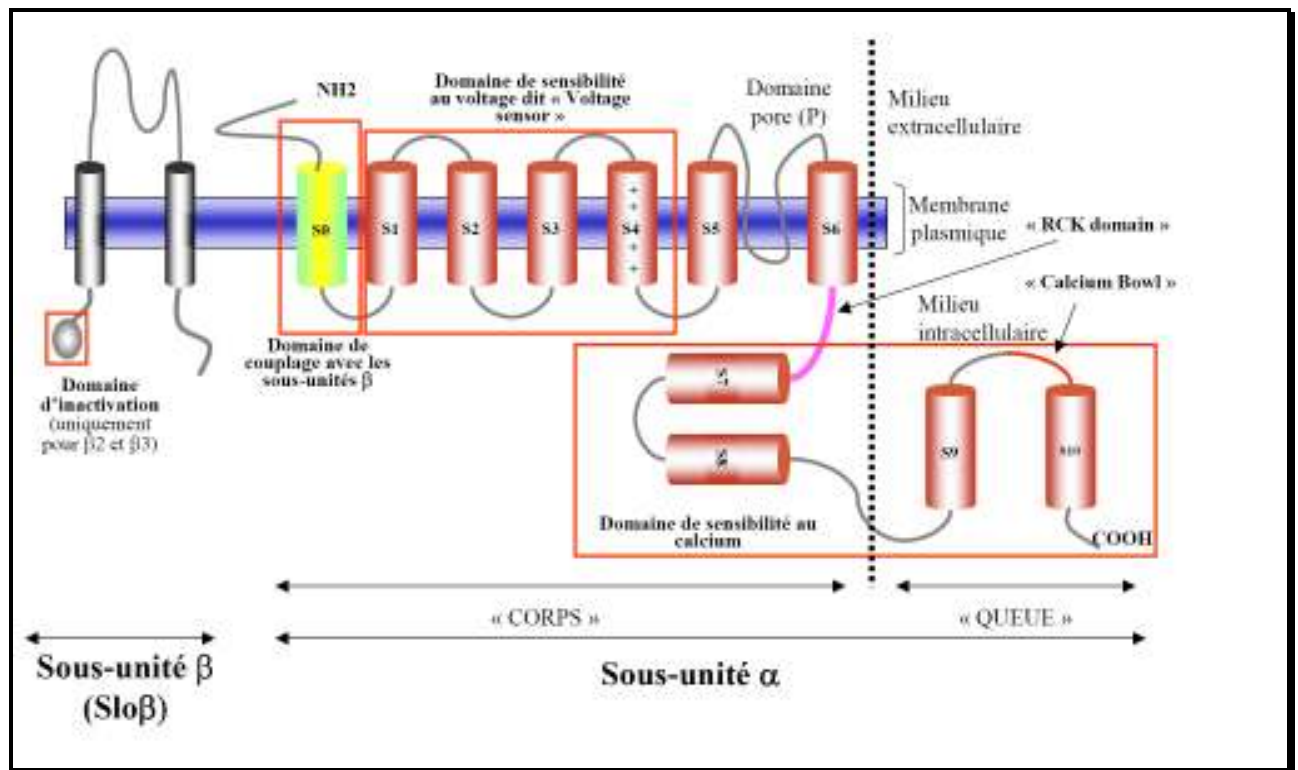


Figure 32 : Structure du canal BK_{Ca}. Chaque sous-unité α du canal est constituée de 7 segments transmembranaires (S0 à S6) et de 4 segments cytoplasmiques (S7 à S10). Les segments S0 à S8 forme le « corps du canal » tandis que les segments S9 et S10 en constituent la « queue ».

Mis à part le nombre de segments transmembranaires de la sous-unité α , les canaux se distinguent d'une manière générale par leur forte conductance pour le potassium (± 260 pS), d'où le nom de « Big K » donné à Slo1. Concernant la régulation du canal BK_{Ca} par le calcium intracellulaire, plusieurs travaux ont montré que le « calcium bowl » n'était pas le seul domaine impliqué (Wei et al., 1994). Certains résidus dans le domaine RCK permettent également au canal d'être régulé par le calcium dans les conditions physiologiques mais aussi par des concentrations très élevées (de l'ordre du millimolaire) en ions divalents. Ce domaine pourrait également être à l'origine de la régulation du canal BK_{Ca} par le Mg²⁺ (Zhang et al., 2001).

Les propriétés fonctionnelles et pharmacologiques du canal BK_{Ca} correspondent à la seule sous unité α étudiée dans un système hétérologue. Pour expliquer les différences observées dans les tissus natifs, il a été mis en évidence que cette sous-unité peut-être associée à 4 sous-unités β régulatrices différentes dans de nombreux tissus (voir ci-dessus).

Les sous-unités β ont leurs extrémités N et C-terminales à l'intérieur de la cellule. La co-expression de la sous-unité β avec le pore formé par la sous-unité α affecte la sensibilité du canal pour le calcium et pour le voltage. D'autre part, la présence des sous-unités β affecte

la liaison de la charybdotoxine (inhibiteur du canal BK_{Ca}). Bien que les canaux BK_{Ca} (sous unité α) soient associés dans la cellule aux sous-unités β , il apparaît de plus en plus que ces sous-unités β ne sont pas des composants essentiels des canaux BK_{Ca} (Chang et al., 1997; Tanaka et al., 1997). L'activité des canaux BK_{Ca} peut également être modulée par des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation. Toutefois la séquence de la sous-unité α a montré des sites de phosphorylation : l'activité du canal BK_{Ca} peut donc être activée ou inhibée par des protéines kinases (Reinhart and Levitan, 1995). L'ensemble de ces interventions au niveau du canal (épissages alternatifs, associations avec des sous-unités β et les modifications post-traductionnelles) peuvent générer des canaux BK_{Ca} avec des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques propres dans un type cellulaire donné.

4.2- IK_{Ca1}

- Structure

La première description du courant potassique calcium activé à conductance intermédiaire a été faite par Gardos et collaborateurs en 1958 dans des érythrocytes humains (Gardos, 1958). Le canal potassique calcium-activé à conductance intermédiaire est connu dans la littérature scientifique sous différents noms : KCNN4, SK4, KCa_4 , IK_{Ca1} , $IK1$, $K_{Ca3.1}$. Le gène codant pour le canal potassique IK_{Ca1} est situé sur le segment 2 du domaine 13 du bras long du chromosome 19 (**Figure 33**).

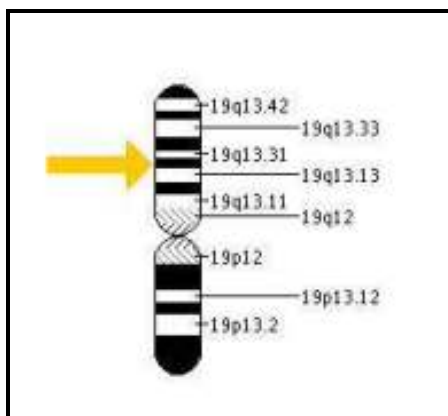


Figure 33 : Localisation du gène codant pour le canal IK_{Ca1} au niveau du bras long (q) du chromosome 19 (19q13.2).

La taille de l'ARNm est de 2200 pb. Toutefois, dans certains tissus comme les ganglions lymphatiques et le placenta, il a été démontré que cet ARNm pouvait atteindre une taille de 4500pb (Ghanshani et al., 2000). Il est également intéressant de noter que l'ARNm codant pour le canal IK_{Ca1} est détecté lors de l'embryogenèse (étape à fort taux de prolifération) alors

qu'il est absent dans le foie adulte. La séquence codante du gène IK_{Ca1} est composée de 1284pb et comprend 9 exons et 8 introns de tailles différentes. La séquence protéique est composée de 427 acides aminés (Figure 34) codant pour une protéine de taille de 47.696 kDa.

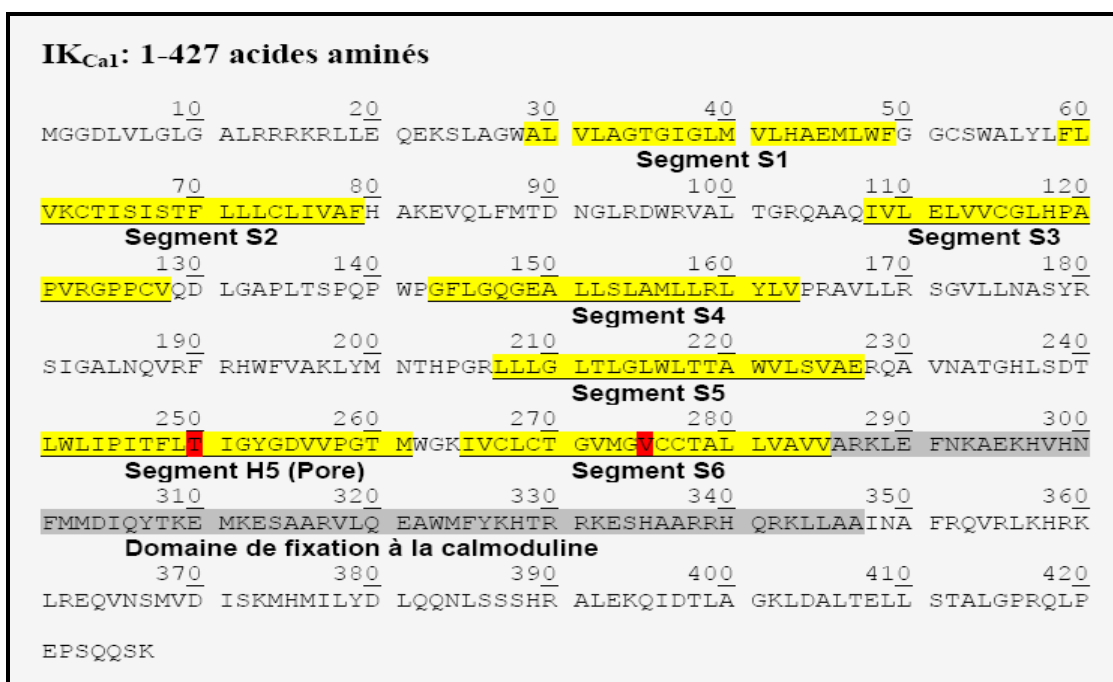


Figure 34 : Séquence en acides aminés du canal IK_{Ca1} . La séquence du canal IK_{Ca1} est constituée de 427 acides aminés codant pour une protéine de 47,696 kDa. Les séquences codant pour les 6 segments transmembranaires (S1 à S6) sont surlignées en jaune. Les séquences codantes pour la région du pore (P) et la région de fixation de la calmoduline sont surlignées en gris. Les résidus Thréonine 250 (T^{250}) et Valine 275 (V^{275}) permettant la fixation des inhibiteurs TRAM-34 et le clotrimazole sont surlignés en rouge.

Le canal IK_{Ca1} appartient à la famille des canaux potassiques à 6 segments transmembranaires et 1 pore (6STM/1P) formant une sous-unité α . Quatre sous-unités α s'associent afin de former un complexe fonctionnel. Les extrémités N et C-terminales sont intracytoplasmiques. Le canal IK_{Ca1} est activé dans les conditions physiologiques par une augmentation du calcium intracellulaire. Ce calcium se fixe au niveau d'une protéine, la calmoduline (CaM) permettant la formation du complexe Ca^{2+} -CaM qui se fixe sur l'extrémité C-terminale du canal IK_{Ca1} (Figure 35) pour induire son activation. La calmoduline est une protéine monomérique de 148 acides aminés, ubiquitaire, capable de s'associer aux ions calcium libres cytosoliques. Cette liaison induit un changement de conformation de la protéine, et forme un complexe calmoduline/calcium. Ce complexe permet l'activation par changement de conformation de nombreuses protéines dont le canal IK_{Ca1} conduisant à l'ouverture du pore du canal.

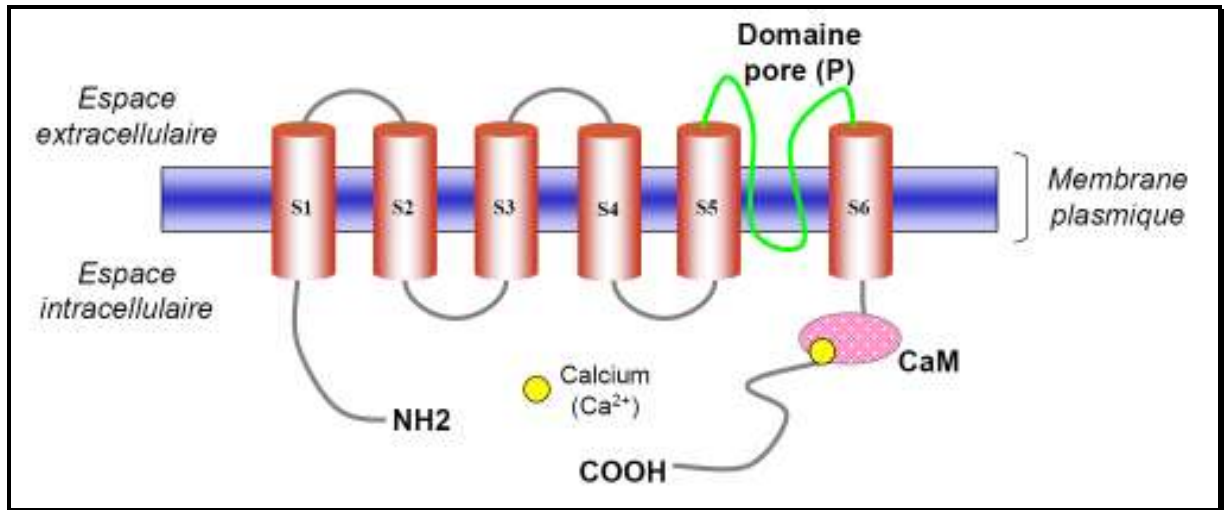


Figure 35 : Représentation schématique d'une sous-unité α du canal IK_{Ca1} avec ses 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Les extrémités N et C-terminales sont intra-cytoplasmiques et le site de fixation de la calmoduline (CaM) se situe au niveau de la partie C-Terminale.

- Propriétés pharmacologiques

Le canal IK_{Ca1} est un canal activé par une augmentation du calcium intracellulaire et possède une conductance intermédiaire de l'ordre de 18 à 50pS par rapport aux autres membres de la famille K_{Ca} . Le canal potassique IK_{Ca1} peut-être inhibé par différents agents pharmacologiques tels que le TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole; MW: 344.84) et le clotrimazole (1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-imidazole ; MW : 344.84). Ces deux inhibiteurs ont une structure très proche (**Figure 36**). Cependant, le TRAM-34 est une molécule inhibitrice plus spécifique que le clotrimazole car des études ont montré que le clotrimazole peut également inhiber le canal calcique TRPM2 ainsi que le cytochrome P450 intervenant dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Toutefois, une étude a montré que la sensibilité du canal IK_{Ca1} pour le TRAM-34 et le clotrimazole était fortement diminuée lorsque le résidu T^{250} , situé dans le segment transmembranaire S5, et le résidu V^{275} , situé dans le segment transmembranaire S6, sont mutés (**Figure 34**) (Wulff et al., 2001).

Le 1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone ; MW : 162.19) est un activateur du canal potassique IK_{Ca1} . Cet agent augmenterait la sensibilité du canal au calcium libre cytosolique. Toutefois, une étude a mis en évidence qu'une utilisation à long terme du 1-EBIO entraînait également une diminution de l'expression du canal IK_{Ca1} au niveau des cellules HaCaT (Koegel et al., 2003). Mais, les mécanismes impliqués dans ces effets de 1-EBIO ne sont pas encore élucidés.

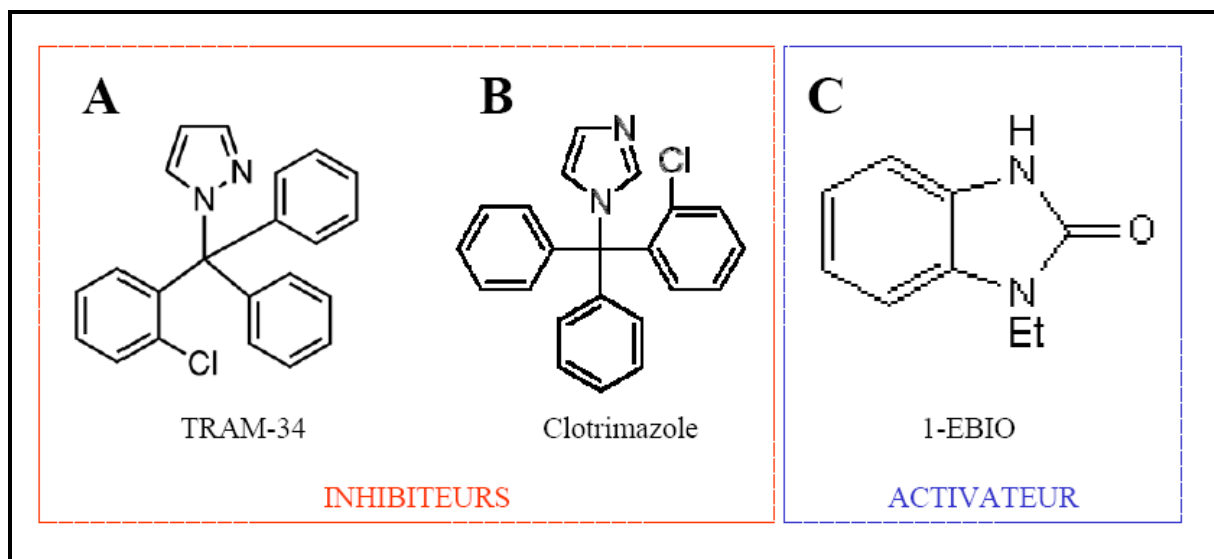


Figure 36 : Représentation des structures chimiques des inhibiteurs, le TRAM-34 et le clotrimazole, (A) et de l'activateur, le 1-EBIO (B) du canal IK_{Ca1} .

Il a été démontré que le canal IK_{Ca1} est surexprimé dans de nombreux cas de cancers tels que le cancer de l'endomètre (Wang et al., 2007), de la peau (Tajima et al., 2006), de l'ovaire (Thompson et al., 1996) ainsi que dans la prostate (Bloch et al., 2007).

4.3- $SKCa$

Le canal SK (Small conductance) a ainsi été nommé en rapport avec sa faible conductance (10-15pS). Le canal SK joue un rôle fondamental dans les cellules excitables. Ce canal est sélectif aux ions potassiques et est activé par une augmentation du calcium intracellulaire.

En dépit de l'importance du canal SK dans la physiologie cellulaire, peu de chose concernant ses propriétés électrophysiologiques sont connues. Le canal SK est activé par des concentrations calciques intracellulaires submicromolaires (IC_{50} : 600-700nM).

5- Canaux potassiques et cancer

Les canaux potassiques sont impliqués dans des maladies à la fois génétiques (Syndromes cardiaques du QT long (LQT), arythmies et surdités, Hyperinsulinémie hypoglycémiant, Syndrome rénal de Bartter, etc...), dans les maladies auto-immunes (Syndrome d'Isaacs, Syndrome de Morvan) (Mazzuca and Lesage, 2007) ainsi que dans de nombreux cas de cancers tels que le cancer de la prostate (Parihar et al., 2003a; Parihar et al., 2003b), du sein (Ouadid-Ahidouch et al., 2004b) ou encore du cerveau (Fioretti et al., 2006). Il s'agit en particulier des canaux potassiques calcium-activés (K_{Ca}), voltage-activés (Shaker, EAG, HERG), les canaux potassiques modulés par la concentration intracellulaire d'ATP (K_{ATP}) et

et enfin, des canaux activés par une diminution du volume cellulaire (Pardo, 2004; Szabo et al., 2004). Le premier rapport indiquant que les canaux potassiques étaient liés à la prolifération cellulaire fut celui de Decoursey et ses collaborateurs en 1987. Ces auteurs ont montré que l'activation de la prolifération des lymphocytes T de souris par la concanavaline A était concomitante d'une augmentation de l'expression des canaux K^+ . Concernant le mode d'intervention de ces canaux potassiques dans la croissance cellulaire, une hypothèse a été formulée et selon laquelle le potentiel de membrane des cellules conditionne leur progression dans le cycle cellulaire (Ouadid-Ahidouch et al., 2004a). En effet les cellules épithéliales cancéreuses mammaires humaines (MCF-7) au début de la phase G1 sont dépolarisées alors qu'elles s'hyperpolarisent durant leur progression dans cette phase. Depuis ces travaux, le niveau d'expression et/ou l'activité de certains canaux K^+ a pu être corrélé avec les mécanismes de prolifération et d'apoptose des cellules cancéreuses.

De nombreuses tumeurs expriment également les canaux K^+ activés par le calcium intracellulaire (K_{Ca} , (Kunzelmann, 2005)) et certains contrôlent la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Nos travaux ont montré que l'ARNm correspondant au canal IK_{Ca1} est accrue en phase G1. Ces canaux sont fonctionnels dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes (Lignée LNCaP) et androgéno-indépendantes (Lignée PC-3) et contrôlent la prolifération cellulaire car leur blocage par des agents pharmacologiques (clotrimazole et TRAM-34) ainsi que par l'emploi de siRNA dirigés spécifiquement contre le canal IK_{Ca1} induit une accumulation des cellules en phase G1 ainsi qu'une diminution de la prolifération cellulaire. Toutefois, le canal IK_{Ca1} n'est pas uniquement associé à la prolifération des cellules cancéreuses : il régule aussi la prolifération des cellules saines comme il a été montré pour les lymphocytes activés (Khanna et al., 1999).

Des études récentes montrent l'implication des canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) à conductance intermédiaire (IK) dans la prolifération des lymphocytes T. En effet, Jensen et al (1999) (Jensen et al., 1999) ont constaté l'arrêt de la prolifération des lymphocytes T lorsqu'ils utilisaient des inhibiteurs des canaux IK. Cette observation suggère que ces canaux jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Parallèlement Ghanshani et al (2000) (Ghanshani et al., 2000) ont confirmé cette hypothèse en montrant que l'expression du canal IK_{Ca1} augmente durant l'activation des lymphocytes T passant de 8 à 300-800 canaux/cellule.

Par ailleurs, il a été démontré que les canaux potassiques de la famille EAG et les canaux potassiques de type IK sont surexprimés dans les cellules cancéreuses (Cherubini et al., 2000; Ghanshani et al., 2000). La participation des canaux potassiques dans l'oncogenèse

et la tumorigénèse a été suggérée par des travaux de Huang et Rane (Huang and Rane, 1994) qui montrent une association réciproque entre l'activité d'un canal et l'expression d'une protéine oncogène p21, qui joue un rôle important dans la croissance, la différenciation et la transformation oncogénique.

Les canaux potassiques peuvent être impliqués dans les voies de signalisation des facteurs protéiques modulant la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, il a été démontré que la prolactine (PRL) stimule la prolifération des cellules Nb2 du lymphome de rat (Wang et al., 1992). Par ailleurs, les travaux du Laboratoire ont montré que la PRL stimule l'activité des canaux potassiques (Prevarskaya et al., 1994; Prevarskaya et al., 1995). Il est donc vraisemblable que les intermédiaires de cet effet physiologique de la PRL soient les canaux potassiques. Des travaux récents au laboratoire de Physiologie Cellulaire ont montré que la PRL induit la prolifération des cellules prostatiques LNCaP. Cet effet de la PRL est inhibé par le TEA, un inhibiteur à spectre large des canaux potassiques, suggérant un rôle médiateur des canaux potassiques dans les effets de la PRL sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate humaine (Van Coppenolle et al., 2004a). Cependant, l'intervention de ces canaux ioniques (potassiques et calciques) dans les voies de signalisation des facteurs impliqués dans la croissance, l'angiogenèse, la migration et la métastase des cellules cancéreuses prostatiques humaines n'est pas encore connue. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés également aux rôles des canaux ioniques et du calcium dans les voies de signalisation des facteurs favorisant la survie/prolifération et la métastase des cellules cancéreuses prostatiques.

C- Intervention des canaux ioniques dans les voies de transduction des facteurs modulateurs de la prolifération cellulaire

Des peptides endogènes vasoactifs agissent à travers une grande variété de mécanismes sur le contrôle du tonus vasculaire et du flux sanguin périphérique. Certains de ces peptides, comme l'angiotensine II, la vasopressine et l'endothéline sont de puissants vasoconstricteurs agissant sur les muscles lisses et sur le système nerveux central.

La découverte de l'endothéline-1 (ET-1), un puissant vasoconstricteur peptidique libéré par les cellules endothéliales, a redonné un grand attrait à ces facteurs.

1- L'endothéline-1 (ET-1)

En 1985, Hickey et collaborateurs ont reporté l'existence d'un facteur vasoconstricteur peptidique dans des milieux conditionnés de culture cellulaire endothéliale bovine. La purification et l'identification de ce facteur ont été faites en 1987 : c'est un peptide constitué de vingt et un acides aminés incluant quatre cystéines formant deux ponts disulfures intramoléculaires. Ce peptide a été nommé **endothéline** (ET).

L'endothéline a été décrite comme un vasoconstricteur très puissant caractérisé par un temps d'action très long. Elle a été initialement notée comme induisant une augmentation de la pression sanguine ce qui suggérait qu'elle était impliquée dans les mécanismes de régulation de la pression sanguine. Par la suite, le gène de l'ET humain a été identifié et cela a permis de révéler l'existence de deux autres gènes de la même famille qui sont exprimés dans différents tissus et cellules. Ce peptide a été renommé ET-1, ayant été découvert en premier, et les deux autres respectivement ET-2 et ET-3. L'analyse de la séquence du cDNA de l'ET a révélé qu'il est produit par un précurseur, noté préproendothéline. Après le déplacement du signal peptidique au début de la biosynthèse conduisant au proET, ce nouveau précurseur est coupé par une endopeptidase spécifique pour conduire à une forme intermédiaire inactive, nommé big-ET. Celle-ci est à nouveau coupée par une enzyme, notée enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) pour donner l'ET. Les trois peptides (ET-1, ET-2 et ET-3) présentent entre eux une très forte homologie de séquence. Ils sont tous composés de 21 acides aminés dont 4 cystéines liées deux à deux par des ponts disulfures dans les mêmes positions et une partie C-terminale hydrophobe identique sous la forme d'un hexapeptide. L'ET-2 ne diffère de l'ET-1 que par deux résidus amino-acides et l'ET-3 par six. De plus, ils présentent aussi une ressemblance, à la fois de structure et d'activité, avec les safarotoxines, famille isopeptidique isolée à partir de venin du serpent *Atractaspis engaddensis*. Ces deux familles de peptides utilisent des récepteurs communs pour donner lieu à de multiples effets et les safarotoxines ont été un outil pour la caractérisation des ETs. Les ETs ont un rôle important dans de nombreux domaines, comme par exemple dans la régulation du tonus musculaire, dans des maladies cardiaques, en tant que vasoconstricteurs, etc..... Cependant c'est l'ET-1 qui est le vasopeptide prépondérant aussi bien en terme de production qu'en terme d'activité biologique. Nous étudierons ultérieurement le rôle pathophysiologique de ce peptide endogène. Nous pouvons tout de même voir que l'ET-1 est en partie responsable des contractions des muscles lisses vasculaires et de la prolifération des cellules de ces mêmes

muscles. Nous avons relevé que pour certains de ces effets, des récepteurs spécifiques sont mis en jeu.

De même, deux récepteurs (ET_A et ET_B) ont également été découverts, comportant 68% d'homologie entre eux et permettant l'activité biologique des ETs. Ils appartiennent tous les deux à la famille des récepteurs couplés à la protéine G. Leur taille est de 45000 à 50000 daltons et leur localisation est assez variée. Ils présentent une structure classique de récepteurs couplés à la protéine G, à savoir 7 hélices transmembranaires séparées par trois boucles extracellulaires et trois boucles cytoplasmiques avec une région C-terminale cytoplasmique et une région N-terminale extracellulaire relativement longue. Leurs séquences peptidiques présentent environ 50% d'homologie, les principales différences étant localisées dans le domaine N-terminale, dans la partie C-terminale et dans les boucles extracellulaires.

●- Le récepteur ET_A (ET_AR)

Le gène codant pour le récepteur ET_AR est localisé sur le chromosome 4 et le cDNA correspondant code pour un peptide constitué de 427 acides aminés. La structure de ce récepteur est donc classique. Le mRNA de ce récepteur est fortement exprimé dans les cellules des muscles lisses et dans les myocytes cardiaques alors qu'il ne l'est pas dans les cellules endothéliales. Il permet l'action vasoconstrictive de l'ET-1. Ce récepteur est préférentiellement activé par l'ET-1, plus faiblement par l'ET-2 et pas du tout par l'ET-3. Il reconnaît en fait la partie N-terminale des peptides ETs, ce qui explique en partie la non reconnaissance de ET-3 qui se différencie des deux autres par des changements dans cette zone. L'ET_AR est largement distribué dans les vaisseaux ombilicaux, la glande parathyroïde, le myomètre, les bronches, l'artère pulmonaire, la peau, le myocarde, le cerveau, le poumon, l'estomac et l'aorte. Il est également présent, mais de manière moins importante que l'ET_B dans le foie, le système surénalien et les reins.

●- Le récepteur ET_B (ET_BR)

Le gène codant pour le récepteur ET_BR est localisé sur le chromosome 13 et le cDNA correspondant code pour un peptide constitué de 442 acides aminés. La structure de ce récepteur est très proche de celle de l'ET_AR puisqu'elle présente entre 55 et 64% d'homologie. Le mRNA de ce récepteur est le plus fortement exprimé dans les cellules

endothéliales où il permet la vasodilatation. Il est aussi exprimé dans les muscles lisses vasculaires où il accentue le phénomène de vasoconstriction obtenue par le biais de l'ET_AR. Ce récepteur n'est pas sélectif pour les ETs ni pour les safarotoxines. Il reconnaît la partie C-terminale, peu différente, de ces peptides. L'ET_B est largement distribué dans le placenta, les reins, la glande parathyroïde, les poumons, le cœur, le foie, la peau, le myocarde, le système atrioventriculaire, l'artère coronarienne, l'hippocampe, le cerveau, le corps spinal, les reins et le système surénalien. Il est également présent mais de manière moins importante que l'ET_AR dans l'aorte, le poumon et l'estomac.

2- Endothéline-1 et Cancer

Il a été montré que l'endothéline-1 possède une activité mitogène et pro-angiogénique. Elle agit sur les différentes étapes de la progression tumorale, et l'utilisation d'antagonistes spécifiques de leurs récepteurs ou d'inhibiteurs de leur synthèse, est efficace pour ralentir la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles animaux.

2.1– Expression du système endothéline-1 dans les tumeurs

L'endothéline-1 (ET-1), l'isopeptide le plus étudié du système endothéline, est d'abord caractérisé par sa vasoactivité. De nombreuses études ont illustré son effet sur diverses fonctions cellulaires dont la prolifération. Dans le système endothéline, les deux récepteurs (ET_AR et ET_BR) transmettent des effets vasoactifs opposés : vasoconstriction couplée à l'ET_AR dans les cellules musculaires lisses, vasodilatation couplée à l'ET_BR dans les cellules endothéliales. En revanche, tous les deux sont capables de relayer l'effet mitogène de l'ET-1. Pour la première fois en 1995, une étude a suggéré que l'ET-1 pouvait être impliquée dans le cancer de la prostate (Nelson et al., 1995a). Depuis, l'expression de plusieurs composants du système ET-1 a été mise en évidence dans différents tissus cancéreux (Tableau 16).

Tissu	ET _A R	ET _B R	Références bibliographiques
Os	+	+	(Clines et al., 2007)
Ovaire	++	-	(Bagnato et al., 2005) (Bagnato and Rosano, 2007)
Peau	-	++	(Bagnato et al., 2004) (Kefford et al., 2007)
Poumon	-	+	(Boldrini et al., 2005)
Prostate	++	-/+	(James, 2007; Jimeno and Carducci, 2006; Nelson et al., 1995a)
Rein	+	-	(Pflug et al., 2007)
Sein	++	-	(Namazi et al., 2008)
Utérus	++	-	(Pekonen et al., 1995)

Tableau 16 : Expression des récepteurs de l'endothéline-1 dans différents tissus tumoraux (+/- : faiblement exprimé, + : exprimé, ++ : surexprimé, - : non exprimé)

Récemment, il a été observé une expression nucléaire des récepteurs d'ET-1 dans les cellules tumorales de gliomes : ET_B-R dans les oligodendrogliomes, et ET_A-R dans les glioblastomes (Egidy G et al., 2000). Outre une élévation de la synthèse du peptide, une régulation positive de l'expression du récepteur est couramment observée. C'est ainsi qu'une augmentation de l'expression de composants du système ET-1 a pu être reliée au caractère invasif de certaines tumeurs (adénome colorectal, cancers du sein et de la prostate) notamment le ET_AR (**Figure 37**). Outre les cellules tumorales, l'endothélium des vaisseaux intratumoraux exprime également ET_AR et ET_BR, qui participent à l'angiogenèse associée à la progression tumorale.

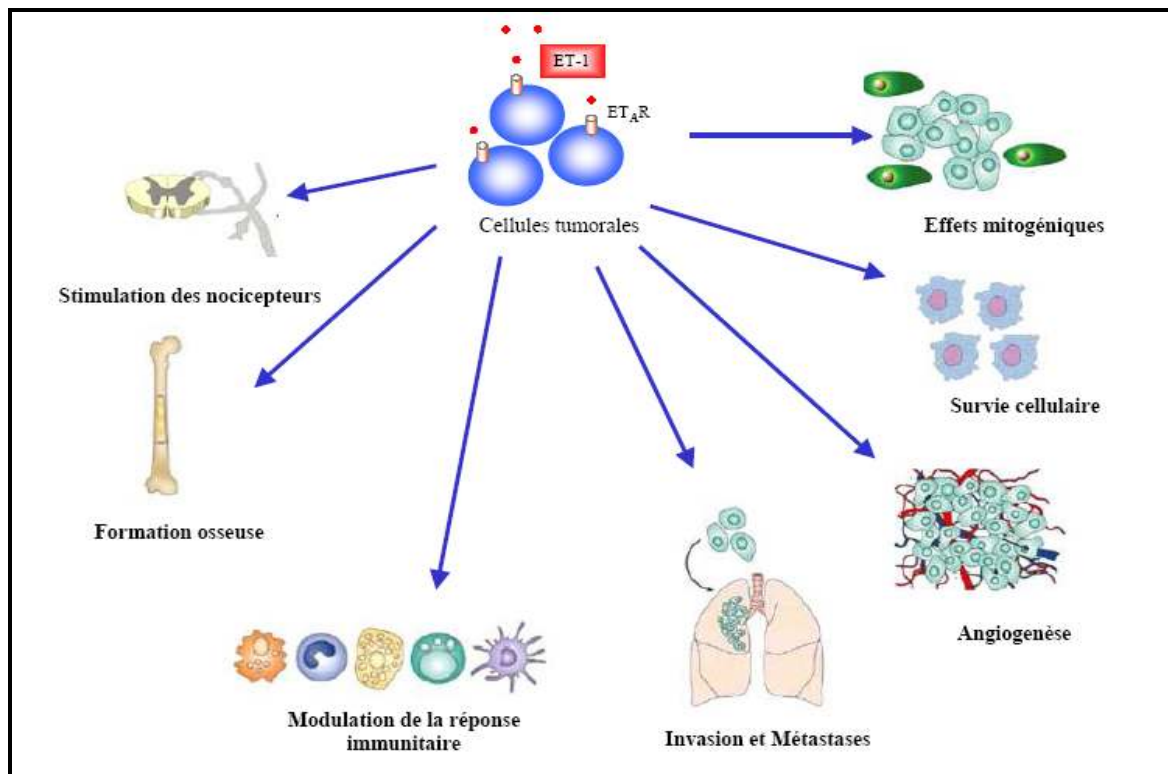


Figure 37 : Le récepteur de type A ($ET_A R$) du système endothéline-1 est impliqué dans de nombreux aspects de la croissance tumorale.

2.2- Mécanismes d'action de l'endothéline-1 sur la croissance tumorale et l'angiogenèse

• ET-1 et croissance tumorale

L'ET-1 a une action mitogène ou anti-apoptotique sur de nombreux types cellulaires (ovaire, peau, prostate, sein, côlon et système nerveux) (Anguelova et al., 2005; Grant et al., 2003; Nelson et al., 2003a). Comme d'autres récepteurs mitogènes, l'ET-1 induit l'activation de la voie ERK, dont le rôle sur la croissance tumorale est bien documenté. D'autres voies de signalisation, parmi lesquelles les voies PI3K/Akt et FAK, sont également impliquées dans les effets des récepteurs de l'ET-1 sur la prolifération, la survie et la migration cellulaire (**Figure 38**). ET-1 agit également en tant que puissant agent mitogène au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire (Bras-Silva and Leite-Moreira, 2008; Chua et al., 1992), des myocytes cardiaques (Bogoyevitch et al., 1993a; Bogoyevitch et al., 1993b; Bras-Silva and Leite-Moreira, 2008) et d'autres types cellulaires en culture. Toutefois, bien que ET-1 ait de grandes propriétés mitogènes, ses capacités demeurent relativement faibles lorsqu'on les compare à celles d'autres agents mitogènes comme le EGF (Stewart et al., 1994). Les effets de ET-1 sont décuplés lorsque ce peptide agit en tant que co-mitogène. ET-1 est, par conséquent, un très puissant co-mitogène de EGF et d'autres facteurs de croissance (Battistini et al., 1993). ET-1

induit également l'expression de plusieurs proto-oncogènes (c-fos, c-myc, c-jun) (Lee et al., 2008; Rauh et al., 2008; Simonson and Herman, 1993).

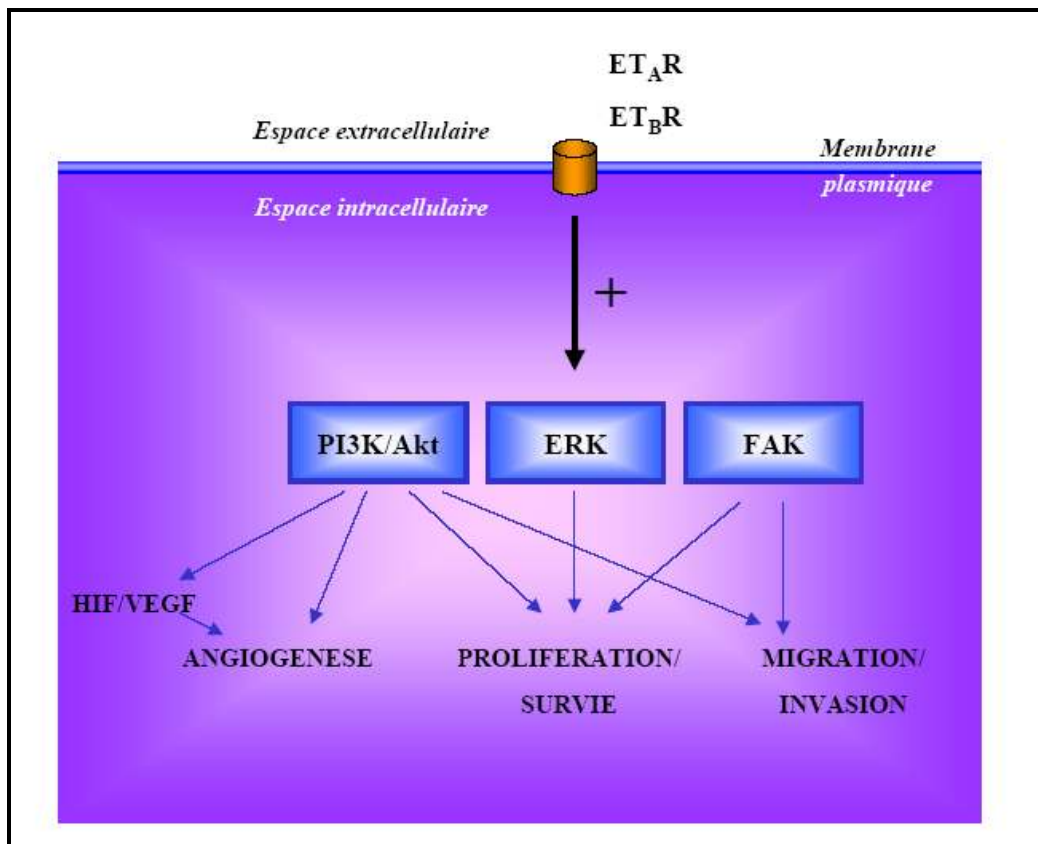


Figure 38 : Principales voies de signalisation intracellulaire, couplées aux récepteurs de l'endothéline (ET-1), impliquées dans la progression tumorale. Les récepteurs d'ET-1 (ET_AR et ET_BR) sont couplés positivement aux voies ERK (extracellular signal regulated kinase), PI3K (phospho-inositide 3 kinase)/Akt, et FAK (focal adhesion kinase).

• ET-1 et angiogenèse

Parallèlement aux facteurs angiogéniques tels que le VEGF (vascular endothelium growth factor), l'ET-1 apparaît désormais aussi comme un des acteurs de l'angiogenèse (Bagnato and Spinella, 2003). L'ET-1, en agissant directement sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de son récepteur est capable de moduler *in vitro* les étapes précoces de l'angiogenèse (prolifération, migration, invasion, production de métalloprotéases spécifiques de la matrice extracellulaire-MMP), mais aussi l'étape plus tardive de tubulogenèse. Il faut en outre noter que l'ET-1 stimule directement l'angiogenèse tumorale *via* la production de VEGF, aussi bien par les cellules tumorales que par les cellules endothéliales. Cela implique notamment l'induction d'HIF-1 α , le facteur de réponse à l'hypoxie (Hypoxia induced factor) contrôlant la production de VEGF. Réciproquement, le VEGF induit la sécrétion d'ET-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, conduisant à une boucle d'auto-

amplification de la production de ces facteurs pro-angiogéniques. Finalement l'ET-1 est sécrétée en réponse à plusieurs stimuli associés au processus tumoral (hypoxie, cytokines inflammatoires, facteurs de croissance), et peut agir de concert avec le VEGF sur les différentes étapes de l'angiogenèse.

2.3- Approches thérapeutiques

Le système ET-1/ET_AR est depuis plusieurs années une cible thérapeutique dans le domaine de l'hypertension, en liaison avec leur activité vasoconstrictive. L'utilisation des antagonistes des récepteurs ET_AR fait désormais parti de protocoles cliniques établis. Plus récemment, ces mêmes antagonistes ou inhibiteurs ont montré une activité antitumorale dans des modèles précliniques et dans plusieurs essais cliniques.

Plusieurs modèles *in vivo* ont démontré le rôle d'antagonistes spécifiques des récepteurs ET_AR et ET_BR dans différentes étapes de la carcinogenèse : croissance tumorale, angiogenèse et formation de métastases ([Tableau 17](#)).

Tumeurs	Antagonistes ET _A R	Antagonistes ET _B R
Côlon	Bosentan	Bosentan
Foie	BQ123	—
Os	Atrasentan BQ123	—
Prostate	Atrasentan YM 598 AZD4054 BQ123	BQ788
Sein	BQ123	BQ788

Tableau 17 : Traitements antitumoraux *in vivo* par des antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1 (ET_AR et ET_BR).

L'effet bénéfique d'antagonistes des récepteurs d'ET-1 sur le développement de diverses tumeurs (Nelson et al., 2003a) a ainsi été montré dans des modèles syngéniques : un antagoniste d'ET_AR (BQ123) permet de réduire la croissance de tumeurs hépatiques, tandis qu'un antagoniste d'ET-1 (bosantan) ralentit l'évolution d'adénocarcinomes du côlon vers un grade plus élevé. De plus le blocage des récepteurs d'ET-1 peut conduire à une inhibition de l'angiogenèse, comme cela a été mis en évidence, avec un antagoniste d'ET_AR (ABT-627), pour des carcinomes ovariens dans un modèle de xénogreffe. Dans un modèle de xénogreffe

de cellules de sarcomes de Kaposi, l'invasion et la croissance tumorales sont également ralenties par l'utilisation d'un antagoniste non sélectif des récepteurs d'ET-1 (A-182086), du fait de l'inhibition de la production de MMP-2 et MMP-9 (Rosano et al., 2003). Les cancers du sein et de la prostate à un stade avancé produisent souvent des métastases osseuses dont la formation est dépendante d'ET-1 (Chiao et al., 2000; Yin et al., 2003) : un rôle inhibiteur de l'antagoniste d'ET_AR (ABT-627) a été mis en évidence dans des modèles expérimentaux (Yin et al., 2003).

Des essais cliniques impliquant l'inhibition du système ET-1 ont récemment été menés dans le contexte de thérapies antitumorales. Le traitement du cancer de la prostate par administration orale d'un antagoniste d'ET_AR, l'atrasentan (actuellement en phase d'essai clinique III), constitue ainsi un véritable progrès (Nelson et al., 2003b). Ces premières données suggèrent que l'utilisation d'antagonistes spécifiques de sous-types de récepteurs d'ET-1 pourrait être élargie aux différentes tumeurs exprimant ET_AR ou ET_BR. De plus on peut supposer que l'action inhibitrice de ces antagonistes sur l'angiogenèse pourrait également contribuer à ralentir la progression tumorale.

▫ Conclusion

De manière remarquable, l'ET-1, peptide connu pour son activité vasoactive présente également une activité mitogène et pro-angiogénique par l'intermédiaire de ses récepteurs. Outre leur expression sur l'endothélium vasculaire, les récepteurs du système ET-1 présentent un profil d'expression particulièrement large, et peuvent être impliqués dans le développement tumoral de différents tissus ou types cellulaires. L'utilisation d'antagonistes mixtes pour ET_AR et ET_BR pourrait permettre de cibler à la fois la croissance et l'angiogenèse tumorales. De fait, le blocage du système commence à donner des résultats encourageants en monothérapie antitumorale.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIF

Le cancer de la prostate est la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme. Malgré les approches thérapeutiques (hormonales ou non), l'efficacité des traitements reste médiocre. Actuellement, les traitements des cancers de la prostate consistent à réduire au maximum le taux des androgènes circulants. Bien que ces traitements soient très efficaces à court terme, ils restent inefficaces à long terme, ces cancers devenant androgéno-indépendants. Il est donc évident que d'autres facteurs non androgéniques interviennent. L'étude de ces facteurs permettrait à terme de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques pour traiter le cancer de la prostate humaine.

Il est bien établi que **les conductances ioniques et le calcium intracellulaire** sont des éléments importants des cascades d'événements conduisant à la prolifération et/ou au déclenchement de l'apoptose. Malgré ces connaissances aucune approche thérapeutique ciblant les canaux ioniques n'est utilisée dans le traitement des cancers de la prostate humaine.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles des canaux potassiques, qui constituent une superfamille multigénique, et du calcium, second messager ubiquitaire, dans la prolifération et la différenciation neuroendocrine des cellules prostatiques. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux canaux potassiques activés par le calcium intracellulaire. En effet, des études récentes montrent l'implication de ces canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) et plus particulièrement celui à conductance intermédiaire (IK_{Ca1}) dans la prolifération des différents systèmes cellulaires comme notamment dans les cellules cancéreuses mammaires (Ouadid-Ahidouch et al., 2004), pancréatiques (Jäger et al., 2004) et dans les lymphocytes T humains (Jensen *et al.* ; 1999 ; Fanger *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été démontré que les canaux potassiques de type IK_{Ca1} sont surexprimés dans le cancer (Ghanshani *et al.*, 2000 ; Jäger et al., 2004). **Cependant, l'expression, la fonctionnalité de ces canaux potassiques de type IK_{Ca1} et leur implication dans la croissance des cellules prostatiques humaines demeurent inconnues.**

L'un des mécanismes d'intervention des canaux potassiques sur la physiologie des cellules prostatiques pourrait passer par la modulation de l'entrée du calcium en favorisant la force électromotrice pour cet ion. Cette entrée de calcium joue un rôle majeur dans la régulation et le contrôle des événements cellulaires conduisant à la prolifération, à la différenciation ou à l'apoptose. De plus, les canaux potassiques pourraient être impliqués dans les voies de signalisation calciques des agonistes impliqués dans la cancérogenèse et/ou métastase des cellules cancéreuses prostatiques.

Dans ce contexte, le projet de recherche de ma thèse s'articule en 3 points :

- *L'étude de l'expression, de la fonctionnalité du canal potassique IK_{Ca1} dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines ainsi que son implication dans la prolifération de ces cellules.* Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes également intéressés aux mécanismes par lesquels ce canal intervient dans la croissance cellulaire.

- *L'étude de l'implication du canal potassique calcium-dépendant IK_{Ca1} dans la différenciation neuroendocrine des cellules androgéno-dépendantes LNCaP.* Dans cette partie du travail, nous avons abordé également l'implication des facteurs de transcription dans la régulation de l'expression du canal IK_{Ca1} lors de l'induction de la différenciation neuroendocrine.

- *L'étude de la participation du canal calcium-dépendant IK_{Ca1} dans les voies de transduction de l'endotheline-1 (ET-1), un facteur impliqué dans la cancérogenèse de la prostate humaine ainsi que dans les métastases des cellules cancéreuses.* Dans ce contexte, nous avons étendu nos investigations à l'étude d'autres canaux potassiques calcium-activés ainsi que les canaux calciques de la famille des TRP.

MATERIELS ET METHODES

Nous allons décrire dans cette partie les différentes techniques utilisées dans les articles, mais également de façon plus générale, au cours de la thèse. Les travaux d'électrophysiologie reportés dans ce manuscrit sont le fruit de collaborations internes. Le « Matériel et méthode » relatif à chaque article est associé à ce dernier dans la partie « Résultats », ce chapitre présente globalement l'ensemble des techniques utilisées au cours de la thèse.

1- Culture cellulaire

1.1- Lignées cellulaires

Au cours de ces travaux, plusieurs types cellulaires ont été utilisés :

- Les cultures primaires issues de prélèvements chirurgicaux de tissus prostatiques humains (hyperplasies bénignes et cancers de la prostate).
- La lignée prostatique cancéreuse androgéno-dépendantes LNCaP provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'une lignée établie à partir d'une biopsie d'un ganglion sous-axillaire métastasé prélevé sur un homme de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes, sont caractérisé par leur androgéno-dépendance et nécessitent donc la présence d'androgènes dans leur milieu de culture. Ces cellules expriment également le PSA (**p**rostate **s**pecific **a**ntigen).
- La lignée prostatique cancéreuse androgéno-indépendantes PC-3 provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elle est établie à partir d'une métastase localisée au niveau des vertèbres lombaires d'un patient caucasien âgé de 62 ans présentant un adénocarcinome prostatique peu différencié. Les cellules PC-3 n'expriment ni le PSA, ni le récepteur aux androgènes (AR). Ces cellules sont capables de former chez l'animal une tumeur extrêmement agressive *in vivo* comme *in vitro* et qui est caractérisée par son hormono-insensibilité. Les cellules PC-3 ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes. Ces cellules présentent le phénotype des cellules épithéliales intermédiaires précoces.
- La lignée HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293) qui est une lignée transformée dérivant de cellules rénales corticales d'embryon humain.

1.2- Condition de culture

Les lignées LNCaP et PC-3 sont cultivées dans le milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-glutamine (5mM, Sigma, L'Isle d'Abeau, France) et

en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%, Seromed, Strasbourg). La lignée HEK293 est cultivée dans le milieu DMEM-HG (Gibco) supplémenté en L-glutamine (5mM) et en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%) et en acides aminés non-essentiels.

Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie en 5% de CO₂. Lorsque ces cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont décollées par une brève trypsinisation (trypsine-EDTA, 0.25%, ICN, USA). En effet, la trypsine est une enzyme qui a pour but de digérer les protéines de surface des cellules leur permettant de s'attacher aux supports. Elle permet ainsi de détacher les cellules cultivées dans les flacons. L'effet de la trypsine est inhibé par l'ajout de milieu de culture complet et les cellules sont placées dans de nouveaux flacons de culture T25 à 25 000 cellules/ml. Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les jours.

Les cellules dérivées de cultures primaires sont principalement cultivées dans le milieu KSF-SFM (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-Glutamine (5mM), en sérum de veau fœtal décomplémenté (2%), en extrait pituitaire bovin et en « epidermal growth factor » (EGF). Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de CO₂. Lorsque ces cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont décollées par l'incubation dans une solution de PBS-EDTA (0,56 mM) et ensemencées selon les expériences envisagées dans des boîtes de pétrie (électrophysiologie, RT-PCR) ou sur des lamelles de verres (imagerie calciques) ou dans des flacons T25 ou T75 (extraction protéique). Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les jours.

1.3- Préparation du milieu déstéroïdé

La solution de sérum de veau fœtal (Seromed, Strasbourg) additionné de charbon actif (100g/L, Charcoal activated, SIGMA) à une concentration de 100g/L est laissé toute la nuit, à 4°C, sous agitation. Ensuite, la solution est centrifugée (2500×g, 30 minutes) à 4°C afin d'éliminer le maximum de charbon actif. Dans le but de purifier le sérum, on procède par deux étapes de centrifugation. La première pendant 30 minutes à 10, 000×g à 4°C et la seconde pendant 20 minutes à 10 000×g à 4°C. Le sérum est ensuite filtré (filtres de 0,22µm de diamètre) sous la hotte aspirante. Le sérum ainsi obtenu est conservé sous forme d'aliquots à -20°C.

1.4- Conservation des cellules (Congélation/Décongélation)

Après trypsinisation, environ 1 million de cellules sont reprises dans 1 ml de milieu de congélation, puis transférés dans une ampoule de congélation. Ce milieu de congélation est

composé environ de 45% de milieu de culture frais et complet auquel s'ajoute 45% de milieu conditionné de la lignée, filtré deux fois et 10% de DMSO. Les ampoules subissent des paliers de températures décroissantes (de +4°C 1h, -20°C 2h à -80°C puis azote liquide) et stockées. L'isolation des tubes du froid par l'isopropanol permet au milieu cellulaire de perdre environ 1°C par minute, permettant un lent refroidissement. La conservation à -80°C est utilisée pour les ampoules de cellules servant à une décongélation régulière afin de renouveler les lignées utilisées. La congélation à long terme est réalisée en stockant les ampoules dans un container à azote liquide après les avoir laissées environ une semaine à -80°C.

Afin de décongeler les cellules, les ampoules sont plongées dans un bain-marie préalablement chauffé à +37°C jusqu'à décongélation de la suspension cellulaire. Par la suite, les cellules sont transférées dans un tube de 15ml contenant 5ml de milieu complet. L'ensemble est centrifugé (5min à 800×g) afin de séparer les cellules du milieu de culture et d'éliminer le surnageant contenant du DMSO. Les cellules sont ensuiteensemencées dans un nouveau récipient contenant du milieu complet.

1.5- Induction de la différenciation neuroendocrine

L'induction de la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP peut se faire soit par déprivation andogénique en utilisant un sérum de veau fœtal préalablement déstéroïdé et d'un milieu RPMI sans rouge de phénol soit par l'utilisation de l'AMPc (1mM) et de l'IBMX (100µM) pendant 48 à 72 heures.

2- Mesure microfluorimétrie du Ca^{2+} libre intracellulaire

De nombreuses sondes fluorescentes permettant de mesurer la concentration en ions calciques libres ont été synthétisées depuis l'introduction par Tsien et ses collaborateurs de la sonde Quin2 en 1982 (Tsien et al., 1982). Pour notre travail, nous avons utilisé la sonde calcique Fura-2 pour les mesures des variations du calcium cytoplasmique.

2.1- Caractéristiques de la sonde calcique de la sonde Fura-2

Le fura-2 est un composé dérivé du fluorophore stilbène possédant quatre fonctions carboxyles dont l'arrangement spatial octacoordonné est caractéristique des chélateurs de calcium tel que l'EGTA et le BAPTA (Grynkiewicz et al., 1985).

Dans notre étude, nous avons utilisé le Fura-2 sous la forme lipophile et non chargée d'acétoxyméthylester de Fura-2 ou Fura-2/AM, qui peut pénétrer dans la cellule où des

estérases cytoplasmiques libèrent par hydrolyse le Fura-2 acide dont la fluorescence est proportionnelle à la concentration en calcium libre.

La liaison du calcium sur la molécule de Fura-2 libre provoque un déplacement du spectre d'excitation sans modification du spectre d'émission (Grynkiewicz et al., 1985). Le Fura-2 libre de calcium présente un pic d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 380\text{nm}$ (F380) alors que le Fura-2 saturé en calcium présente un pic d'émission de fluorescence pour une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 340\text{nm}$ (F340). Le pic de fluorescence est mesuré dans tous les cas à 510nm. Ainsi, une augmentation de calcium se traduit par une augmentation de l'émission de fluorescence à 510nm lorsque le Fura-2 est excité à 340nm et par une diminution de l'émission de fluorescence à 510nm lorsque le Fura-2 est excité à 380nm. De cette façon, le rapport de la fluorescence mesuré pour ces deux longueurs d'onde d'excitation peut-être calculé et utilisé comme une mesure directe du calcium libre après calibration du système.

2.2- Equipement optique

Cet équipement optique est composé d'un microscope à épifluorescence (Olympus IX 70), d'une lampe au xénon (Applied Imaging, GB), d'une caméra digitale CCD (Charge Coupled Device) 12 bits (MicroMax 5 MHz, Princeton), d'un ordinateur dont le logiciel MetafluorS (Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images.

La lampe au xénon émet de la lumière dont la longueur d'onde est réglée à l'aide d'un filtre monochromateur (Fill Photonics). Les UV cheminent *via* une fibre optique et traversent les miroirs dichroïques : les signaux à 380 et 340 nm provenant du monochromateur sont orientés spécifiquement vers la préparation cellulaire, tandis que le signal de réponse à 510 nm, provenant de la préparation cellulaire, est orienté spécifiquement vers la caméra digitale. Les signaux lumineux à 510nm sont capturés par la caméra CCD et convertis en signaux numériques qui sont quantifiés par le système d'analyse et visualisés en fausse couleur en fonction de leur intensité lumineuse sur l'écran de l'ordinateur (gamme allant du bleu au rouge, respectivement pour des concentrations basses à élevées en calcium intracellulaire). La fréquence d'échantillonnage moyenne utilisée est d'une image toutes les 5 secondes.

2.3- Calibration des signaux de fluorescence

Après soustraction des signaux de fluorescence, la formule suivante décrite par Grynkiewicz :

$$[Ca^{2+}] = Kd * \beta * (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

Cette équation nous permet de calculer la concentration de calcium intracellulaire avec :

Kd : constante de dissociation du complexe Fura2-calcium, calculé par Grynkiewicz (Grynkiewicz et al., 1985), égale à 225nM. Cette constante n'est pas affectée de façon notable par des changements de pH et de la concentration en magnésium dans la gamme physiologique. **R** : rapport des intensités de fluorescence (F340/F380). **R_{max}** : rapport maximum F340/F380 lorsque le Fura-2 est saturé en calcium. **R_{min}** : rapport maximum F340/F380 lorsque le Fura-2 est sous forme libre. **β** : rapport du signal fluorescent, pour une longueur d'onde $\lambda = 380$ nm, en absence de calcium et à saturation : F380 fura-2 libre/ F380 fura-2 saturé. Le calcul des constantes de calibration (R_{min}, R_{max} et λ) se fait par exposition des cellules chargées en Fura2/AM à 5μM de ionomycine (ionophore calcique qui permet d'égaliser les concentrations intra et extracellulaires en calcium) en présence de 10mM d'EGTA pour la détermination du R_{min} ou de 10mM de CaCl₂ pour la détermination du R_{max}.

2.4- Milieu d'enregistrement

Nous utilisons pour les mesures de calcium un milieu extracellulaire HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) contenant, en mM, NaCl (142.6), KCl (5.6), Na₂HPO₄ (0.34), KH₂HPO₄ (0.44), Glucose (5.6), NaHCO₃ (4.2), HEPES (10). La solution standard : HBSS 2Ca²⁺ est obtenue par l'addition de 2mM de CaCl₂ et de 1mM de MgCl₂ alors que la solution sans calcium HBSS 0Ca²⁺ est obtenue par l'addition de 3mM de MgCl₂ ; ces solutions sont utilisées à pH 7,3-7,4.

2.5- Charge des cellules en Fura-2

Les cellules cancéreuses prostatiques sont chargées pendant 45 minutes, à 37°C avec 1μl de Fura-2/AM. Pour cela le milieu de culture est remplacé par une solution de HBSS contenant 2μM de Fura-2. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 45 minutes. Une fois le temps de charge écoulé, on procède à 3 rinçages successifs avec le milieu HBSS contenant 2mM de Ca²⁺ (HBSS 2 Ca²⁺).

Chaque cellule présente alors une charge relativement homogène indiquant ainsi que le fura-2 ne pénètre pas dans les organites intracellulaires connus pour stocker le calcium

interne. Les données brutes d'imagerie calcique sont ensuite analysées en utilisant le logiciel d'analyse Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA) et présentées sous forme d'une variation du calcium intracellulaire en fonction du temps.

3- Mesure de la viabilité cellulaire

La mesure de viabilité cellulaire est effectuée en utilisant le kit de mesure de prolifération (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay). C'est une méthode colorimétrique déterminant le nombre de cellules viables. Le kit de dosage est composé de MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Le MTS est réduit par les cellules en formazan (soluble dans le milieu de culture) par des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite, mesurée par son absorbance à 490 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture.

4- Transfection transitoire

4-1- Lipofection

Les transfections par des siARN (petits ARN interférants) ([Tableau 18](#)) par lipofection furent réalisées avec Hiperfect (HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen). Selon la procédure conseillée par le fournisseur et pour un volume final de 1.5ml, la solution d'Hiperfect (6µl) d'abord mélangé avec la quantité de siARN (20nM) et du milieu de culture sans sérum (qsp 100µl). Après 5 minutes d'incubation à la température ambiante permettant la formation du complexe de transfection, cette solution est mélangée avec 1.4ml de milieu de culture complet. Finalement, le mélange est déposé sur les cellules. Après environ 10 heures d'incubation, un volume de milieu complémenté est ajouté sur les cellules pendant une demi-journée. Le milieu est ensuite remplacé par du nouveau milieu complémenté. Les cellules peuvent alors être utilisées dans les 24 à 72 heures suivantes.

siARN	Sequence
IK _{Ca1}	(1) UGUAAAGCUUGGCCACGAAC
	(2) CCUGUUCCUGGUAAAUGC
BK _{Ca}	GAGUCCUGGUGUCUAGU
TRPV6	GACUCUCUAUGACCUCACA
TRPC1	GGGUGACUAUUAUAUGGUU
Orai-1	UGAGCAACGUGCACAAUCU

[Tableau 18](#) : Liste des siARN utilisés

4-2- Nucléofection

La « nucleofection » est une technique de transfection par d'électroporation (au moyen du nucleofector) récemment mise au point par la société Amaxa. Cette technique permet de transférer du matériel nucléaire directement dans le noyau des cellules en suspension. Après le détachement des cellules par trypsinisation, 2 millions de cellules repris dans 100µl de tampon de nucleofection (variant suivant le modèle cellulaire) sont transférées dans une cuve d'électroporation. L'ADN plasmidique (1-3µg) contenant le gène d'intérêt est alors directement ajouté dans l'homogénat et l'ensemble est soumis à la nucléofection. Les cellules sont alors reprises dans leur milieu de culture etensemencées selon les expériences envisagées. Dans le but de contrôler la réussite de la nucléofection, les cellules sont transfectées dans les mêmes conditions avec 1-3µg du vecteur pmaxGFP dont l'expression et l'émission de fluorescence permet de contrôler l'efficacité de la transfection. Ce vecteur va permettre la production de la protéine GFP que l'on peut visualiser par fluorescence verte (Figure 32). Les expériences envisagées suite à ces transfections sont réalisées 48 à 72 heures après la nucléofection. Le tableau (Tableau 19) suivant regroupe les paramètres de nucléofection utilisés pour chaque type cellulaire :

Lignée cellulaire	Tampon	Programme de nucléofection
LNCaP	R	T009
PC-3	V	T013

Tableau 19 : Paramètres (Tampon et Programme) des nucléofections réalisées sur les cellules LNCaP et PC-3

Comme le montre la figure 39, dans ces conditions de transfection, les cellules sont transfectées à 80 à 90%. Les cellules ont un taux de mortalité de 10 à 20%.

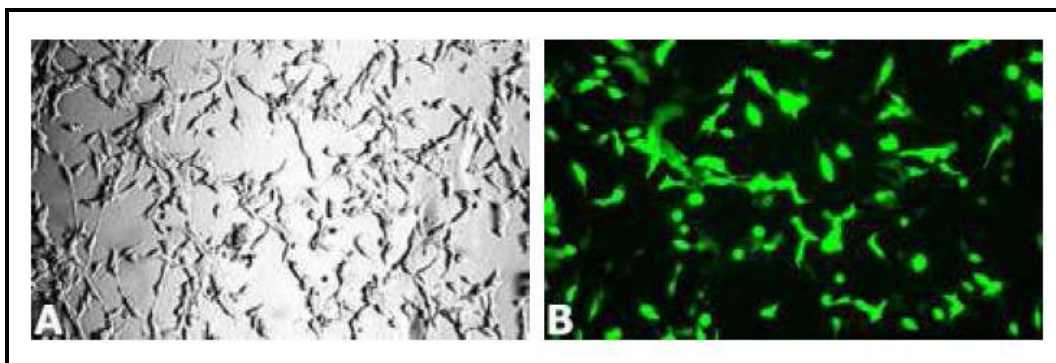


Figure 39 : Les cellules LNCaP (ATCC) sont transfectées en utilisant "the Cell Line Nucleofector Kit R" avec le programme T-09 et 2 μg du vecteur pmaxGFP. 24 heures après la nucléofection, on étudie l'expression de la GFP en microscopie à fluorescence (B) par rapport à la microscopie classique (A).

5- Les études d'expression des ARN messagers (ARNm)

5.1- Extraction des ARNm

Les ARN totaux des cellules sont extraits selon la méthode décrite par Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Brièvement, les cellules sont détachées du support et collectées dans le tampon contenant de l'EDTA (0,54mM) (PBS/EDTA). Les cellules en suspension sont transférées dans un tube de 1,5ml puis, lysées dans la solution D (voir « Annexes »). Les ARN sont extraits de ce lysat cellulaire en ajoutant de l'acétate de sodium (90mM) avec un volume d'une solution de phénol-chloroforme/alcool isoamylalcool (AIA) (voir « Annexes »). L'extraction est réalisée pendant 10 minutes dans la glace. Une centrifugation ($10000\times g$, 10 minutes, 4°C) permet la séparation d'une solution aqueuse d'ARN totaux. Cet extrait d'ARN est concentré à l'aide d'acétate de sodium 3M ($1/10^{\text{ème}}$ de volume) et d'éthanol 95% (2 à 2,5 volumes) à -20°C pendant la nuit. Les ARN précipités sont recueillis à l'aide d'une centrifugation ($10\ 000\times g$, 30 minutes) puis lavés à l'éthanol 75% pendant 30 minutes à 4°C . Après l'élimination de l'éthanol à l'air libre, les ARN sont repris dans de l'eau puis, dosés au spectromètre à 260 nm pour les acides nucléiques et à 280 nm pour les protéines. La qualité de l'extraction est jugée satisfaisante si le rapport $260/280 \geq 1,8$ et la qualité des ARN extraits est contrôlée sur gel d'agarose de 1.5%.

5.2- Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNaseI)

Une quantité d'ARN (1 à $2\mu\text{g}$) est traitée à la DNaseI dépourvue d'activité RNAsique afin d'éliminer l'ADN génomique. Dans le but d'inactiver la DNase I, l'EDTA est ajouté à ces échantillons d'ARN à une concentration finale de 2,5mM puis l'ensemble est chauffé à 65° pendant 10 minutes. La reverse transcription est ensuite réalisée en ajoutant du tampon

10x (sans Mg^{2+}), $MgCl_2$ (2,5mM), dNTP (2,5mM/dNTP), MULV (ADN polymérase ARN dépendante, 50unités/ μ l) et RNase inhibiteur (20unités/ μ l). La reverse transcription est réalisée pendant 15 minutes à température ambiante puis, les tubes sont incubés à 42°C pendant 30 minutes. Les ADN complémentaires (ADNc) sont ensuite incubés à 70°C pendant 10 minutes, puis placés dans la glace pendant 5 minutes et conservés à -20°C pour les études ultérieures par PCR.

5.3- Retro-Transcription et polymerase chain reaction (PCR)

La réaction de PCR est réalisée dans un volume total de 25 μ L. L'ADN matrice est mélangé avec les amorces sens et antisens (Solution finale : 500nM) (Tableau 20), des dNTPs (2.5mM/dNTP), 2.5 μ L de tampon de réaction 10X (concentration finale 1X : $(NH_4)_2SO_4$ 16 mM ; Tris-HCl 50 mM), $MgCl_2$ 25 mM (concentration finale : 1.75 mM), 1 μ L d'enzyme polymérase TaqGold (5 U/ μ L, Roche), qsp 25 μ L ddH₂O. Puis la solution est placée dans l'appareil à PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) et soumise au programme suivant: dénaturation initiale de 5min. à 95°C, suivie de 40 cycles de dénaturation (30 s. à 95°C)-hybridation (30 s. à 55°C-60°C)-élongation (1min./1kb à 72°C). Pour contrôler la qualité de la PCR, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose avec BET (Bromure d'éthidium ; 0.5 μ g/ml). Après cette analyse électrophorétique, les produits PCR sont visualisés sous UV (254-310nm) et sont photographiés.

Gène	5'-forward-3' (Sens)	5'-reverse-3' (Antisens)	RT-PCR Taille (bp)	Numéro d'accèsion
IK_{Ca1}	(1 _{F5})GCTGGAGTTTAA CAAGGCAGA	TCCTTGCACTTGA GGAGCTTT	618	NM_002250
	(2 _{F9})ACTGGTTCGTGG CCAAGCTTTACA	“	867	
REST	GAATCTGAAGAA CAGTTTGTGCAA	TTTGAAGTTGCTT CTATCTGCTGT	627	NM_005612
TRPV6	ATGGTGATGCG GCTCATCAGTG	GTAGAAGTGG CCTAGCTCCTCG	255	XM_001126541
TRPV2	GCTGGCTGAACCT GCTTTAC	CTCGAGAGTTTCG AGGGACAC	689	AJ487963
Cav3.2 ($\alpha 1$-H)	GTGGTCGAGAAC TTCCACAAGT	GAAGACGTAGTT GCAGTACTT	205	NM_021098
NSE	TGAGGGATGGAG ACAAACAG	CTTGTCGATGGC TTCCTTCAC	528	X14327
Cg-A	GATTCCAAGGAGGCA GAGAA	AGGGAGAACAGGA GCACT	496	NM_001275
TRPC1	AGCGCATGTGGCAAT CTTTGT	CGCTCCATGATTTA GAAAATGG	595	NM_003304
ET_AR	GATCACAATGA CTTTGGCGTA	CTCAAGCTGCC ATTCCTTCT	328	NM_001957
ET_BR	TTGGTGGCTGTTC AGTTTCT	TGCTCACCAAA TACAGAGCA	351	NM_000115
Orai-1	CTTCTTCGACCTC GTCCTCCT	CGTAAGGCCAA AGCATGGAA	406	NM_032790
BK_{Ca}	AGTACAAAGTCTG CCAACCGAGAGA	TCAAAGCCGCTCTT CCTGCACGTAC	1634	NM_002247
p21	GATGAGTTGGGAGG AGGCAG	CGTTTGGAGTGGTA GAAATCTG	206	NM_078467
p27	CAGCTTGCCCGAGTT CTACTACAGA	GATTTTCTTCTGTT CTGTTGGC	274	NM_004064
β-actine	CAGAGCAAGA GAGGCATCCT	GTTGAAGGTCT CAAACATGATC	212	NM_001101

Tableau 20 : liste des amorces (sens et antisens) utilisées pour l'étude de l'expression au niveau ARNm des différents canaux ioniques.

6- Clonage

6.1- Clonage par PCR

- Clonage de long fragment d'ADN (> 2kpb)

Cette technique nécessite l'utilisation d'une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifiats. Dans le cas contraire, une étape d'incubation en présence d'une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifiats est nécessaire.

Après migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 1% avec tampon TAE (*cf.* Annexes), les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont récupérés à l'aide d'une lame de scalpel propre sous illumination avec la « dark reader » (table à lumière bleu). On extrait du gel d'agarose à l'aide d'un kit d'extraction d'ADN (Nucleospin extract 2, Macherey-Nagel)

utilisant des colonnes de purifications selon le protocole fourni par le fabricant. Les fragments d'ADN purifiés sont élués de la colonne avec de l'eau ultrapure dans un volume de 15-30µl. En cas d'utilisation d'une polymérase n'ajoutant pas d'adénines sur les extrémités 3' des amplifiats, les fragments d'ADN sont incubés en présence de dATP (0,2 µM) et d'enzyme la Taq Gold et le tampon fourni par le fournisseur (Applera) à 72°C pendant 10 min. Puis, ces ADN sont ligués dans le plasmide pcR2.1 TOPO (Invitrogen) avant de transformer dans les bactéries *Escherichia coli*. Sur ce plasmide, l'ADN cloné sera inséré dans le gène de la β-galactosidase, dont la protéine normale, en présence du substrat (X-gal) donnera la coloration bleue aux bactéries. L'insertion du fragment à cloner dans ce gène β-gal empêchera la synthèse de la protéine normale donnant aux bactéries la coloration blanche. Ce test bleu/blanc permettra de sélectionner les colonies bactériennes ayant été transformées par le plasmide pcR2.1 avec l'ADN à cloner.

- Clonage de fragment d'ADN (< 2kpb)

Cette technique nécessite également l'utilisation d'une polymérase ajoutant des adénines sur les extrémités 3' des amplifiats. Après migration des produits de PCR sur un gel d'agarose 0,8% avec le tampon TAE (cf. Annexes) et le colorant « crystal violet », les fragments d'ADN sont récupérés à l'aide d'une lame de scalpel propre. Puis, l'ADN est extrait du gel selon le protocole décrit précédemment.

Une étape supplémentaire est nécessaire, en cas d'utilisation d'une polymérase n'ajoutant pas d'adénines sur les extrémités 3' des amplifiats, au cours de laquelle on effectue une réaction enzymatique en présence de la TaqGold afin d'ajouter des adénines aux extrémités 3'. Les amplifiats sont ligués dans le plasmide pcR2.1 TOPO-XL (Invitrogen) selon le protocole fourni.

6.2- Adénosinylation terminal des produits de PCR

Après extraction sur gel du produit de PCR, on incuber le produit de PCR dans 20µl avec 0,1 de Taq Gold et 200 µM de dATP puis on active la Taq gold en premier lieu, 5 min à 95°C. On ajoute le produit de PCR, 30 min à 72°C puis on incuber 5min à 37°C. Le produit PCR est purifié sur colonne et doser pour contrôler la présence d'ADN ou alternativement déposer sur gel. Une fois purifier, le produit PCR est cloné dans TOPO pcr2.1.

6.3- Clonage par restriction

Cette technique consiste à digérer par des enzymes de restriction soit un produit de PCR soit un plasmide contenant le gène d'intérêt et à transférer ce fragment de restriction dans le vecteur final.

Dans un premier temps, on procède à la digestion totale de l'ADN dans un volume de réaction de 20 µl auquel on a ajouté 5 à 10 Unités d'enzymes de restriction et le tampon 10X. On laisse incuber le mélange précédemment décrit avec soit 5 µg du plasmide contenant le gène d'intérêt à 37°C pendant 1 à 2 heures, soit la totalité d'une réaction de PCR réalisée à partir d'oligonucléotides incorporant dans leur séquence les sites de restriction nécessaires pendant la nuit à 37°C. A noter : le clonage par restriction est dit « dirigé » quand deux enzymes de restriction différentes sont utilisées, et « aléatoire » lorsque seulement une enzyme coupe le fragment d'intérêt à chacune de ses extrémités.

Dans un second temps, on peut procéder à la déphosphorylation du vecteur receveur mais cette étape n'est pas obligatoire. Toutefois elle améliore fortement le rendement du clonage en limitant la fermeture du vecteur receveur sur lui-même, ce qui génère des faux positifs. Dans les 20 µl de la réaction de digestion du vecteur receveur, ajouter 5 µl de tampon 10X de la phosphatase, 1 µl de phosphatase/ µg de plasmide et compléter avec de l'eau ultra pure à 50 µl. On laisse incuber 15 min à 37°C puis 5 min à 65°C pour arrêter la réaction. La réaction de digestion du vecteur receveur est incubée dans la glace quelques instants puis centrifuger 30 sec (>10 000×g).

Par la suite on procède au contrôle de la digestion et de l'extraction de l'ADN en déposant et analysant les différents ADN digérés sur un gel d'agarose 1% réalisé avec un tampon TAE et du Bromure d'éthidium (Cf. Annexes). Après analyse électrophorétique, les fragments d'ADN de tailles voulues sont prélevés à l'aide d'une lame de scalpel propre sous illumination avec la « dark reader » (table à lumière bleue) et l'ensemble des fragments d'intérêt et le vecteur receveur sont extraits du gel à l'aide du kit Nucleospin extract 2, (Macherey-Nagel) selon le protocole du fournisseur. L'élution se fait dans un volume minimal (15 µl). Puis, 4 µl de l'éluat sont ligués 5 à 10 min à température ambiante avec 5 µl de tampon 2X de la ligase et 1 µl (3 U) de T4 ligase pendant (Kit LigaFast™, Promega). Enfin on transforme le plasmide dans les bactéries compétentes.

7- Bactéries chimio-compétentes, transformation et criblage des bactéries

7.1- Préparation des bactéries chimio-compétentes

Dans un premier temps, on réalise une pré-culture de 2 ml de bactéries non transformées dans le milieu LB (Cf. Annexes). Le lendemain, on incube 200 µL de la pré-culture dans 20 mL de milieu LB sous agitation à 37°C puis on réalise des mesures de densité optique (DO) à 600 nm jusqu'à obtenir une DO comprise entre 0,4 et 0,6. Les bactéries sont alors centrifugées (10 min à 1000×g, à 4°C) afin d'éliminer le surnageant. Le culot est repris dans 40 ml de solution pour bactéries compétentes (Cf. Annexes) puis, les bactéries sont incubées pendant 5 min dans la glace et centrifugées (10 min à 1000×g, à 4°C) pour éliminer le surnageant. Le culot bactérien est alors repris dans 4 ml de solution pour bactéries compétentes (cf. Annexes). Ensuite les bactéries sont incubées 15 min dans la glace et aliquotées par 20 à 50 µl dans des tubes de 500 µL et congelée directement à -80°C. *NB : Penser à toujours réaliser un contrôle de transformation afin de vérifier l'efficacité de la procédure.*

7.2- La transformation des bactéries par un plasmide

Elle s'effectue par choc thermique sur des bactéries compétentes. Les bactéries compétentes sont sorties du congélateur -80°C et directement plongées dans la glace. Le plasmide à transformer est alors mis en contact avec les bactéries à raison d'un volume de plasmide pour 10 volumes de bactérie. L'ensemble est alors incubé 30 minutes dans la glace puis plongée 40 sec dans le bain-marie chauffé à 42°C. Les bactéries sont replongées dans la glace pendant quelques minutes avant d'être transférées dans 200 µl de milieu « S.O.C. medium » dans un tube de 15 ml. Placer les bactéries dans l'agitateur à 37°C pendant 1 heure. Finalement, étaler 100 µl de culture bactérienne sur la boîte d'agar comprenant l'antibiotique de sélection (couramment ampicilline ou kanamycine).

7.3- Criblage des colonies positives.

Le test blanc/bleu est utilisé pour tester les bactéries transformées avec un vecteur encodant la β-galactosidase. Cette enzyme est capable de dégrader la molécule 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-Gal) en un chromophore bleu ; l'ajout de l'isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) dans le milieu permet de stimuler la synthèse de la β-galactosidase. Le point fort de la technique consiste à insérer le gène d'intérêt dans la séquence de la β-galactosidase. Ainsi, lorsque l'insertion du gène d'intérêt a lieu, la β-

galactosidase n'est plus fonctionnelle et les bactéries restent blanches en présence d'IPTG et de X-Gal. Au contraire, si l'insertion n'a pas lieu la β -galactosidase dégrade le X-Gal et les colonies apparaissent bleues.

7.4- Criblage par empreinte de restriction.

Cette technique consiste à extraire le plasmide par une lyse alcaline puis à le digérer par des enzymes de restriction afin de comparer le profil de restriction obtenu avec celui attendu pour un plasmide d'intérêt.

Protocole de la lyse alcaline (la composition des tampons est reportée en annexe) :

Les colonies à tester sont mises à croître pendant la nuit dans 5 ml de milieu TB avec l'antibiotique de sélection adéquate puis centrifugées 10 min à 1 500×g. Le culot bactérien est lavé avec 5 ml d'eau ultra pure et centrifugé 10 min à 1 500×g. Le culot est repris dans 200 μ l de solution GTE, vortexé puis transféré dans un tube 1,5 ml. On ajoute 200 μ l de solution SDS/NaOH puis on agite doucement en inversant les tubes. La réaction de lyse alcaline est stoppée par l'addition de 200 μ l de solution KOAc 3M. On agite doucement les tubes et on centrifuge 10 min à 15 000×g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube 1,5 ml. Dans lequel on ajoute 600 μ l d'isopropanol. L'ensemble est vortexé et incubé 10 min sur glace, puis centrifugé 30 min > 12 000×g. Le culot est lavé à l'éthanol 70% (0,5 à 1 ml) puis centrifugé 20 min > 12 000×g. Le culot est séché puis repris dans 50 à 100 μ l de tampon TE + RNase H (20 μ g/ml) et incubé 10 min sur glace. L'ADN plasmidique est prêt à être dosé par spectrophotométrie, puis à être digéré par restriction.

7.5- Criblage par PCR

Les colonies à tester sont mises à croître pendant la nuit dans 1 ml de milieu TB avec l'antibiotique de sélection adéquate. Le lendemain, 100 μ l de bactéries sont centrifugés (ex : 10 sec à 10 000×g), le culot bactérien est lavé par 200 μ l d'eau ultra pure puis centrifugé. Le culot est à nouveau suspendu dans 200 μ l d'eau ultra pure, puis la suspension bactérienne est chauffée 5 min à 95°C afin de lyser les bactéries. Une centrifugation (5 min à 5 000×g) permet ensuite de précipiter les gros débris. La PCR est alors réalisée sur 1 à 2 μ l de surnageant.

Cette PCR est réalisée avec la Pfu polymérase dans des conditions standards (Volume de réaction : 20 μ l). On utilise 2 μ l de Tampon 10X (contenant du MgSO₄), 1,6 μ l (0,2 μ M) de dNTP (2,5mM chacun), 0,22 μ l (0,66U) de l'enzyme Pfu (3U/ μ l), 1 μ l (0,5 μ M) de chacun des

oligonucléotides (sens/antisens: 10mM), 1-2µl du lysat bactérien (Matrice) et de l'eau ultra pure (qsp 20µl). Le résultat de la PCR est ensuite visualisé sur un gel d'agarose avec bromure d'éthidium. Les colonies positives sont congelées à -80°C par aliquots de 500 µl en présence de 10% de DMSO.

8- Extraction de plasmide

L'extraction de plasmide fait suite à une amplification des bactéries réalisée dans un volume approprié d'un milieu de culture « TB » (Terrific Broth) car il permet une amplification plus importante des bactéries. Cependant, le milieu standard « LB » (Luria Bertoni) est quelques fois utilisé. La composition des deux milieux est décrite dans les Annexes.

L'extraction de plasmides en petits volumes, médians ou gros a été réalisée grâce aux kits d'extraction sur colonnes « nucleospin plasmide, nucleobond 100 et nucleobond 500 » vendus par la société Macherey-Nagel.

Le protocole réalisé est le protocole complet (3 lavages au total) de la notice avec une étape préliminaire de rinçage à l'eau du culot de bactéries afin d'éliminer la totalité des sels provenant du milieu de culture.

La qualité et la concentration du plasmide sont mesurées par spectrophotométrie. La pureté standard des plasmides est définie par un rapport de $DO^{260}/_{280}$ (ADN/Protéines) $> 1,7$ et un rapport de $DO^{260}/_{230}$ (ADN/sels et solvants) > 2 . Les plasmides ayant une des valeurs légèrement inférieures à la norme sont tout de même utilisés pour le clonage, mais à éviter pour la nucléofection. En effet, même dans le modèle HEK-293, le taux de transfection d'environ 90% pour un plasmide pur peut chuter à moins de 10% pour un plasmide trop riche en sels.

9- Séquençage

Le séquençage est réalisé par la société Genoscreen à Lille. Nous fournissons nos plasmides purifiés à raison de 5 µl à 0,2 µg/µl par réaction ainsi que 10 µl d'oligonucléotides à 10 µM. Genoscreen réalise le séquençage par la technique du « dye terminator » : ce sont les dideoxy NTP qui sont directement couplés à un fluorophore (une couleur par type de NTP). Après migration dans le capillaire du séquenceur, un laser détecte le fluorophore terminant le brin d'ADN synthétisé. Ainsi, au cours de la migration, le laser va détecter un fluorophore pour chaque taille de fragment allant de la taille oligonucléotide +1 à la taille maximale de la

réaction qui varie est d'environ oligonucléotide +1 000. Les résultats nous sont fournis sous forme séquence et de chromatogramme, lequel nous permet de contrôler la séquence en cas de doutes.

10- Immunodétection

10.1- Extraction des protéines

Après la culture cellulaire, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées avec du tampon PBS puis, lysées avec du tampon RIPA ($\text{PO}_4\text{Na}_2/\text{K}$, pH 7,2 à 20 mM ; Triton X-100 1% ; Déoxycholate de sodium 1% ; NaCl 150 mM) en présence d'anti-protéases (Sigma P 8340) pendant 1 heure sur la glace. Le lysat est ensuite soniqué (3 fois 5 secondes), homogénéisé et centrifugé à 10 000×g pendant 10 minutes à 4°C et le dosage protéique est réalisé sur le surnageant (extrait protéique total) en utilisant le BCA (BCA Protein Assay Reagent, Pierce Protein research Products).

10.2- Western blot

Les analyses électrophorétiques sont réalisées en milieu dénaturant par la méthode SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La densité du gel de polyacrylamide est déterminée selon la taille des protéines à séparer. La migration électrophorétique s'effectue à 15-30mA/minigel à une intensité fixe. A la fin de l'analyse électrophorétique, les protéines sont transférées soit sur une membrane de nitrocellulose soit sur une membrane de PolyVinylDene Fluoride (PVDF). Le transfert s'effectue à 25 volts et à 100mA/minigel pendant 1h30. Après le transfert, la membrane est saturée durant 30 minutes à la température ambiante dans une solution TNT-lait 3% (*p/v*) (15mM de tampon Tris pH 8 ; 140mM NaCl ; 0,05% Tween et 3% de lait délipidé lyophilisé). La membrane est ensuite incubée avec les anticorps primaires ([Tableau 21](#)), à la dilution voulue dans du TNT-lait 1.5% (les anticorps utilisés sont présentés dans chaque article), soit pendant 1 à 2 heures à température ambiante soit durant la nuit à 4°C. Après 3 lavages au TNT, les membranes sont mises en présence de l'anticorps secondaire voulu au 1/20 000^{ème} (anti-IgG de lapin ou de souris, laboratoire Zymed Inc, San Francisco CA) pendant 1 heure à 37°C. Après 3 lavages au TNT, les protéines sont révélées par chimioluminescence grâce au kit « Supersignal West Pico Chemiluminescent » ou « Supersignal West Dura Chemiluminescent » (Pierce, Rockford Compagny, IL) en suivant les instructions du constructeur. Les bandes sont finalement exposées sur des films Biomax Light (Kodak, Rochester, NY). L'intensité des signaux est

mesurée par densitométrie, puis le rapport de l'intensité de la protéine d'intérêt divisée par l'intensité d'un rapporteur comme l'actine permet de semi-quantifier l'expression de la protéine d'intérêt.

Anticorps	Société	Dilution	Anticorps secondaire	Poids moléculaire (kDa)
IK _{Ca1}	Sigma	1/250 ^{ème}	Rabbit	47
REST	Abcam	1/1000 ^{ème}	Mouse	132
TRPV6	Alomone	1/500 ^{ème}	Rabbit	84
NSE	Dako	1/250 ^{ème}	Mouse	48
Cg-A	Euromedex	1/300 ^{ème}	Mouse	68
β-actine	Sigma	1/10 000 ^{ème}	Mouse	45

Tableau 21 : Liste des anticorps primaires utilisés pour réaliser les études d'expression protéique

10.3- Immunofluorescence

Au cours de cette thèse, nous avons mené des études par fluorescence de l'expression protéique des canaux K⁺ au niveau des cellules cancéreuses (LNCaP, DU145 et PC-3) ainsi qu'au niveau des tissus prostatiques humains. Les résultats obtenus sur des cellules ne sont pas illustrés dans cette thèse. Ces expériences sont réalisées de la façon suivante. Les cellules, cultivées sur des lamelles, sont fixées et perméabilisées dans de l'acétone pendant 15 minutes à -20°C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline). Les lamelles sont alors recouvertes de PBS et mises à saturer avec une solution contenant du BSA (0.2%), du triton X-100 (0.1%) et du sérum d'âne (2-5%) 30 minutes à 37°C. La saturation se fait avec le sérum de l'animal chez qui a été fait l'anticorps secondaire. S'ensuit une incubation d'1h à 37°C avec l'anticorps primaire d'intérêt (Anticorps anti-IK_{Ca1}, dilution 1/600^{ème}, rabbit polyclonal antibody). Les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS-gélatine, puis incubées 1h à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) ou à la Rhodamine RedX dilué au 1/50^{ème}. Les cellules sont rincées 4 fois dans du PBS-gélatine et une fois dans du PBS. Les lamelles sont montées dans du Mowiol. Elles sont finalement observées en microscopie à épifluorescence (Zeiss Axiophot). Nous avons utilisé des anticorps primaires anti-IK_{Ca1}, anti-actine (Neomarkers, MS-1295-P) et de la phalloïdine FITC (Alexis, ALX-350-268). Pour les anticorps secondaires, nous avons utilisé un anticorps anti-chèvre couplé au FITC (Chemicon, AP 180F) pour les simples marquages et pour le double marquage, l'anticorps précédent et un anticorps anti-souris couplé à la Rhodamine RedX (Jackson, 715-295-151).

Concernant les études réalisées sur des coupes de tissus prostatiques humains, les protocoles sont détaillés dans le premier article.

11- Technique électrophysiologique

11-1- Patch clamp

Les expériences électrophysiologiques sont réalisées à l'aide de la technique du "patch-clamp" (Hamill et al., 1981). Cette technique présente plusieurs configurations d'étude (Figure 40).

- **Dans la configuration "cellule entière" (B)** (whole cell recording, WCR), la pipette de patch clamp (résistance de 2 à 5 MΩ, diamètre interne de 1 μm) est posée sur la cellule et une faible aspiration conduit à une jonction pipette-membrane plasmique de haute résistance électrique (de 20 à 100 GΩ), puis une aspiration supplémentaire provoque la rupture du fragment de membrane isolé par la pipette mettant ainsi en contact le milieu intracellulaire avec la solution contenue dans la pipette (configuration WCR). Les courants ioniques cellulaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur EPC9 (HEKA Electronic, Allemagne). Les signaux sont visualisés sur un écran d'ordinateur, stockés directement sur le disque dur de l'ordinateur (IBM PC) et analysés grâce au programme Origin 5.0 (Microcal, Northampton, MA).

- **Dans la configuration "cellule-attachée"(A)**, contrairement à la configuration WCR la membrane n'est pas rompue. Ceci permet d'enregistrer l'activité électrique des canaux ioniques présents dans le fragment de membrane délimité par les bords de la pipette.

- **Dans les configurations de "patch-excisé"**, on arrache un fragment de membrane avec la pipette. Cela permet selon le mode opératoire d'exposer la face interne ("inside-out") (B) ou externe ("outside-out")(D) de la membrane à la solution extracellulaire désirée.

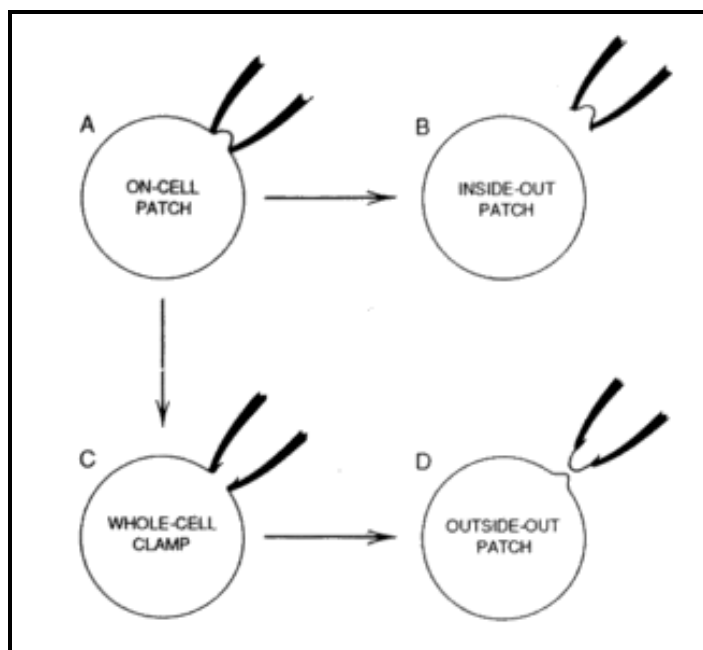


Figure 40 : Représentation schématique des différentes configurations des techniques de patch-clamp (A : configuration « cellule attachée », B : patch-excisé configuration « inside-out », C : configuration « cellule entière », D : patch-excisé configuration « outside-out »).

Au cours de cette thèse, nous avons mis en œuvre les techniques de patch-clamp en configuration cellule entière.

11.2- Solutions utilisées

Les études fonctionnelles ont été réalisées par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (« Whole-cell »), le milieu intracellulaire (intrapipette) d'enregistrement contient 140 mM K-Gluconate, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 . L'osmolarité et le pH ont été ajustés respectivement à 290 mOsm.l⁻¹ et à 7.2. Les cellules sont perfusées en continu avec la solution extracellulaire de HBSS, seule ou contenant des agents pharmacologiques. Les différentes solutions intra- et extra-cellulaires utilisées pour soit mettre en évidence le courant IK_{Ca1} soit le courant calcique $\alpha1\text{-H}$ sont détaillées dans l'article 1 et l'article 2 respectivement.

12- Analyse statistiques

L'analyse statistique des résultats de prolifération est effectuée avec le test de Turkey-Kramer grâce au logiciel GraphPad Instattm (GraphPad Software, V2.04), en considérant $P < 0,05$ comme significatif.

RESULTATS

Article 1

Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate human prostate cancer cells proliferation *via* a close control of calcium entry

H. Lallet-Daher, M. Roudbaraki, A. Bavencoffe, P. Mariot, F. Gackière, G. Bidaux, R. Urbain, P. Gosset, P. Delcourt, L. Fleurisse, C. Slomianny, E. Dewailly, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma and N. Prevarskaya

(Accepté pour publication dans *Oncogene*)

L'un des mécanismes d'intervention des canaux potassiques sur la physiologie des cellules prostatiques pourrait passer par sa modulation de l'entrée du calcium dans les cellules. En effet, la libération du calcium du réticulum entraîne au niveau de la membrane plasmique une entrée de calcium liée à l'ouverture des canaux calciques de type SOC (Store-Operated Channel). Ce processus appelé « entrée capacitive » ou CCE (Capacitive Calcium Entry) est retrouvé dans une grande variété de cellules non excitables et permet à la cellule de reconstituer ses réserves calciques intracellulaires. Cette entrée de calcium *via* les canaux calciques de type SOC joue un rôle majeur dans la régulation et le contrôle des événements cellulaires conduisant à la prolifération ou à l'apoptose. Des travaux récents, menés au laboratoire, ont permis de mettre en évidence cette entrée capacitive de calcium dans les cellules cancéreuses humaines (Skryma *et al.*, 2000) et d'identifier les canaux calciques membranaires voltages-dépendants (les canaux calciques de type TRP pour "Transient Receptor Potential") impliqués dans ce phénomène (Vanden Abeele *et al.*, 2003). Par ailleurs, Il a été démontré que l'activation des canaux potassiques de type IK_{Ca1} et hEAG conduit à l'hyperpolarisation de la membrane plasmique des cellules (Fanger *et al.*, 2001 ; Ouadid-Ahidouch *et al.*, 2001). Cette hyperpolarisation augmenterait la force électromotrice pour le calcium transitant *via* les canaux calciques de type SOC impliqués dans l'entrée capacitive de calcium (CCE).

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons montré l'expression (RT-PCR, immuno-blotting), la fonctionnalité (techniques d'électrophysiologie de patch-clamp) et l'implication dans la prolifération du canal potassique calcium-activé IK_{Ca1} dans les lignées cellulaires cancéreuses de la prostate humaine. En effet, par l'utilisation des outils pharmacologiques (TRAM-34, Clotrimazole) et par l'élimination de l'expression du canal (utilisation des ARN interférents, siARN), nous avons montré que ce canal favorisait la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Par ailleurs, nous avons montré que la suppression ou l'inhibition de ce canal induisait l'expression de la protéine p21^{cip}, une

protéine impliquée dans l'arrêt des cellules dans le cycle cellulaire. Nous avons également mené des études comparatives d'expression protéique du canal IKCa1 sur des coupes des tissus des patients atteints de cancer ou d'une hyperplasie bénigne (HBP) de la prostate humaine. Ces études menées par immunofluorescence ont montré une expression préférentielle de la protéine IKCa1 dans les tissus prostatiques atteints d'un cancer de la prostate humaine. Les études préliminaires ont montré une expression croissante de ce canal en fonction des grades de cancers de la prostate. Dans le cadre de l'étude des mécanismes d'intervention du canal dans la croissance cellulaire, nous avons montré que l'activation du canal IK_{Ca1} favorise l'entrée de calcium *via* le canal TRPV6 (CaT1) impliqué dans le courant SOC dans les cellules LNCaP. Cette corrélation fonctionnelle entre le canal potassique de type IK_{Ca1} et le canal calcique TRPV6 suggèrerait une co-localisation ou une association de ces deux canaux probablement dans les microdomaines membranaires. Par des études de co-immunoprécipitations, nous avons montré que canal IK_{Ca1} et le canal calcique TRPV6 sont associés formant ainsi un complexe moléculaire fonctionnel permettant l'entrée de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques afin de permettre la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ces canaux ioniques pourraient donc constituer des cibles pharmacologiques dans le traitement du cancer de la prostate humaine.

Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate human prostate cancer cells proliferation *via* a close control of calcium entry.

H. Lallet-Daher^{*1}, M. Roudbaraki^{*†1}, A. Bavencoffe¹, P. Mariot¹, F. Gackière¹, G. Bidaux¹, R. Urbain², P. Gosset³, P. Delcourt¹, L. Fleurisse³, C. Slomianny¹, E. Dewailly¹, B. Mauroy⁴, JL Bonnal⁴, R. Skryma¹ and N. Prevarskaya^{1‡}
INSERM U800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq F-59655, France, and USTL (Université des Sciences et Technologies de Lille), Villeneuve d'Ascq F-59655, France.

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire; INSERM U800

²Institut de Recherche Pierre Fabre

³Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille

⁴Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert

Running title: IK_{Ca1} and prostate cancer cell proliferation.

Key words: Intermediate conductance potassium channels IK_{Ca1} , TRPV6, Prostate cancer, proliferation, Capacitative Calcium Entry, patch clamp.

Abbreviations: IK_{Ca1} , Ca^{2+} -activated K^+ channel with intermediate conductance; BK, Ca^{2+} -activated K^+ channel with big conductance; 1-EBIO, 1-ethyl-2-benzimidazolinone; TRAM-34, 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; CRAC, calcium release-activated Ca^{2+} channel; CCE, capacitative calcium entry.

ABSTRACT

Membrane ion channels are essential for cell proliferation and appear to play a key role in the development of cancer. Accumulating data point to K^+ channels as relevant players in controlling cell cycle progression and proliferation of human cancer cells, including prostate cancer (PCa) cells. However, the mechanism(s) by which K^+ channels control PCa cell proliferation remain illusive. In this work, using the techniques of molecular biology, biochemistry, electrophysiology and calcium imaging, we studied, the expression and functionality of intermediate conductance calcium-activated potassium channels (IK_{Ca1}) in human PCa as well as their involvement in cell proliferation. For the first time, we identified the mechanism by which functional IK_{Ca1} controls PCa cell growth. Indeed, we showed that the activation of IK_{Ca1} hyperpolarizes membrane potential and, by promoting the driving force for calcium, induces the calcium entry via TRPV6, a cation channel of the TRP (Transient Receptor Potential) family. Finally, we found that IK_{Ca1} mRNA and protein were preferentially expressed in human PCa tissues. As the IK_{Ca1} potassium channel plays an important role in calcium entry by modulating membrane potential, and the Ca^{2+} entry is considered essential for PCa cells growth, overexpression of this channel in cancer is likely to promote carcinogenesis in prostate tissue.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa), one of the most commonly diagnosed cancers, is a leading cause of cancer-related deaths in western countries (Woolf, 1995). Standard therapies for PCa include androgen ablation, which

causes tumor regression. However, the disease often relapses, in the form of a hormone-refractory tumor that no longer responds to conventional therapy and is, therefore, lethal (Isaacs, 1994). In view of the limited efficiency of hormonal ablation and chemotherapies, new routes of the research are encouraged for designing drugs to treat PCa.

Accumulating data from a variety of cell types has shown that potassium channels are essential for cell proliferation and appear to play a role in carcinogenesis (Kunzelmann, 2005) (Pardo et al., 2005). Among the known K^+ -channels, EAG1, a member of the *ether-a-go-go* (EAG) subfamily, has been studied in greatest detail, as it has been found to have an oncogenic potential in several human cancers, thereby playing a major role in tumorigenesis (Pardo et al., 1999), (Pardo and van Duijn, 2005), (Hemmerlein et al., 2006). However, Ca^{2+} -dependent potassium channels (K_{Ca}) are also involved in cancer-related mechanisms and are attracting increasing attention from research groups (Ouadid-Ahidouch et al., 2001), (Ghanshani et al., 2000). Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels IK_{Ca1} (also called IK1 , SK4 , hSK4 , hKCa4 and KCa3.1) are of particular interest, as their expression has been shown to increase in activated T lymphocytes (Ghanshani et al., 2000), pancreatic cancer cells (Jager et al., 2004) and undergo modulation during the cell cycle in breast cancer cells (Ouadid-Ahidouch et al., 2004). Pharmacological data also indicate the presence of IK_{Ca1} in PCa cells. Indeed, $^{86}\text{Rb}^+$ efflux and enhanced cell proliferation induced in

LNCaP and PC-3 cells by an IK_{Ca1} channel activator (1-ethyl-2-benzimidazolinone (1-EBIO)) was inhibited by IK_{Ca1} channel blockers (Parihar et al., 2003). Although the mechanism underlying the regulation of cell proliferation by IK_{Ca1} channels requires further elucidation, these results highlight the importance of Ca^{2+} -dependent K^+ efflux in general and IK_{Ca1} channels in particular in the proliferation of human PCa cells.

In the current study, we demonstrated that IK_{Ca1} potassium channels expression in human androgen-sensitive and -insensitive PCa cell lines, as well as in primary cultured human PCa cells. The IK_{Ca1} channel protein appeared to be overexpressed in PCa compared to benign hyperplasia of the prostate (BPH) tissues. We also showed that the IK_{Ca1} channel inhibition induced up-regulation of the p21^{Cip1} and p27^{Kip1} cell cycle regulator mRNAs, resulting in PCa cell growth arrest. Activation of IK_{Ca1} channels hyperpolarized membrane potential and induced passive calcium entry by increasing the electrochemical driving force for Ca^{2+} ions. We identified transient receptor potential vanilloid type 6 (TRPV6), a member of the TRP family, as the channel responsible for this hyperpolarization-evoked calcium entry. Moreover, immunoprecipitation experiments strongly suggested that IK_{Ca1} was associated with TRPV6. In conclusion, our results suggest that the IK_{Ca1} potassium channel controls PCa cell proliferation by close regulation of passive calcium entry *via* TRPV6.

RESULTS

IK_{Ca1} potassium channel is expressed in human prostate cancer cells

The RT-PCR technique was initially used to check the mRNA expression of the IK_{Ca1} potassium channel in human PCa cell lines (LNCaP, DU-145, PC-3) and cultured primary human prostate cancer epithelial (hPCE) cells from tissue specimens. Analysis of RT-PCR products revealed the amplification of a single fragment of the expected size (867 bp) from the cDNA of all cell lines and hPCE cells (Fig.1A). Further cloning and sequencing of the amplified PCR product confirmed its specificity and correspondence to the published sequence for human IK_{Ca1} channel mRNA.

Further studies focused on two PCa cell lines, an androgen-sensitive LNCaP and an androgen-insensitive PC-3. First, we examined IK_{Ca1} channel protein expression by Western blot analysis of the total protein preparations of LNCaP and PC-3 cells, using a specific antibody directed against the N-terminal end of the IK_{Ca1} channel. To validate the specificity of the anti- IK_{Ca1} antibody, western-blotting experiments were performed on 10 μ g of the total protein extracts from HEK-293 cell lines stably transfected either by empty vector (HEK-Neo) or bearing the IK_{Ca1} coding cDNA (HEK- IK_{Ca1}). In these experiments the anti- IK_{Ca1} antibody revealed a band of about 52 ± 2 kDa only in proteins extracts from HEK-

IK_{Ca1} cells (Fig. 1B). The expected size, according to amino-acid sequence of the channel, being 47 kDa, the differences in protein size observed may be due to post-translational modifications, e.g. glycosylation and/or phosphorylations of the channel protein.

As shown in Fig. 1C, the IK_{Ca1} antibody revealed a protein band of approximately 52 kDa in LNCaP and in PC-3 cells similar to that observed in HEK- IK_{Ca1} cells. IK_{Ca1} expression at the protein level was also confirmed in both LNCaP and PC-3 prostate cancer cell lines by immunofluorescence studies using the anti- IK_{Ca1} -specific antibody (data not shown).

IK_{Ca1} is overexpressed in prostate cancer tissues

IK_{Ca1} expression was also studied at the mRNA level by RT-PCR and at the protein level by immunofluorescence in human tissue specimens from BPH and from PCa. On a total of 19 PCa tissues and 22 BPH tissues used in these studies, the IK_{Ca1} mRNA was expressed in 89,5% (17 out of 19) of PCa tissues and in 18% (4 out of 22) of BPH tissues suggesting a preferential expression of the IK_{Ca1} in PCa tissues. To ensure that the absence of the IK_{Ca1} expression in BPH tissues used in this study is not due to the absence of the epithelial cells, we searched also for the expression of the apical epithelial cell marker, the cytokeratin 18 (CK18). As shown in Supplemental data, Fig. 1B, the CK18 is expressed at the comparable level in all samples used for this study whereas the IK_{Ca1} is expressed preferentially in PCa tissues. To confirm these observations, we studied the expression of the channel protein in 3 BPH and 5 PCa formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using the IK_{Ca1} specific antibody. As shown in Fig. 1E, the IK_{Ca1} protein was highly expressed in epithelial cells of grade 3 (Fig. 1E) and grade 4 (Fig. 1F) PCa tissues whereas a very faint labeling was observed in the stromal cells. In BPH samples, the expression of the IK_{Ca1} was either absent or very low compared to PCa tissues. However, in some BPH sections, a clear IK_{Ca1} labeling was observed in the pluri-stratified epithelial cells (Fig. 1E, BPH), an aspect due to high proliferation activity of the acinar cells in which IK_{Ca1} may play a major role. These studies show clearly that the overexpression of the IK_{Ca1} in PCa and confirm the data obtained in the RT-PCR studies presented in Fig. 1D.

Ca^{2+} -induced activation of IK_{Ca1} channels hyperpolarizes human prostate cancer cells membrane potential

The patch clamp technique in whole-cell configuration was used to study the functionality of IK_{Ca1} and its involvement in the modulation of the membrane potential in LNCaP prostate cancer cells. First, we examined the impact of an increase in intracellular free calcium concentration on the membrane potential in these cells. To address this aspect, combined current-clamp and

calcium imaging experiments in perforated patch-clamp configurations were performed. To artificially increase the intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) we used thapsigargin (TG), which inhibits the endoplasmic reticulum (ER) SERCA Ca^{2+} pump, causing calcium mobilization from intracellular stores followed by store-operated calcium entry in PCa cells (Skryma et al., 2000). As shown in Fig. 2A, the TG-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ was accompanied by a large hyperpolarization of membrane potential. The average resting membrane potential of LNCaP cells, -47 ± 8 mV, shifted to -71 ± 2.7 mV following TG application. In order to study the involvement of the IK_{Ca1} functionality in the TG-induced membrane hyperpolarization, the following experiments were performed. Using electrophysiological techniques of patch clamp in whole-cell configuration, we examined the impact of an increase in intracellular calcium on potassium currents activation. A voltage ramp of -150 mV to +100 mV (pulse duration, 200 msec; stimulation frequency, 1 pulse/30 sec) was applied to the LNCaP cells and the resulting currents were recorded. Figure 2B shows typical recording acquired in an LNCaP cell under control conditions (CTL) and after application of TG (100 nM). In control conditions, only outward and voltage-dependent currents were observed at all membrane potentials above -30 mV as described by (Skryma et al., 1999; Skryma et al., 1997). An increase in intracellular free calcium concentration by the application of TG (100 nM) induced the development of an additional potassium current due to the activation of K_{Ca} channels. The currents recorded after TG applications were K^+ selective, as could be seen from their mean reversal potential (E_{rev}) of -80 ± 5 mV ($n = 32$) (Nernst potential of K^+ (E_K) = -80 mV). In order to study the involvement of the IK_{Ca1} channels in the calcium-activated potassium currents (I_{KCa}) observed in response to TG, we used two known inhibitors of this channel, clotrimazole (CLT) and a modified CLT molecule, TRAM-34, developed to inhibit IK_{Ca1} channels selectively without blocking the cytochrome P450 enzyme (Wulff et al., 2004). As shown in Fig. 2B, the application of clotrimazole (10 μ M), inhibited the TG-induced I_{KCa} current by about 72% at +100 mV and 100% at -150 mV. The residual CLT-insensitive I_{KCa} was probably mediated by the large conductance potassium channel (BK_{Ca}), as the mRNA and the protein for this channel were also detected in LNCaP cells (data not shown).

To confirm the functionality of the IK_{Ca1} in LNCaP cells in electrophysiological studies, we used a specific pharmacological tool, 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone), known to activate both heterologously expressed (Pedersen et al., 1999; von Hahn et al., 2001) and native IK_{Ca1} channels (Devor et al., 1996; Khanna et al., 1999). In these studies, the concentration of the free calcium in the pipette solution was 200 nM and a voltage ramp of -150 mV to +40 mV

was applied. The resulting currents were recorded in the absence (CTL) or in the presence of the 1-EBIO in the extracellular medium. As shown in figures 2C and 2D, when 1-EBIO (200 μ M) was applied to the LNCaP cells, K^+ currents similar to those developed in the presence of the TG were elicited. In these experiments, the 1-EBIO-induced currents were blocked by CLT (10 μ M) (Fig. 2C) and dose-dependently by 5 and 10 μ M TRAM-34 (Fig. 2D) whereas the apamine (500 nM), an inhibitor of the SK family of the K_{Ca} channels and TEA (5 mM) an inhibitor known to block BK_{Ca} channel were without effect on the 1-EBIO-elicited K^+ currents (data not shown). In addition to these studies conducted using the pharmacological tools (CLT and TRAM-34), the specificity of 1-EBIO effects to activate IK_{Ca1} was verified by using siRNA targeting IK_{Ca1} as presented in supplemental data (Fig. 3B).

To characterize the functional role of IK_{Ca1} channels in the control of membrane potential, we performed current-clamp experiments. To test whether IK_{Ca1} activation was involved in the Ca^{2+} -induced hyperpolarization, membrane potential was measured before and after the TG-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. Application of TG (100 nM) (Fig. 2E) induced sustained hyperpolarization of the membrane potential (Figure 2E). In the presence of 10 μ M CLT ($n=9$), membrane hyperpolarization was completely reversed. In the same manner, an application of IK_{Ca1} activator 1-EBIO (200 μ M) induced sustained hyperpolarization of the membrane potential (Figure 2E) which could be prevented by 10 μ M CLT (Fig. 2F). Taken together, these data show the IK_{Ca1} is functional in LNCaP cells, assures the majority of the IK_{Ca} currents in these cells and is involved in the calcium-induced modulation of the membrane potential.

Similar results showing the functionality of the IK_{Ca1} channel were obtained in primary cultured prostate cancer cells (hPCE cells) by using TG to induce a $[Ca^{2+}]_i$ increase or an IK_{Ca1} activator (1-EBIO) and CLT (10 μ M) (Fig. 3A) or TRAM-34 (1 and 10 μ M) (Fig. 3B) as inhibitors of IK_{Ca1} (Fig. 3A and 3B). The electrophysiological studies conducted on hPCE cells showed that the membrane potential varied between -30 mV to +20 mV with a mean value of -2.4 ± 2.2 mV ($n=45$). An application of TG (100 nM) induced hyperpolarization of the membrane potential which was reversed in the presence of 10 μ M CLT (Fig. 3C). These observations suggested that the majority of the I_{KCa} activated in PCa epithelial cells of various origins in response to an increase in $[Ca^{2+}]_i$ was due to IK_{Ca1} channel activation, which was responsible for the hyperpolarization induced by an increase in $[Ca^{2+}]_i$.

IK_{Ca1} controls prostate cancer cell proliferation

To elucidate whether IK_{Ca1} expression was functionally important in controlling cell growth, we tested the effect

of IK_{Ca1} inhibitors (TRAM-34, CLT) and si IK_{Ca1} on the growth rate of human PCa cell lines. As shown in Fig. 4, TRAM-34 (1-30 μ M) reduced the proliferation of LNCaP (Fig. 4A) and PC-3 (Fig. 4E) prostate cancer cells. Proliferation inhibition by TRAM-34 (1-30 μ M) was dose-dependent amounting at the highest concentration used (30 μ M) at $75 \pm 6.5\%$ for LNCaP cells (Fig. 4A) and $50 \pm 6.5\%$ for PC-3 cells (Fig. 4E). Similar results were obtained using CLT (1-30 μ M), but as this drug is also known to be an antimycotic agent that inhibits fungal P450-dependent enzymes (Ayub and Levell, 1990), (Maurice et al., 1992), its action may not be specific to IK_{Ca1} and is, thus, more difficult to interpret. The inactive TRAM-7 (30 μ M) did not affect cell proliferation in our studies (data not shown), indicating that the suppressive effect of TRAM-34 was specifically related to IK_{Ca1} inhibition. The cell arrest induced by TRAM-34 was not due to apoptosis. Indeed, TRAM-34, used at the same concentrations as in the cell proliferation assays, failed to modify the rate of LNCaP cell apoptosis (data not shown). The involvement of IK_{Ca1} in LNCaP cell proliferation was also studied by using siRNA targeting IK_{Ca1} in LNCaP (Fig. 4C) and PC-3 (Fig. 4G) cells and the obtained results were consistent with those obtained with the IK_{Ca1} inhibitor TRAM-34.

IK_{Ca1} channels inhibition induces an increase in p21^{CIP1} levels

We then investigated the mechanism *via* which IK_{Ca1} inhibition prevented the proliferation of PCa cells by assaying changes in the expression of p21^{CIP1} and p27^{Kip1}, cyclin-dependent kinase inhibitors (cdki), known to act in the G1 phase of the cell cycle (Benito, Martin-Castellanos, and Moreno, 1998), (Ghiani et al., 1999). In these experiments, LNCaP and PC-3 cells were incubated for 4 days in the culture medium supplemented with either the solvent (DMSO, control) or various concentrations of TRAM-34, followed by semi-quantitative RT-PCR analysis of p21^{CIP1} and p27^{Kip1} mRNA expression. Figure 4 show that 4-day treatment with TRAM-34 increased p21^{CIP1} expression by two to four-fold (*vs* CTL) in both LNCaP (Fig. 4B) and PC-3 (Fig. 4F) cells, basically leaving the mRNA rate of p27^{Kip1} intact. Similarly, when the expression of the IK_{Ca1} was knocked down by using IK_{Ca1} -targeting siRNA, the p21^{CIP1} mRNA expression was increased by 2,5-fold (*vs* siCTL) in both LNCaP (Fig. 4D) and PC-3 (Fig. 4H) cells, without affecting the p27^{Kip1} mRNA rate.

IK_{Ca1} potassium channel regulates passive calcium entry by controlling the electrochemical gradient for Ca^{2+}

One of the mechanisms *via* which the IK_{Ca1} channel may regulate PCa cell proliferation is calcium entry modulation. To investigate this possibility, we used an established experimental protocol to measure the capacitative calcium entry (CCE) activated by store

depletion (Skryma et al., 2000). We initially investigated whether membrane potential could affect the CCE developed in response to TG (1 μ M) by exposing cells to increasing concentrations of KCl (50-140 mM) to depolarize their membrane potential during the development of TG-induced CCE in the presence of 2 mM extracellular Ca^{2+} . As shown in Fig. 5, consecutive applications of 50 and 140 mM KCl and associated membrane depolarizations induced gradual inhibition of CCE in LNCaP (Fig. 5A) and PC-3 (Fig. 5B) prostate cancer cells. To specifically address the issue of the involvement of the IK_{Ca1} channel in CCE regulation, we used TRAM-34. As illustrated in figure 5, in the control conditions, application of TG (1 μ M) in $0Ca^{2+}$ medium induced a calcium release from internal stores and the subsequent CCE in $2Ca^{2+}$ medium in both LNCaP (Fig. 5C) and PC-3 cells (Fig. 5D). In these experiments, when the TRAM-34 (10 μ M) was present during the whole experiment, the TG-induced calcium release from intracellular stores was not significantly modified whereas the amplitude of the CCE was decreased by $71 \pm 4.5\%$ *vs* CTL (n=180) in LNCaP cells (Fig. 5C, insert) and by $64 \pm 6\%$ *vs* CTL (n=230) in PC-3 cells (Fig. 5D, insert). Similar results were also obtained with clotrimazole (10 μ M) (data not shown), suggesting that IK_{Ca1} channels regulate CCE by hyperpolarizing membrane potential, thus increasing the electrochemical gradient for calcium. The involvement of IK_{Ca1} in TG-induced CCE was also confirmed by using siRNA targeting IK_{Ca1} in calcium imaging experiments performed on LNCaP (Fig. 5E) and PC-3 (Fig. 5F) cells.

IK_{Ca1} activation induces an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in human prostate cancer cells.

We further studied the effects of cell membrane hyperpolarization, induced by direct activation of IK_{Ca1} , on basal $[Ca^{2+}]_i$ in human PCa cells. $[Ca^{2+}]_i$ was first continuously monitored in normal HBSS medium containing 5.6 mM KCl, then, at the time indicated (Fig. 6), the cells were superfused with a KCl-free HBSS solution ($0K^+$) to hyperpolarize them. Application of the $0K^+$ solution to the cells induced a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ with a peak amplitude of 500 ± 65 nM from a baseline level of 75 ± 25 nM (n= 250) in LNCaP cells (Fig. 6A) and a peak amplitude of 600 ± 75 nM from 85 ± 25 baseline in PC-3 cells (Fig. 6B). These observations suggested that the increase in the driving force for calcium by membrane hyperpolarization was sufficient to induce calcium entry.

To test the direct implication of IK_{Ca1} activity in controlling basal $[Ca^{2+}]_i$, 1-EBIO, a pharmacological activator of the IK_{Ca1} was used.. When 1-EBIO (200 μ M) was applied to the cells, a rapid, transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ was observed, reaching a maximal value of 550 ± 70 nM (n=140) in LNCaP cells (Fig. 6C) and 450 ± 50 nM (n=165) in PC-3 cells (Fig. 6D). To further

confirm that the 1-EBIO-induced calcium increase was due to IK_{Ca1} activation, the same experiments were also conducted in the presence of TRAM-34 (10 μ M), an IK_{Ca1} inhibitor or in IK_{Ca1} -knocked-down cells using si IK_{Ca1} . In the presence of TRAM-34 (Fig. 6C and 6D) or in si IK_{Ca1} -transfected cells (Fig. 6E and 6F), 1-EBIO failed to induce an $[Ca^{2+}]_i$ increase in either LNCaP (6C and 6E) or PC-3 cells (6D and 6F). These data show that of IK_{Ca1} activation induces a calcium increase in PCa cells, by hyperpolarizing their membrane potential as shown in Fig. 2F.

IK_{Ca1} activation induces calcium entry via TRPV6 calcium channel

One of the constitutively active calcium-permeable channels expressed in PCa cells is TRPV6. In order to assess the involvement of this channel in the calcium entry induced by 1-EBIO-mediated IK_{Ca1} activation, we used the siRNA technology to down-regulate TRPV6 in LNCaP and PC-3 cells. First, we confirmed TRPV6 expression in these cells by RT-PCR analysis. As shown on the agarose gel presented in Fig. 7A, the specific primers for TRPV6 amplified a band of the expected size (255 bp), which had previously been sequenced and identified as belonging to TRPV6 cDNA.

Next, we designed siRNA against the TRPV6 sequence (siTRPV6), specifically to down-regulate its mRNA. As shown in Fig. 7B, treating the cells with siTRPV6 (20 nM) for 72h knock-downed the TRPV6 mRNA expression in both LNCaP and PC-3 cells by at least 90-100% (Fig. 7B for LNCaP cells), whereas non-targeting siRNA had no effect on TRPV6 mRNA expression. Moreover, assessment of the IK_{Ca1} activator 1-EBIO (200 μ M) effects on $[Ca^{2+}]_i$ in LNCaP and PC-3 cells treated with either non-targeting siRNA (siCTL) or specific siTRPV6, showed that the drug was no longer able to induce a calcium increase following TRPV6 down-regulation (Fig. 7C, D). This result was consistent with the concept that the $[Ca^{2+}]_i$ rise evoked by IK_{Ca1} activation was mediated by the TRPV6 cation channel.

IK_{Ca1} associates with TRPV6 calcium channel

In view of the importance of the TRPV6 calcium channel in the calcium entry evoked by IK_{Ca1} activation in PCa cells (Fig. 7C and 7D), we then investigated whether IK_{Ca1} associated with TRPV6. Co-immunoprecipitation of LNCaP cell extracts by IK_{Ca1} antibodies and Western blot analysis of the immunoprecipitated proteins by TRPV6 antibodies (Fig. 7E) demonstrated that IK_{Ca1} was associated with TRPV6. Similarly, when the LNCaP total protein extract was processed with the anti-TRPV6 antibody for co-immunoprecipitation, immunoblotting using IK_{Ca1} antibodies identified the IK_{Ca1} protein among the co-immunoprecipitated proteins (Fig. 7E, right panel). In these experiments, negative controls consisted in incubation of the beads with the cell lysate (without any

antibodies) to detect non-specific adherence of proteins to the beads. When the extracts from siRNA_{TRPV6}-treated LNCaP cells were used, no TRPV6 protein band was observed in the Western blot of the IK_{Ca1} -immunoprecipitated proteins, confirming the specificity of the association between IK_{Ca1} and TRPV6 channels (data not shown).

The involvement of the IK_{Ca1} and TRPV6 calcium channel in prostate cancer cells proliferation was then studied by using the siRNA targeting the mRNA of these channels (si IK_{Ca1} , siTRPV6). When cells were incubated in the presence of either si IK_{Ca1} (20 nM) or siTRPV6 (20 nM), the cell proliferation was inhibited by $50 \pm 6\%$ (siTRPV6) and $60 \pm 11\%$ (si IK_{Ca1}). In these experiments, when the cells were incubated in both siRNA (si IK_{Ca1} + siTRPV6), no additional inhibition of cell proliferation was observed ($60 \pm 7\%$) (Fig. 7F) compared to using individual siRNAs. These observations suggest that these ion channels are involved in the same transduction pathway leading to the proliferation of prostate cancer cells.

DISCUSSION

This study reports on the expression, functionality, and involvement in proliferation of the IK_{Ca1} potassium channel in human PCa cells. For the first time, we demonstrated IK_{Ca1} channel expression at mRNA and protein levels in these cells. Moreover, we showed the essential up-regulation of IK_{Ca1} expression in human PCa vs. non-PCa (i.e., HBP) tissues and demonstrated that this channel was functional in PCa cell lines as well as primary cultured hPCE cells. The present work also showed that IK_{Ca1} channel is critically involved in the calcium-induced hyperpolarization of prostate cancer cells' membrane potential.

Using TRAM-34, a specific IK_{Ca1} inhibitor and IK_{Ca1} -targeting siRNA, we showed that this channel appears to play an important role in prostate cancer cell proliferation. The involvement of IK_{Ca1} in cell proliferation has also been shown using in other cancer cells, using either clotrimazole or TRAM-34 (Jager et al., 2004) or IK_{Ca1} -targeting siRNA (Si et al., 2006). There is evidence that IK_{Ca1} is up-regulated in primary pancreatic cancer tissues (Jager et al., 2004) and that its expression increases in response to mitogenic activation of the Ras/ERK signaling pathway (Pena et al., 2000). Our findings are consistent with these observations, as well as providing new evidence of enhanced IK_{Ca1} expression in human PCa at the mRNA and protein levels. This work also brought substantial evidences in the elucidation of the mechanisms by which IK_{Ca1} modulates prostate cancer cell growth. The expression of another calcium-activated potassium channel (BK channel) in prostate cancer cells was recently described by Bloch and al (2007)(Bloch et al., 2007). In this work, the BK potassium channel was involved in the basal cell proliferation of PC-3 cells but not of LNCaP cells suggesting that in the LNCaP cells,

only IK_{Ca1} calcium-activated potassium channel is involved whereas in PC-3 cells, both IK_{Ca1} and BK channels participate in the modulation of the cell growth. Cells are known to be depolarized in the early G_1 phase, but hyperpolarized during the progression through G_1 into the S phase (Kunzelmann, 2005) (Ghanshani et al., 2000). K^+ -channels inhibition was shown to lead to membrane depolarization and cell-cycle arrest in the early G_1 phase in the MCF-7 human breast carcinoma cell line (Wang et al., 1998). Conversely, K^+ -channel activation promotes cell cycle progression from the G_0/G_1 to S phases (Chittajallu et al., 2002), (Ouadid-Ahidouch et al., 2001), (Wonderlin and Strobl, 1996). Here, we demonstrated that IK_{Ca1} channel inhibition in human PCa cells resulted in growth arrest and an accumulation of $p21^{Cip1}$, but not $p27^{Kip1}$ cell cycle regulator. Cell cycle proteins, in particular cyclin-dependent kinase inhibitors (cdki) that regulate G_1 cyclins, are likely to be implicated in withdrawal of the cell cycle. Among these cdkis, $p21^{Cip1}$ is involved in cell cycle exit and terminal cell differentiation (Rodrigues et al., 1987). In agreement with these findings, our results showed that the inhibition of prostate cancer cell growth induced by the IK_{Ca1} inhibitor was likely to involve the accumulation of $p21^{Cip1}$ and cell arrest in the G_1 cycle. However, the mechanism by which IK_{Ca1} channel activity affects the accumulation of cyclin-dependent kinase inhibitors is not known. A recent work shows a correlation between CDK4 expression and activation of the calcium-dependent gene expression pathways involving calcineurin/NFAT (nuclear factor of T lymphocytes) (Baksh et al., 2002). Recent data suggest the involvement of the S100 calcium binding proteins in the link between calcium and the expression of the p21. The S100 proteins are derived from the expression of 17 genes clustered on human chromosome 1q21, a region frequently rearranged in several type of cancers. Several S100 proteins (S100A2, S100A4, S100B) are described to be involved positively (S100A2) or negatively (S100A4 and S100B) in p53-dependent expression of the p21. In low intracellular conditions, S100A2 binds p53 to form a transcription factor interacting with p21 promoter to induce the p21 expression. In high intracellular conditions, S100A4 or S100B bind to p53 to inhibit the interaction of the transcription factor with the p21 promoter leading to the suppression of the p53-dependent expression of the p21. It was also suggested that a complex of S100A4 with p53 and the sequestration of p53 may result in a stimulation of the cells to enter the S phase by abrogating the control functions of p53 at the G_1 -S checkpoint perhaps *via* the modulation of p21 expression (Sherbet et al., 1998; Grigorian et al., 2001). On the other hand, the expression of these S100 proteins was shown to be modulated in human prostate cancer (Gupta et al., 2003). In these studies, a progressive loss of S100A2 protein was observed in cancer specimens with increasing tumor grade whereas S100A4 protein was up-regulated. This up-

regulation of the S100A4 would be an advantage for prostate cancer cells to inhibit the expression of the p21 in the presence of increased intracellular calcium, probably due to enhanced influx *via* TRPV6 promoted by the activation of the IK_{Ca1} . In this context, inhibiting IK_{Ca1} channels may induce membrane depolarization, thus reducing the driving force for Ca^{2+} influx, leading to G_0/G_1 arrest and inhibition of cell proliferation. Therefore, IK_{Ca1} channel inhibitors show some potential adjuvant chemotherapeutic reagents in anti-prostate cancer therapy. Cell cycling involves membrane potential hyperpolarization and calcium entry, especially in G_1 and the G_1/S transition. IK_{Ca1} channels may be important for keeping the cells hyperpolarized to drive a passive Ca^{2+} influx. Calcium ions regulate virtually all cell processes, including survival, proliferation, apoptosis, and differentiation (Kunzelmann, 2005) (Berridge, Bootman, and Roderick, 2003). Intracellular Ca^{2+} is known to play a role in cell proliferation and division in numerous cell types (Spitzner et al., 2007), (Tomita et al., 1987), (Magnier-Gaubil et al., 1996) including PCa cells (Legrand et al., 2001), (Thebault et al., 2003), (Thebault et al., 2006). For example, it has also been shown that calcium signalling is required for cell cycle progression from the G_1/S phase through to mitosis (Hazelton, Mitchell, and Tupper, 1979), (Tupper, Kaufman, and Bodine, 1980). Mitogenesis is accompanied by an increase in intracellular Ca^{2+} , so modifying intracellular Ca^{2+} alters proliferation and mitogenesis (Enomoto et al., 1998), (Ducret et al., 2002).

Using electrophysiological and calcium imaging techniques, we showed that activating the IK_{Ca1} channels hyperpolarized membrane potential and promoted passive calcium entry in human PCa cell lines, probably by providing or maintaining a sufficiently large driving force for Ca^{2+} entry. This results in the high $[Ca^{2+}]_i$ levels necessary for cell-cycle progression, as proposed by Nilius (Nilius, Schwarz, and Droogmans, 1993). Similar observations were made in the human erythroleukemia cell line, where it was demonstrated that IK_{Ca1} channels enhanced Ca^{2+} entry by membrane hyperpolarization (Lu et al., 1999) or in colonic carcinoma cells where the voltage-dependent K^+ channel hEAG was shown to be implicated in the agonist-induced calcium signaling and cell growth (Spitzner et al., 2007).

We further identified the TRPV6 calcium channel as a major provider of passive calcium influx in response to the hyperpolarization associated with IK_{Ca1} channel activation. In a previous work, we demonstrated the contribution of endogenous TRPV6 to store-operated Ca^{2+} entry in LNCaP cells (Vanden Abeele et al., 2003). A recent work showed the involvement of TRPV6 in the control of prostate cancer LNCaP cells proliferation (Lehen'kyi et al., 2007). In these studies, the authors showed that the calcium entry *via* TRPV6 channel in LNCaP cells induced a subsequent downstream activation

of the nuclear factor of activated T-cell transcription factor (NFAT) leading to cell proliferation and to apoptosis resistance.

Here, we confirmed TRPV6 expression and revealed its novel role in maintaining the hyperpolarization-evoked Ca^{2+} entry required for cell proliferation. Our data indicated that, when TRPV6 was down-regulated in PCa cells (by use of siRNA), Ca^{2+} influx no longer occurred in response to IK_{Ca1} activation. Moreover, the immunoprecipitation experiments indicated that there was a close physical interaction between the IK_{Ca1} and TRPV6 channels in PCa cells, although the type of coupling between them requires further elucidation. Our immunostaining studies performed on prostate cancer tissues (figure 1E) show that the IK_{Ca1} potassium channel appears to be more expressed in the apical side of the cells membrane, however, the expression is present in both apical and basal sides of the acinar cells. TRPV6 channel has been previously shown to be expressed in the apical membrane of intestinal epithelial cells (van de Graaf, Hoenderop, and Bindels, 2006) where it plays a role of the “ Ca^{2+} uptake channel” necessary for the calcium re-absorption. Therefore, it is rather possible that in prostate cells TRPV6 channels is also expressed on the luminal apical membrane of the secretory epithelial cells. Cell culture models generally fail to preserve many of the characteristics such as the formation of functional tight junctions and apical and basolateral membrane domains through cell polarization, which are exhibited by the cells *in vivo*. Such properties include the ability of the cells to produce functional tight junctions, to form apical and basolateral membrane domains through cell polarization. The latter process is shown to affect the gene expression and the distribution of the membrane proteins at the cell level (Gut, Balda, and Matter, 1998), (Turowski et al., 2004). Further studies are needed to identify the distribution of TRPV6 and IK_{Ca1} in polarized prostate cells and to understand the physiological role of channels' localization.

In conclusion, we demonstrated for the first time that IK_{Ca1} channels are active players in PCa cells, probably responsible for determining their malignant potential. Up-regulation of this channel in PCa vs. non-PCa tissues may represent an advantage for cancer cells by promoting an intracellular calcium increase *via* the TRPV6 channel, also known to be up-regulated in PCa (Peng et al., 2001). In light of these findings, the IK_{Ca1} channel may be added to the list of potential targets for future prostate cancer therapies.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture

LNCaP, PC-3, and DU-145 prostate cancer cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), were cultured as described by (Gackiere et al., 2006). Primary prostate cancer epithelial cells (hPCE)

were obtained and cultured and used for RT-PCR analysis as described in a previous work (Bidaux et al., 2005).

Tissue specimens

Human PCa and BHP biopsies were obtained from consenting patients following the local ethical considerations. The tissues were diagnosed as cancerous or of BHP by anatomopathological examinations of the adjacent biopsies to those used in our studies. The biopsies examined were from patients prior to any anticancer therapy (chemotherapy, radiotherapy, or surgery). Biopsies were obtained following an office procedure, placed in liquid nitrogen, and conserved at -80°C prior to use in RT-PCR experiments. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number “CP 01/33”, issued by the “Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomedicale de Lille” (CCPPRB).

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA was isolated as described by Chomczynski et al. (Chomczynski and Sacchi, 1987). RT-PCR experiments were carried as previously described (Roudbaraki et al., 1999). The PCR primers used in this study, listed in Table 1, were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen.

Semi-quantitative RT-PCR was performed to study the expression rate of P27^{Cip1} and P21^{Kip} mRNA by using the expression of β -actin mRNA as an internal standard. Half of the PCR samples were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and viewed by Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Gene	5'forward-3'	5'reverse-3'	Expected RT-PCR Product Size (bp)	Accession number
IK	ACTGTTCTGTTGGC CAAGCTTTACA	TCCAGCAGCCATCAG CAAGCCA	867	NM_002250
TRPV6	ATGGTGATGCGGC TCATCAGTG	GTAGAAGTGGCCTAG CTCCTCG	255	XM_001126541
P21	GATGAGTTGGGA GGAGGCAG	CGTTTGGAGTGGTAG AAATCTG	206	NM_078467
P27	CAGCTTGCCCGAG TTCTACTACAGA	GATTTTCTTCTGTTCT GTTGGC	274	NM_004064
β -actin	CAGAGCAAGAGA GGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAA CATGATC	212	NM_001101

TABLE 1: List of primers used for RT-PCR studies

Immunofluorescence studies.

The protein expression of IK_{Ca1} in human prostate tissues was determined by indirect immunofluorescence analysis performed on formalin-fixed, paraffin-embedded prostate tissues sections. For detection of IK_{Ca1} expression, following microwave antigen retrieval in 10mM citrate buffer (pH 6.5), 5- μm sections were incubated with 10%

non-immunized donkey serum for 30 min to block the non-specific bindings in the tissue. Sections were then incubated overnight at 4°C with PBS/5% non-immunized donkey serum alone (negative control) or containing a 1:600 dilution of the primary affinity-purified rabbit polyclonal antibody to the amino terminal sequence of IK_{Ca1} . Sections were then washed with PBS and were incubated with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (A-21206; Molecular Probes; dilution, 1/2000) diluted in PBS containing 1,2% gelatine (PBS/gelatine) for 1 h at room temperature. The tissues were then incubated in PBS containing 1 μ M propidium iodide for 10 min to stain the nuclei. After rinsing twice in PBS/gelatine and once in PBS, the slides were mounted with Mowiol and the distribution of the labelled proteins and propidium iodide was analyzed by confocal immunofluorescence microscopy (Zeiss LSM 510; acquisition parameters: objective 40x/1.3; thickness of confocal slide, 1 μ m).

siRNA. Cell Transfection

LNCaP and PC-3 cells were transfected overnight with 20-40 nM of control siRNA (siRNA number 1, Dharmacon Inc.) or raised against either TRPV6 mRNA (GACUCUCUAUGACCUCACA, Accession number NM_018646, nt 1041-1059) (siTRPV6) or IK_{Ca1} mRNA {si IK_{Ca1} (1): UGUAAAGCUUGGCCACGAAC, nt 975-994; si IK_{Ca1} (2): CCUGUUCUGGUUAAAUGC, nt 567-585, Accession number NM_002250} using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) in serum-free DMEM, according to the manufacturer's instructions. The cells were then incubated in RPMI containing 10% SVF for three days to down-regulate the TRPV6 or IK_{Ca1} mRNA prior to use in experiments. For IK_{Ca1} down-regulation, the efficiency of both siRNA was equivalent as verified at the channel expression and functionality level (see *supplemental data*, Fig. 3). The si IK_{Ca1} (1) was then used in the studies described in the present work.

Western Blot Analysis and Immunoprecipitation

Cells cultured at 80% of confluency were harvested and total proteins extracted. Fifty micrograms of each sample were analyzed by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide and processed for western-blotting using IK_{Ca1} polyclonal antibody, as described by (Vanoverberghe et al., 2004). For the co-immunoprecipitation studies, cells were homogenized in 400 μ l of an ice-cold lysis buffer (pH 7.4) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5mM EDTA, 1.1 mM EGTA, 1mM PMSF, 1mM $NaVO_4$, 2 μ g/ml pepstatin, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml Trypsin inhibitor, 0.5-1%, Triton X-100), kept on ice for 1 hour, then centrifuged at 1000 rpm at 4°C for 10 min. Total protein (0.5 mg) was subjected to co-immunoprecipitation overnight at 4°C with protein A- or protein G-Sepharose 4B beads (Sigma-Aldrich) pre-incubated at 4°C for 1-2h with 1 μ g either anti- IK_{Ca1} or anti-TRPV6 antibodies. A

negative control consisted of a sample where no primary antibody was added to cell lysate (beads), to detect non-specific adherence of proteins to the beads. Proteins bound to the beads were washed three times with lysis buffer, then eluted by boiling the samples in Laemmli buffer, and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and western-blotting, processed with either anti-TRPV6 (1:200) or anti- IK_{Ca1} (1:650) antibodies.

Cell Proliferation and apoptosis assays.

Cell growth and apoptosis assays were performed as previously described by (Vanoverberghe et al., 2003). Cells were incubated for 4 days in a medium containing the solvent (DMSO) either alone (control) or with inhibitors (1-[(2-chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole (TRAM-34) or Clotrimazole) or siRNAs. The commercial assay kit, consisting of MTS (inner salt) and PMS (an electron coupling reagent), was then used to estimate cell growth. One-hundred percent reflected the number of viable cells after incubation in normal medium without drugs for 4 days.

[Ca²⁺]_i measurements

PC-3 and LNCaP cells were grown on glass coverslips for Ca²⁺ imaging experiments. (Ca²⁺)_i was measured using fura-2-loaded cells, as previously described (Gackiere et al., 2006). Cells were loaded with 2 μ M fura 2-AM (fura-2 acetoxymethyl ester) (Calbiochem, Meudon, France) in HBSS solution (Hank's Balanced Salt solution) containing (in mM): 142 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 0.34 Na₂HPO₄, 0.44 KH₂PO₄, 4.2 NaHCO₃, 10 HEPES, and 5.6 glucose, at room temperature for 45 min. All recordings were carried out at room temperature. The cells were continuously perfused with the HBSS solution and chemicals were added *via* the perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1ml/min and chamber volume was 500 μ l.

Electrophysiological recordings

Patch-clamp recordings were performed in the whole-cell configuration using a RK-300 patch-clamp amplifier (Biologic, Grenoble, France), as previously described (Mariot et al., 2002). HBSS was used as external medium for voltage- and current-clamp experiments. Recording pipettes were filled with a solution containing 140 mM K-Gluconate, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂. Osmolarity and pH were adjusted to 290 mOsm.l⁻¹ and 7.2, respectively. The cells were continuously perfused with HBSS solution; alone or containing test substances, as described for calcium imaging experiments. To measure membrane potential concomitantly with intracellular free calcium concentration, the perforated (using amphotericin B) configuration of the patch-clamp technique was used. Cells were loaded with 2 μ M Fura-2/AM for 45 min, as previously described, and amphotericin B (final concentration: 200 μ g/ml) was diluted in a pipette

medium containing 70 mM K₂SO₄, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 5 mM HEPES and 1 mM MgCl₂, using mannitol to adjust osmolarity to 290 mOsm. The bath-recording medium was similar to that used in fluorescence imaging experiments.

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean \pm S.E. Statistical analysis was performed using unpaired *t* tests or ANOVA tests followed by either Dunnett (for multiple control *versus* test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons). Student's *t*-test was used for statistical comparison of the differences and *P* < 0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr. Y. Shuba (Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine) for helpful discussions. This work was supported by grants from INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. H. Lallet was supported by the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). We would like to thank Dr Mao Xiang Chen (Laboratory of Gene Expression and Protein Biochemistry, GlaxoSmithKline R&D, United Kingdom) for the generous gift of the IK_{Ca1} antibodies.

Supplementary information is available at *Oncogene's* website.

REFERENCES

- Ayub, M., and Levell, M. J. (1990). The inhibition of human prostatic aromatase activity by imidazole drugs including ketoconazole and 4-hydroxyandrostenedione. *Biochem Pharmacol* **40**(7), 1569-75.
- Baksh, S., Widlund, H. R., Frazer-Abel, A. A., Du, J., Fosmire, S., Fisher, D. E., DeCaprio, J. A., Modiano, J. F., and Burakoff, S. J. (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* **10**(5), 1071-81.
- Benito, J., Martin-Castellanos, C., and Moreno, S. (1998). Regulation of the G1 phase of the cell cycle by periodic stabilization and degradation of the p25^{rum1} CDK inhibitor. *Embo J* **17**(2), 482-97.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7), 517-29.
- Bidaux, G., Roudbaraki, M., Merle, C., Crepin, A., Delcourt, P., Slomianny, C., Thebault, S., Bonnal, J. L., Benahmed, M., Cabon, F., Mauroy, B., and Prevarskaya, N. (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* **12**(2), 367-82.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J., Kunzelmann, K., and Bubendorf, L. (2007). KCNA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. In "Oncogene", Vol. 26, pp. 2525-34.
- Chittajallu, R., Chen, Y., Wang, H., Yuan, X., Ghiani, C. A., Heckman, T., McBain, C. J., and Gallo, V. (2002). Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4), 2350-5.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1), 156-9.
- Devor, D. C., Singh, A. K., Frizzell, R. A., and Bridges, R. J. (1996). Modulation of Cl⁻ secretion by benzimidazolones. I. Direct activation of a Ca(2+)-dependent K⁺ channel. *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1), L775-84.
- Ducet, T., Boudina, S., Sorin, B., Vacher, A. M., Gourdou, I., Liguoro, D., Guerin, J., Bresson-Bepoldin, L., and Vacher, P. (2002). Effects of prolactin on intracellular calcium concentration and cell proliferation in human glioma cells. *Glia* **38**(3), 200-14.
- Enomoto, N., Kitamura, T., Hirose, M., Ikejima, K., Watanabe, S., and Sato, N. (1998). Differential Ca²⁺ signaling in neonatal and adult rat hepatocyte doublets. *J Hepatol* **28**(2), 221-30.
- Gackiere, F., Bidaux, G., Lory, P., Prevarskaya, N., and Mariot, P. (2006). A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* **39**(4), 357-66.
- Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M. J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G. A., Cahalan, M. D., and Chandy, K. G. (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* **275**(47), 37137-49.
- Ghiani, C. A., Eisen, A. M., Yuan, X., DePinho, R. A., McBain, C. J., and Gallo, V. (1999). Neurotransmitter receptor activation triggers p27(Kip1) and p21(CIP1) accumulation and G1 cell cycle arrest in oligodendrocyte progenitors. *Development* **126**(5), 1077-90.
- Gut, A., Balda, M. S., and Matter, K. (1998). The cytoplasmic domains of a beta1 integrin mediate polarization in Madin-Darby canine kidney cells

- by selective basolateral stabilization. *J Biol Chem* **273**(45), 29381-8.
- Hazelton, B., Mitchell, B., and Tupper, J. (1979). Calcium, magnesium, and growth control in the WI-38 human fibroblast cell. *J Cell Biol* **83**(2 Pt 1), 487-98.
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knotgen, H., Sanchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Radzun, H. J., Stuhmer, W., and Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer* **5**(1), 41.
- Isaacs, J. T. (1994). Role of androgens in prostatic cancer. *Vitam Horm* **49**, 433-502.
- Jager, H., Dreker, T., Buck, A., Giehl, K., Gress, T., and Grissmer, S. (2004). Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels inhibit human pancreatic cancer cell growth in vitro. *Mol Pharmacol* **65**(3), 630-8.
- Khanna, R., Chang, M. C., Joiner, W. J., Kaczmarek, L. K., and Schlichter, L. C. (1999). hSK4/hIK1, a calmodulin-binding K Ca channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem* **274**(21), 14838-49.
- Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *J Membr Biol* **205**(3), 159-73.
- Legrand, G., Humez, S., Slomianny, C., Dewailly, E., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Wuytack, F., and Prevarskaya, N. (2001). Ca^{2+} pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca^{2+} -ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem* **276**(50), 47608-14.
- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via $\text{Ca}(2+)/\text{NFAT}$ -dependent pathways. *Oncogene*.
- Lu, X., Fein, A., Feinstein, M. B., and O'Rourke, F. A. (1999). Antisense knock out of the inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate receptor GAP1(IP4BP) in the human erythroleukemia cell line leads to the appearance of intermediate conductance $\text{K}(\text{Ca})$ channels that hyperpolarize the membrane and enhance calcium influx *In "J Gen Physiol"*, Vol. 113, pp. 81-96.
- Magnier-Gaubil, C., Herbert, J. M., Quarck, R., Papp, B., Corvazier, E., Wuytack, F., Levy-Toledano, S., and Enouf, J. (1996). Smooth muscle cell cycle and proliferation. Relationship between calcium influx and sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase regulation. *J Biol Chem* **271**(44), 27788-94.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M. F., and Prevarskaya, N. (2002). Overexpression of an $\alpha 1\text{H}$ (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* **277**(13), 10824-33.
- Maurice, M., Pichard, L., Daujat, M., Fabre, I., Joyeux, H., Domergue, J., and Maurel, P. (1992). Effects of imidazole derivatives on cytochromes P450 from human hepatocytes in primary culture. *Faseb J* **6**(2), 752-8.
- Nilius, B., Schwarz, G., and Droogmans, G. (1993). Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am J Physiol* **265**(6 Pt 1), C1501-10.
- Ouadid-Ahidouch, H., Le Bourhis, X., Roudbaraki, M., Toillon, R. A., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2001). Changes in the K^{+} current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K^{+} channel. *Receptors Channels* **7**(5), 345-56.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Ahidouch, A., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2004). Cell-cycle-dependent expression of the large Ca^{2+} -activated K^{+} channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **316**(1), 244-51.
- Pardo, L. A., Contreras-Jurado, C., Zientkowska, M., Alves, F., and Stuhmer, W. (2005). Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membr Biol* **205**(3), 115-24.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S., and Stuhmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG $\text{K}(+)$ channels. *Embo J* **18**(20), 5540-7.
- Pardo, L. M., and van Duijn, C. M. (2005). In search of genes involved in neurodegenerative disorders *In "Mutat Res"*, Vol. 592, pp. 89-101.
- Parihar, A. S., Coghlan, M. J., Gopalakrishnan, M., and Shieh, C. C. (2003). Effects of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol* **471**(3), 157-64.
- Pedersen, K. A., Schroder, R. L., Skaaning-Jensen, B., Strobaek, D., Olesen, S. P., and Christophersen, P. (1999). Activation of the human intermediate-conductance $\text{Ca}(2+)\text{-activated K}(+)$ channel by 1-ethyl-2-benzimidazolinone is strongly $\text{Ca}(2+)\text{-dependent}$. *Biochim Biophys Acta* **1420**(1-2), 231-40.
- Pena, T. L., Chen, S. H., Konieczny, S. F., and Rane, S. G. (2000). Ras/MEK/ERK Up-regulation of the fibroblast KCa channel FIK is a common mechanism for basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta suppression of myogenesis. *J Biol Chem* **275**(18), 13677-82.
- Peng, J. B., Zhuang, L., Berger, U. V., Adam, R. M., Williams, B. J., Brown, E. M., Hediger, M. A., and Freeman, M. R. (2001). CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **282**(3), 729-34.

- Rodrigues, A. D., Gibson, G. G., Ioannides, C., and Parke, D. V. (1987). Interactions of imidazole antifungal agents with purified cytochrome P-450 proteins. *Biochem Pharmacol* **36**(24), 4277-81.
- Roudbaraki, M., Lorsignol, A., Langouche, L., Callewaert, G., Vankelecom, H., and Deneef, C. (1999). Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* **140**(10), 4874-85.
- Si, H., Grgic, I., Heyken, W. T., Maier, T., Hoyer, J., Reusch, H. P., and Kohler, R. (2006). Mitogenic modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels in proliferating A7r5 vascular smooth muscle cells. *In "Br J Pharmacol"*, Vol. 148, pp. 909-17.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X. L., Coppenolle, F. V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B., and Prevarskaya, N. (2000). Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* **527 Pt 1**, 71-83.
- Skryma, R., Van Coppenolle, F., Dufy-Barbe, L., Dufy, B., and Prevarskaya, N. (1999). Characterization of Ca(2+)-inhibited potassium channels in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Receptors Channels* **6**(4), 241-53.
- Skryma, R. N., Prevarskaya, N. B., Dufy-Barbe, L., Odessa, M. F., Audin, J., and Dufy, B. (1997). Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation. *Prostate* **33**(2), 112-22.
- Spitzner, M., Ousingsawat, J., Scheidt, K., Kunzelmann, K., and Schreiber, R. (2007). Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *In "Faseb J"*, Vol. 21, pp. 35-44.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* **66**(4), 2038-47.
- Thebault, S., Roudbaraki, M., Sydorenko, V., Shuba, Y., Lemonnier, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2003). Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest* **111**(11), 1691-701.
- Tomita, M., Hirata, Y., Takata, S., and Fujita, T. (1987). Effects of calcium-antagonists and calmodulin inhibitors on DNA synthesis in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinol Jpn* **34**(2), 313-8.
- Tupper, J. T., Kaufman, L., and Bodine, P. V. (1980). Related effects of calcium and serum on the G1 phase of the human W138 fibroblast. *J Cell Physiol* **104**(1), 97-103.
- Turowski, P., Adamson, P., Sathia, J., Zhang, J. J., Moss, S. E., Aylward, G. W., Hayes, M. J., Kanuga, N., and Greenwood, J. (2004). Basement membrane-dependent modification of phenotype and gene expression in human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(8), 2786-94.
- van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. (2006). Regulation of TRPV5 and TRPV6 by associated proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(6), F1295-302.
- Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2003). Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1. *J Biol Chem* **278**(17), 15381-9.
- Vanoverberghe, K., Mariot, P., Vanden Abeele, F., Delcourt, P., Parys, J. B., and Prevarskaya, N. (2003). Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium* **34**(1), 75-85.
- Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2004). Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* **11**(3), 321-30.
- von Hahn, T., Thiele, I., Zingaro, L., Hamm, K., Garcia-Alzamora, M., Kottgen, M., Bleich, M., and Warth, R. (2001). Characterisation of the rat SK4/IK1 K(+) channel. *Cell Physiol Biochem* **11**(4), 219-30.
- Wang, S., Melkounian, Z., Woodfork, K. A., Cather, C., Davidson, A. G., Wonderlin, W. F., and Strobl, J. S. (1998). Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *J Cell Physiol* **176**(3), 456-64.
- Wonderlin, W. F., and Strobl, J. S. (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol* **154**(2), 91-107.
- Woolf, S. H. (1995). Screening for prostate cancer with prostate-specific antigen. An examination of the evidence. *N Engl J Med* **333**(21), 1401-5.
- Wulff, H., Knaus, H. G., Pennington, M., and Chandy, K. G. (2004). K⁺ channel expression during B cell

differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol* **173**(2), 776-86.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Expression of IK_{Ca1} in human prostate cancer cell lines and tissues. (A) RT-PCR studies of IK_{Ca1} mRNA expression in androgen-sensitive (LNCaP), androgen-insensitive (PC-3 and DU-145), and primary cultured human prostate cancer epithelial (hPCE) cells. Two μ g total RNA were reverse transcribed and 150 ng RNA equivalents used in PCR reactions to study IK_{Ca1} (867 bp) mRNA expression, using specific IK_{Ca1} (867 bp) primers, as described in *Materials and methods*. H₂O and samples without reverse transcriptase (not shown) were used as negative controls. Amplified fragments were resolved on 1.5% agarose-gel by electrophoresis and visualized by EtBr staining. M, 1Kb DNA ladder a molecular weight marker. (B) Western-blotting experiments performed on 10 μ g of the total protein extracts from HEK-293 cell lines stably transfected either by empty vector (HEK-Neo) or bearing the IK_{Ca1} coding cDNA (HEK- IK_{Ca1}). A polyclonal IK_{Ca1} antibody raised against the first 16 amino-acids of the N-terminal end of the protein (kindly provided by Dr Mao Xiang Chen, GlaxoSmithKline R&D, United Kingdom) was used in the following IK_{Ca1} protein expression studies. The anti- IK_{Ca1} antibody revealed a band of about 52 ± 2 kDa only in proteins extracts from HEK- IK_{Ca1} cells. (C) IK_{Ca1} protein expression in human prostate cancer cells (LNCaP and PC-3) in western-blotting experiments using the anti- IK_{Ca1} antibody. The RT-PCR studies of IK_{Ca1} expression in human tissues from benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer biopsies are presented in (D). The panel presents an agarose gel electrophoresis image of IK_{Ca1} gene expression in 6 prostate cancer (lanes 10–15) and 9 BPH (non cancerous) biopsies (lanes 1–9). β -actin mRNA expression (212 bp) was used as a control for the amount of RNA equivalents used in the RT-PCR experiments. (E) IK_{Ca1} protein expression studies in grade 3 PCa and BPH formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using the IK_{Ca1} -specific antibody. After an overnight incubation with IK_{Ca1} antibody, sections were then incubated with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (in green). The tissues were then incubated in PBS containing 1 μ M propidium iodide (IP, in Red) for 10 min to stain the nuclei. (F) The expression of the IK_{Ca1} protein in grade 4 PCa (left panel) with characteristic fusioned acini and in a grade 3 PCa (middle panel) in a region containing cancerous (PCa) and BPH acini. A control experiment was performed on a PCa tissue (Right panel) by omitting the first antibody (anti- IK_{Ca1}). After incubation with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (in green), the nuclei were stained by 1 μ M propidium iodide (IP, in Red).

Figure 2. Functional expression of IK_{Ca1} and involvement in membrane potential in LNCaP prostate cancer cells. (A) Simultaneous recording of the free cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) (a) and membrane potential (V_m) (b) in LNCaP cells is presented. TG (100 nM) induced a hyperpolarization consecutive to the increase in $[Ca^{2+}]_i$.

Typical traces obtained using the patch-clamp technique in whole-cell configuration, showing the involvement of IK_{Ca1} in the calcium-activated K^+ currents (B), 1-EBIO-induced IK_{Ca1} currents (C,D) and the involvement of the IK_{Ca1} in the calcium-induced membrane hyperpolarization (D) in LNCaP cells. A voltage ramp of -150mV to +100 mV was applied to the LNCaP cells and the resulting current (I) recorded under control (CTL) conditions and after the increase in intracellular free calcium concentration triggered by TG application application (100 nM). In order to study the involvement of IK_{Ca1} in the calcium-induced potassium currents in LNCaP cells, Following TG-induced potassium currents developments, the effects of CLT (10 μ M), an IK_{Ca1} inhibitor, was studied. To confirm the functionality of the IK_{Ca1} channels in LNCaP cells, IK_{Ca1} currents were elicited by application of the IK_{Ca1} activator 1-EBIO (200 μ M) (C, D) and then pharmacological inhibitors, CLT (10 μ M) (C) or TRAM-34 (5 and 10 μ M) (D), were used to block the IK_{Ca1} current.

In order to study the involvement of IK_{Ca1} in the calcium-induced hyperpolarization of membrane potential in LNCaP cells, membrane potential was measured before and after application of either TG (100 nM) (E) or 1-EBIO (200 μ M) (F). Following TG-or 1-EBIO-induced hyperpolarization, CLT (10 μ M), was applied. In both cases, hyperpolarization was completely reversed (n = 9) when CLT (10 μ M) was applied.

Figure 3. Functional expression of IK_{Ca1} and involvement in membrane potential in primary cultured prostate cancer hPCE cells. Similar experiments to those described in Fig. 2 were performed on primary cultured cells from human prostate cancer tissue (hPCE cells) to study the involvement of IK_{Ca1} in Ca^{2+} -activated K^+ current and plasma membrane hyperpolarization.

Typical traces obtained using the patch-clamp technique in whole-cell configuration as described in materials and methods and in Fig. 2 and showing the involvement of IK_{Ca1} in the calcium-activated K^+ currents (A), 1-EBIO-induced IK_{Ca1} currents (B) and the involvement of the IK_{Ca1} in the calcium-induced membrane hyperpolarization (C) in primary cultured hPCE cells. Following TG- or 1-EBIO-induced potassium currents development, CLT (10 μ M) (A) or TRAM-34 (1 and 10 μ M) (B) were applied. In order to study the involvement of IK_{Ca1} in the calcium-induced hyperpolarization of membrane potential in hPCE cells, membrane potential was measured before

and after TG application (100 nM). Following TG-induced hyperpolarization, CLT (10 μ M) was applied. TG-induced hyperpolarization was completely reversed ($n = 6$) when CLT (10 μ M) was applied.

Figure 4. Blockade of IK_{Ca1} K^+ channels inhibits prostate cancer cells proliferation and the accumulation of $p21^{Cip1}$ mRNA. Cells were trypsinized and seeded for 48h, then treated for 4 days with either solvent (CTL) or TRAM-34 (1-30 μ M), an IK_{Ca1} K^+ channel blocker, in culture medium. Cell growth was then measured as described in *Materials and Methods*. Results are presented as percentage of CRL for (A) LNCaP and (E) PC-3 cells. In another set of experiments, the effects of the cells transfection with either control siRNA (siCTL) or IK_{Ca1} -targeted siRNA (si IK_{Ca1}) on cell proliferation were studied for (C) LNCaP and (G) PC-3 cells. Experiments were repeated 4 times in independent cell cultures and a representative figure is presented for each cell type. * $p < 0.001$ compared with their respective controls.

Typical RT-PCR analysis of $p27^{Kip1}$ and $p21^{Cip1}$ mRNA expression performed on control (CTL) and TRAM-34-treated (B) LNCaP and (F) PC-3 human prostate cancer cells. Cells were plated in culture medium in the absence (CTL) or presence of TRAM-34 (10 μ M and 20 μ M) for 3 days, then harvested. In the same way, the effects of the cells transfection with either control siRNA (siCTL) or si IK_{Ca1} on the expression of $p27^{Kip1}$ (274 bp) and $p21^{Cip1}$ were studied for (D) LNCaP and (H) PC-3 cells. Total RNA was extracted and semi-quantitative RT-PCR experiments performed to study the expression of $p27^{Kip1}$ (274 bp) and $p21^{Cip1}$ (206 bp) mRNA using specific primers. β -actin mRNA expression (212 bp) was used as an internal standard. PCRs were carried out using 1 μ l of either a 5-fold (cell cycle markers) or 10-fold (β -actin) diluted samples of the RT reaction of TRAM-34- or siRNA-treated LNCaP and PC-3 cells. The conditions were as follows: 7 min at 95°C, then 32-34 cycles of 30 sec extension at 72°C each, and a final 7 min extension step. Relative levels of $p27^{Kip1}$ and $p21^{Cip1}$ mRNA were determined by densitometric analysis of the PCR ($p27^{Kip1}$, $p21^{Cip1}$, and β -actin) bands on 1.5% agarose gel and normalized to the β -actin expression rate in each sample. The normalized rate of $p27^{Kip1}$ and $p21^{Cip1}$ mRNA under control (CTL) conditions were considered to have a value of 1 and the expression rate for TRAM-34-treated cells was compared to CTL. A representative figure is presented for each experiment, repeated at least twice, in duplicate, and in two independent cell cultures.

Figure 5. IK_{Ca1} potassium channel functionality is involved in capacitative calcium entry (CCE) in prostate cancer cells. The effects of membrane depolarization on CCE in LNCaP (A) and PC-3 (B) prostate cancer cells were studied by calcium imaging

using fura-2 fluorescence. In order to evaluate membrane hyperpolarization-dependence of the CCE in prostate cancer cells, CCE was induced by depleting endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores with 1 μ M thapsigargin in a Ca^{2+} -free solution. Then Ca^{2+} was readmitted while the cells were bathed in a solution containing 5.6 mM K^+ . Once CCE had been established, solutions containing 50 and 140 mM K^+ were applied to depolarize the membrane potential in the LNCaP and PC-3 cells. Each experiment was repeated at least 6 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative experiments are presented. The panels show the mean \pm SE of 42 cells from two experiments. To study the involvement of IK_{Ca1} potassium channel functions in passive calcium entry, CCE was induced in LNCaP (C) and PC-3 (D) prostate cancer cells, as described above, in the absence (CTL) or presence of IK_{Ca1} inhibitor (TRAM-34, 10 μ M). The effects of the cells transfection with either control siRNA (siCTL) or IK_{Ca1} -targeted siRNA (si IK_{Ca1}) on TG-induced CCE were also studied for (E) LNCaP and (F) PC-3 cells. Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative experiments are presented. A quantification of the capacitative calcium entry (CCE) for each experiment (C, D, E, and F) is presented in insert (mean \pm SE, $n = 45$ -50 cells). Periods of TG and KCl applications and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0Ca) to 2mM (2Ca) are marked by horizontal bars; *see text for details*.

Figure 6. IK_{Ca1} activation induces an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in human prostate cancer cells. Calcium imaging experiments showing the effects of cell membrane hyperpolarization and direct activation of IK_{Ca1} on the basal cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in human prostate cancer cells. To study the effects of cell membrane hyperpolarization on the basal calcium concentration, $[Ca^{2+}]_i$ was first continuously monitored in normal HBSS medium containing 5.6 mM KCl, then the LNCaP (A) and PC-3 (B) cells were superfused with a KCl-free HBSS solution (0 K^+) to hyperpolarize the membrane, according to the Nernst potential. To study the impact of IK_{Ca1} activity on $[Ca^{2+}]_i$, 1-EBIO (200 μ M) was used to activate the channel in calcium imaging studies of LNCaP (C) and PC-3 (D) cells. In the presence of TRAM-34 (10 μ M), 1-EBIO failed to induce a calcium increase in LNCaP or PC-3 cells. In another set of experiments, the effects of the cells transfection with either control siRNA (siCTL) or IK_{Ca1} -targeted siRNA (si IK_{Ca1}) on 1-EBIO-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was studied for (E) LNCaP and (F) PC-3 cells.

A representative cell of at least 50 cells is shown for each calcium imaging experiment, each experiment was repeated at least four times with two independent cell cultures.

Figure 7. IK_{Ca1} activation induces calcium entry via TRPV6 calcium channel TRPV6 cation channel mRNA expression was studied by RT-PCR (**A**) in LNCaP and PC-3 human prostate cancer cell lines. RT-PCR and semi-quantitative RT-PCR were performed as described in Fig. 1 and 3. Total RNA was reverse transcribed and used in PCR reactions for to study expression of TRPV6 mRNA (255 bp) LNCaP, and PC-3 cells (**A**) and in LNCaP cells treated either by a non-targeting siRNA (siCTL) for 72h or TRPV6 targeting siRNA (siTRPV6) for 24h, 48h and 72h (**B**). β -actin mRNA expression (212 bp) was considered as an internal standard. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gel containing 0.5 μ g/ml ethidium bromide and visualized under UV.

Calcium imaging experiments using Fura-2 as a calcium probe were performed to study the effects of the IK_{Ca1} activator, 1-EBIO (200 μ M), on $[Ca^{2+}]_i$ in (**C**) LNCaP and (**D**) PC-3 cell lines. The involvement of the TRPV6 cation channel in the 1-EBIO-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase was assessed by pretreating cells with TRPV6 siRNA (20 nM) for 72h. Following pre-treatment of the cells with TRPV6 siRNA, 1-EBIO failed to induce a calcium increase in (**C**) LNCaP and (**D**) PC-3 cells. A representative trace of at least 50 cells is shown for calcium imaging experiments and each experiment was carried out at least four times with two independent cell cultures.

(**E**) IK_{Ca1} associated with the TRPV6 channel in LNCaP cells. TRPV6 or IK_{Ca1} western-blot (WB) of co-immunoprecipitated (IP) LNCaP total protein extracts using either anti- IK_{Ca1} (left panel) or anti-TRPV6 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel).antibodies (right panel). To study the involvement of IK_{Ca1} and/or TRPV6 in LNCaP cells proliferation, the cells were transfected with either non-targetting siRNA (siCTL) or with siRNA targeting TRPV6 (siTRPV6) or IK_{Ca1} (si IK_{Ca1}) or with both of them as described above and incubated for 3-4 days.

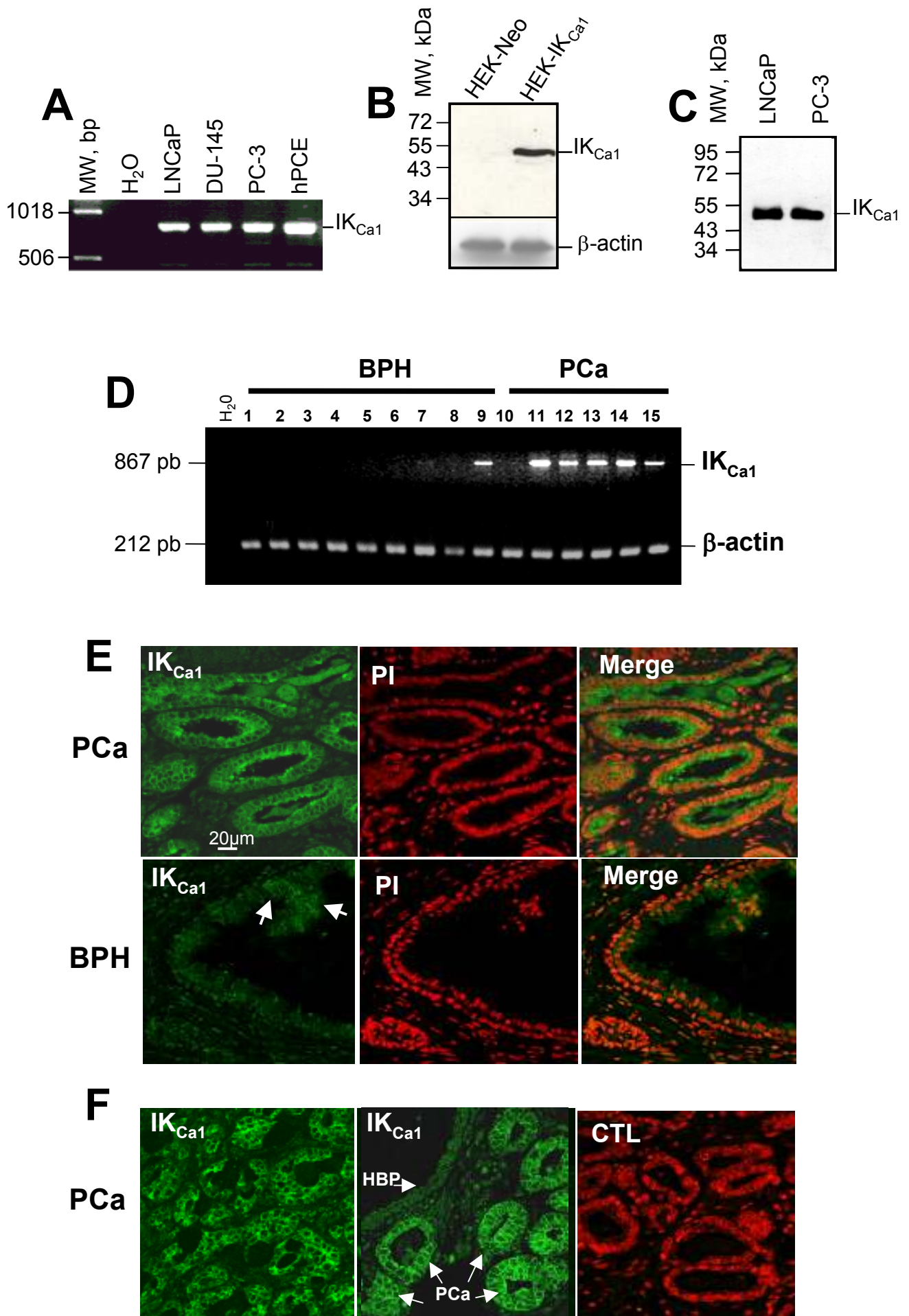


Figure 1: Lallet-Daher et al., 2008

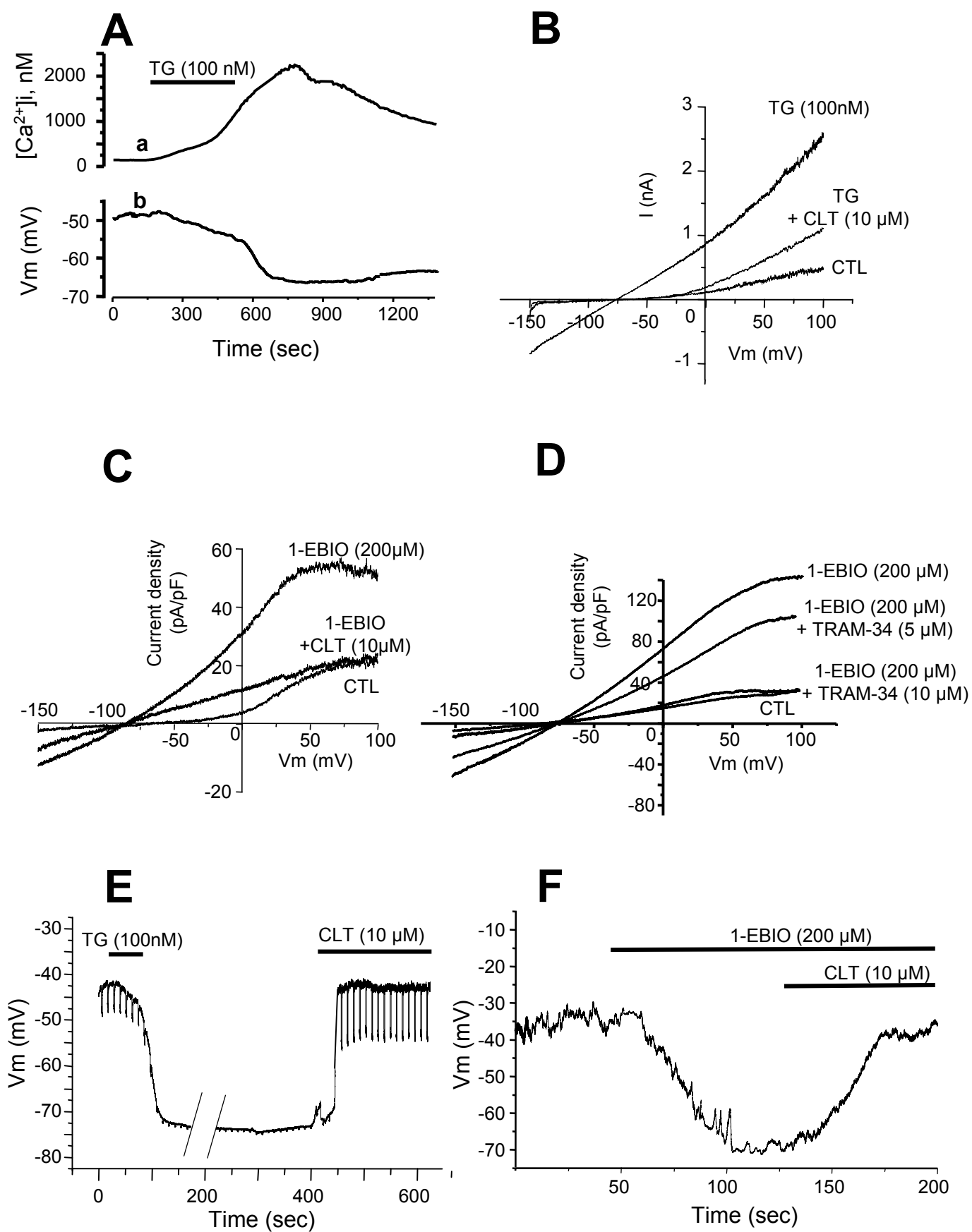


Figure 2: Lallet-Daher et al., 2008

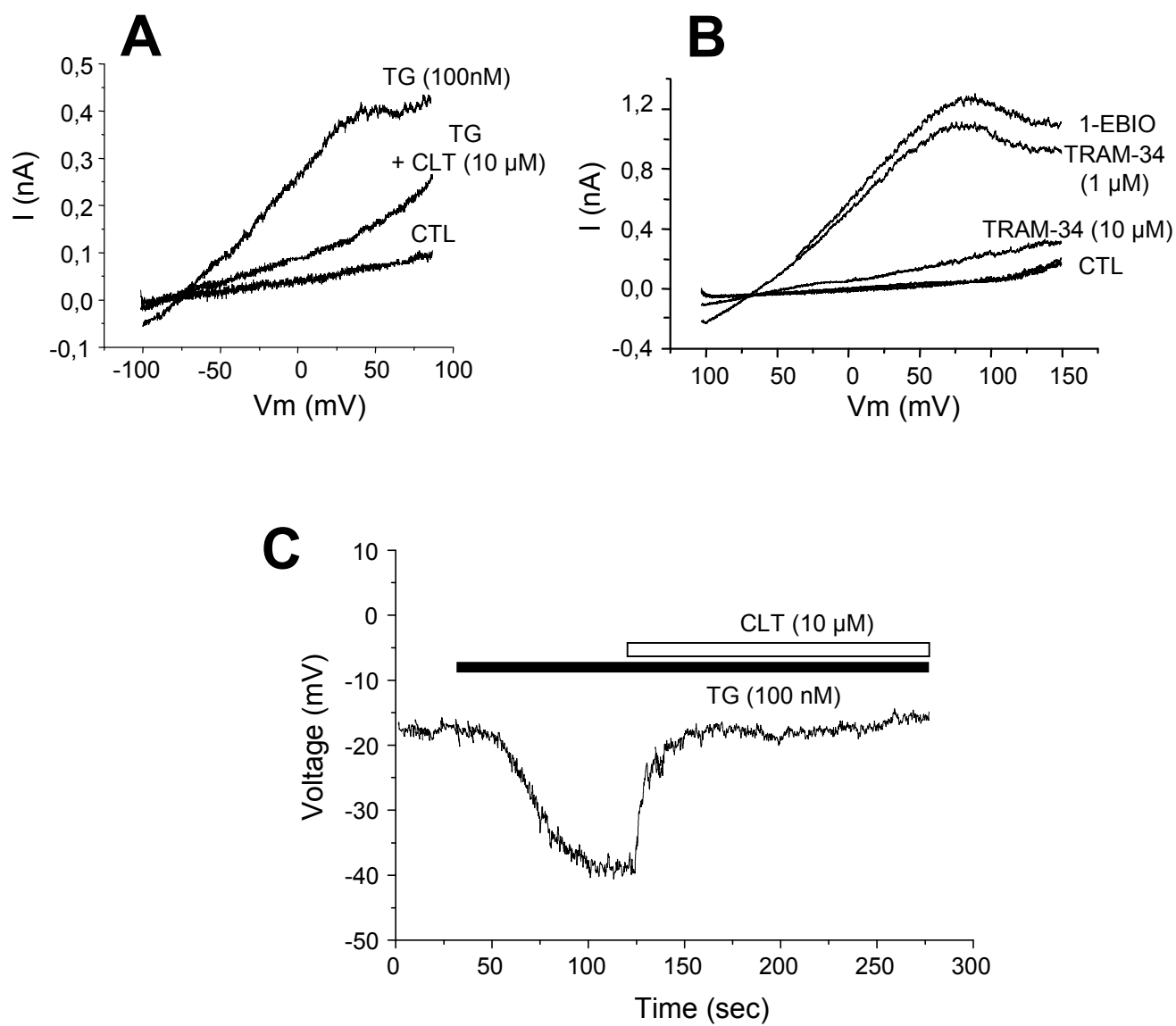
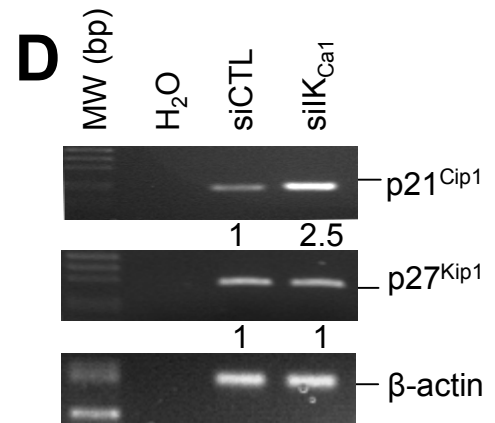
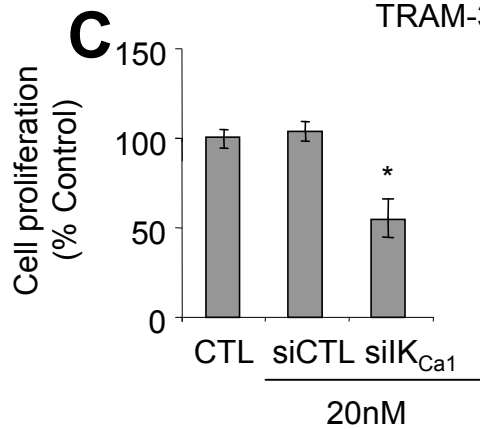
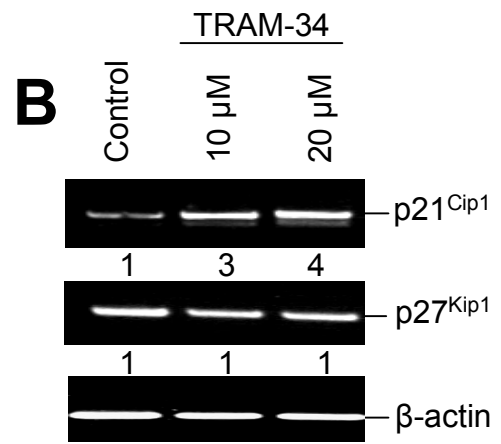
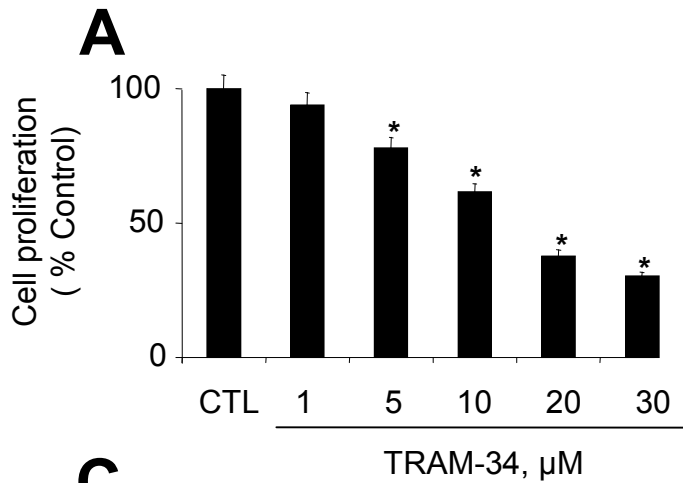


Figure 3: Lallet-Daher et al., 2008

LNCaP



PC-3

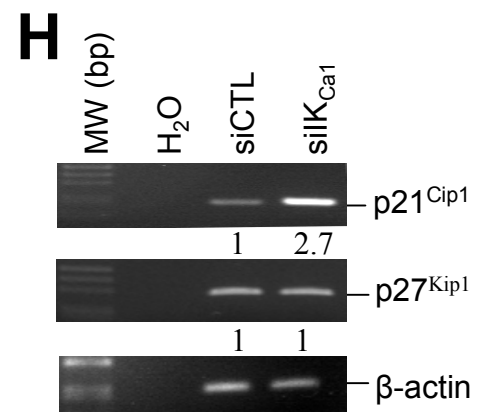
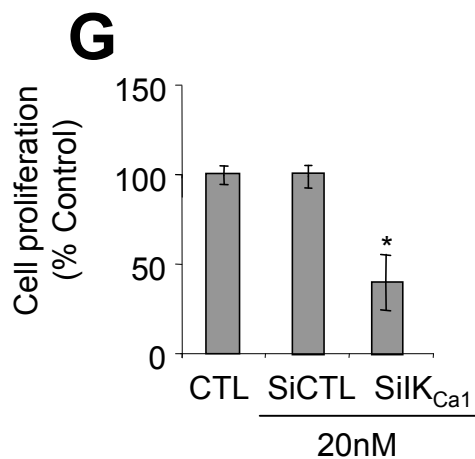
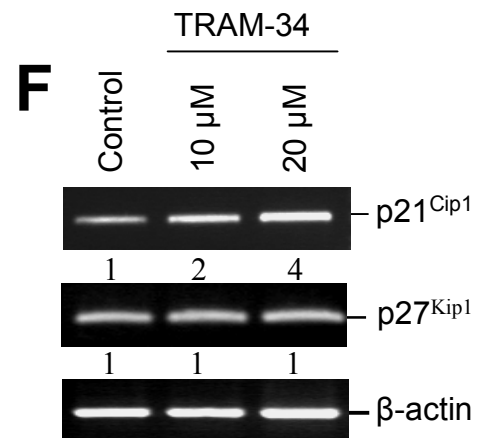
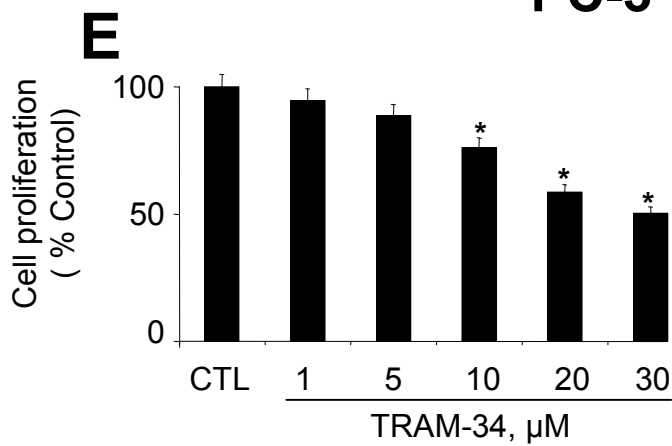


Figure 4: Lallet-Daher et al., 2008

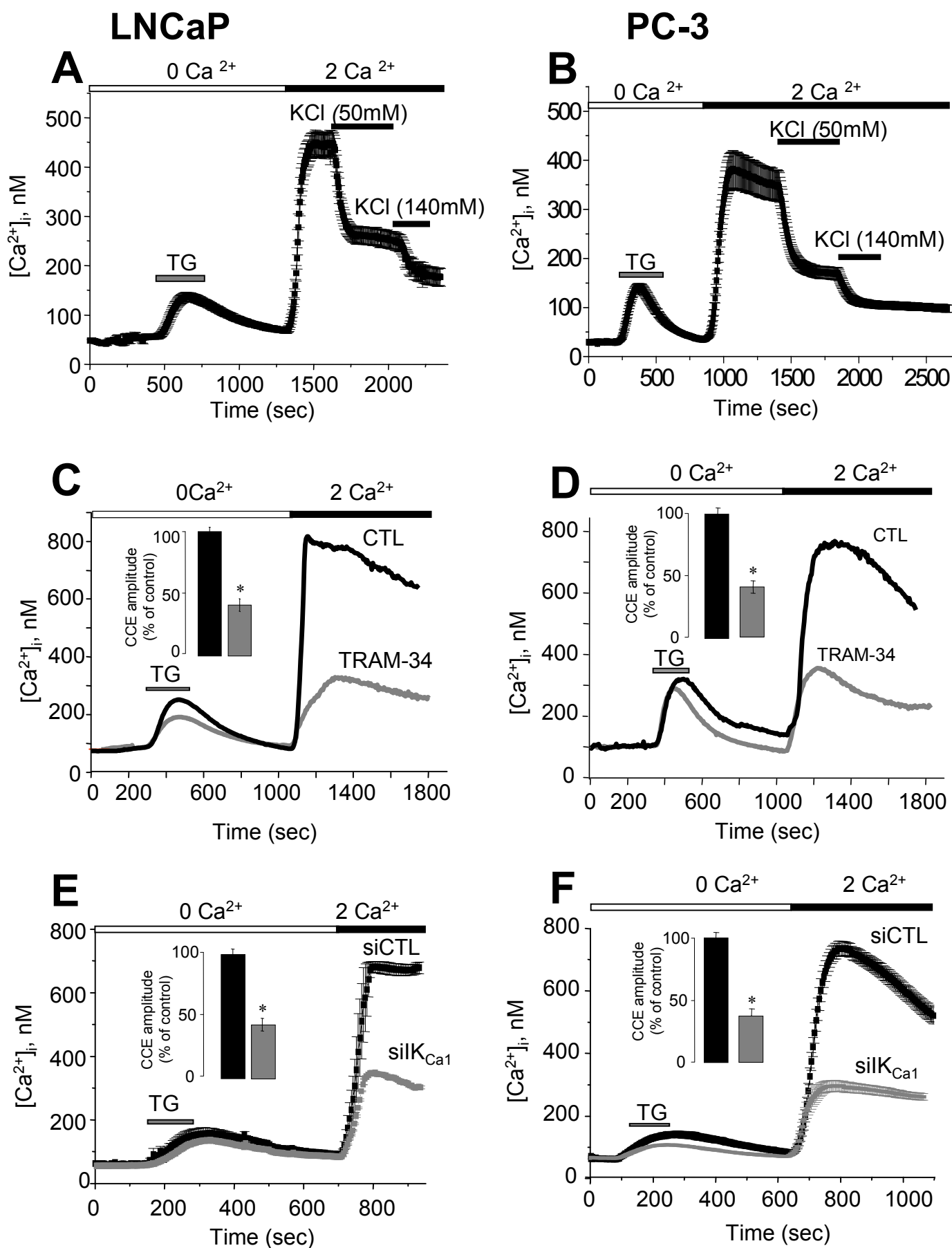


Figure 5: Lallet-Daher et al., 2008

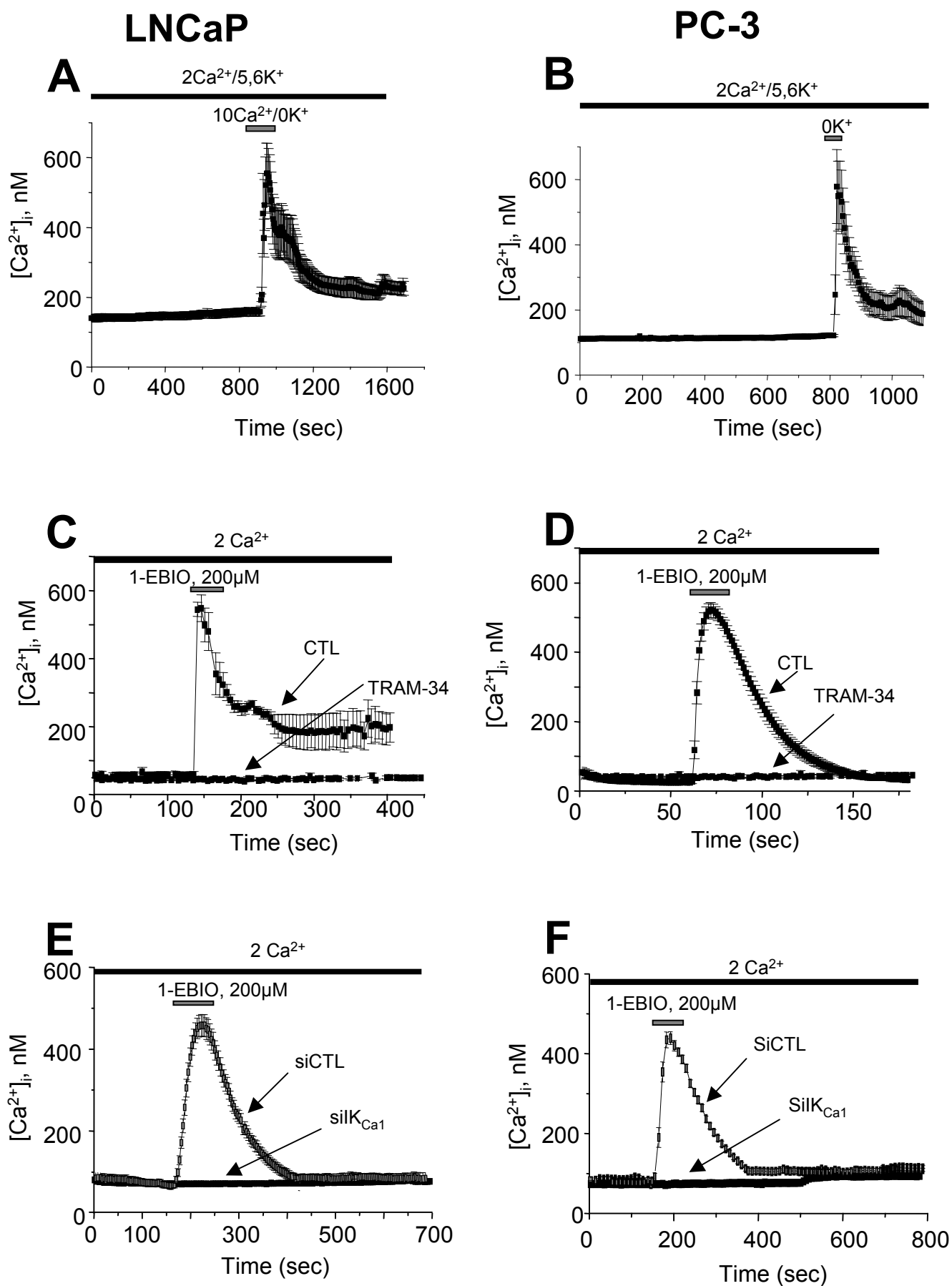


Figure 6: Lallet-Daher et al., 2008

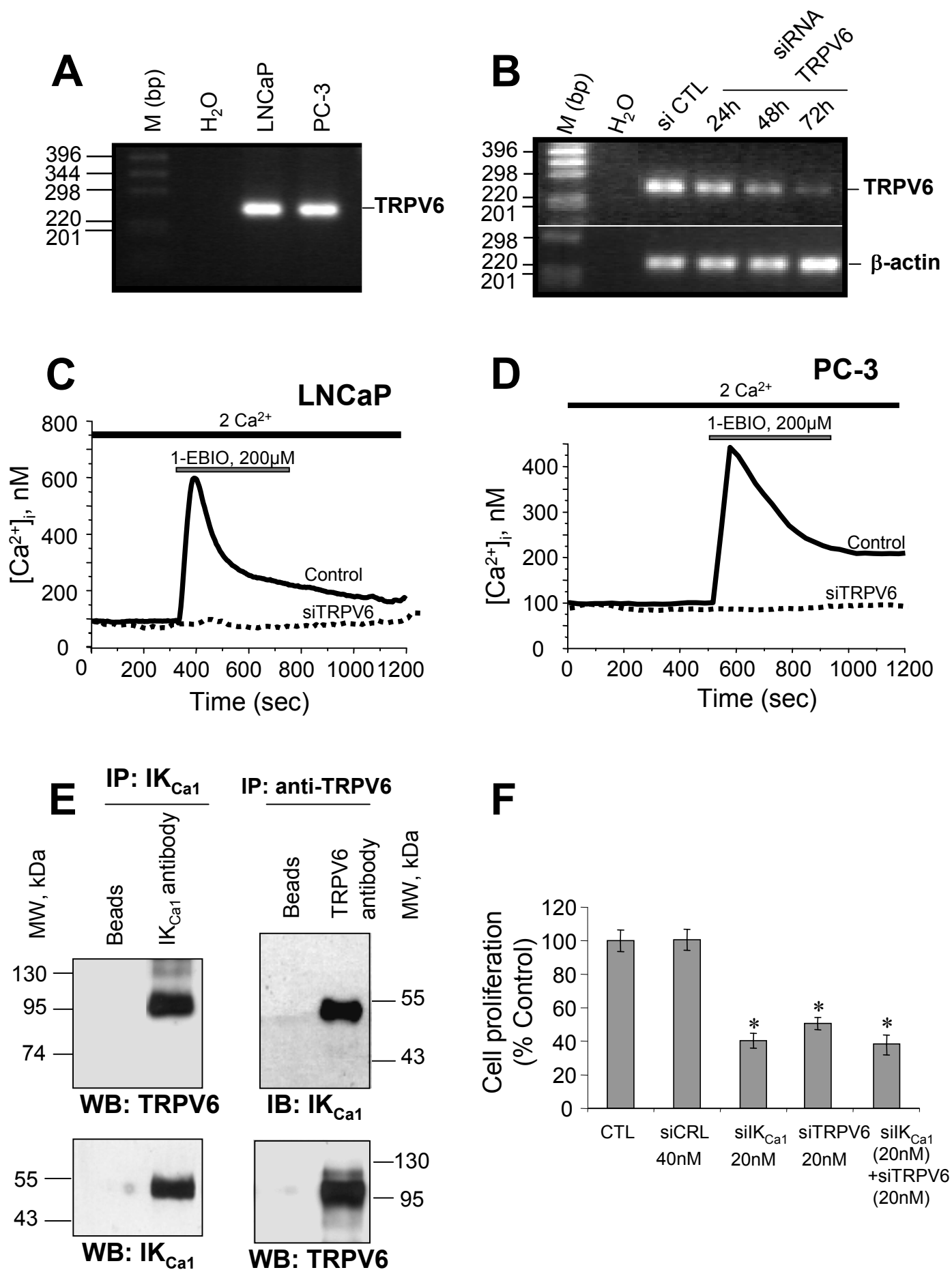


Figure 7: Lallet-Daher et al., 2008

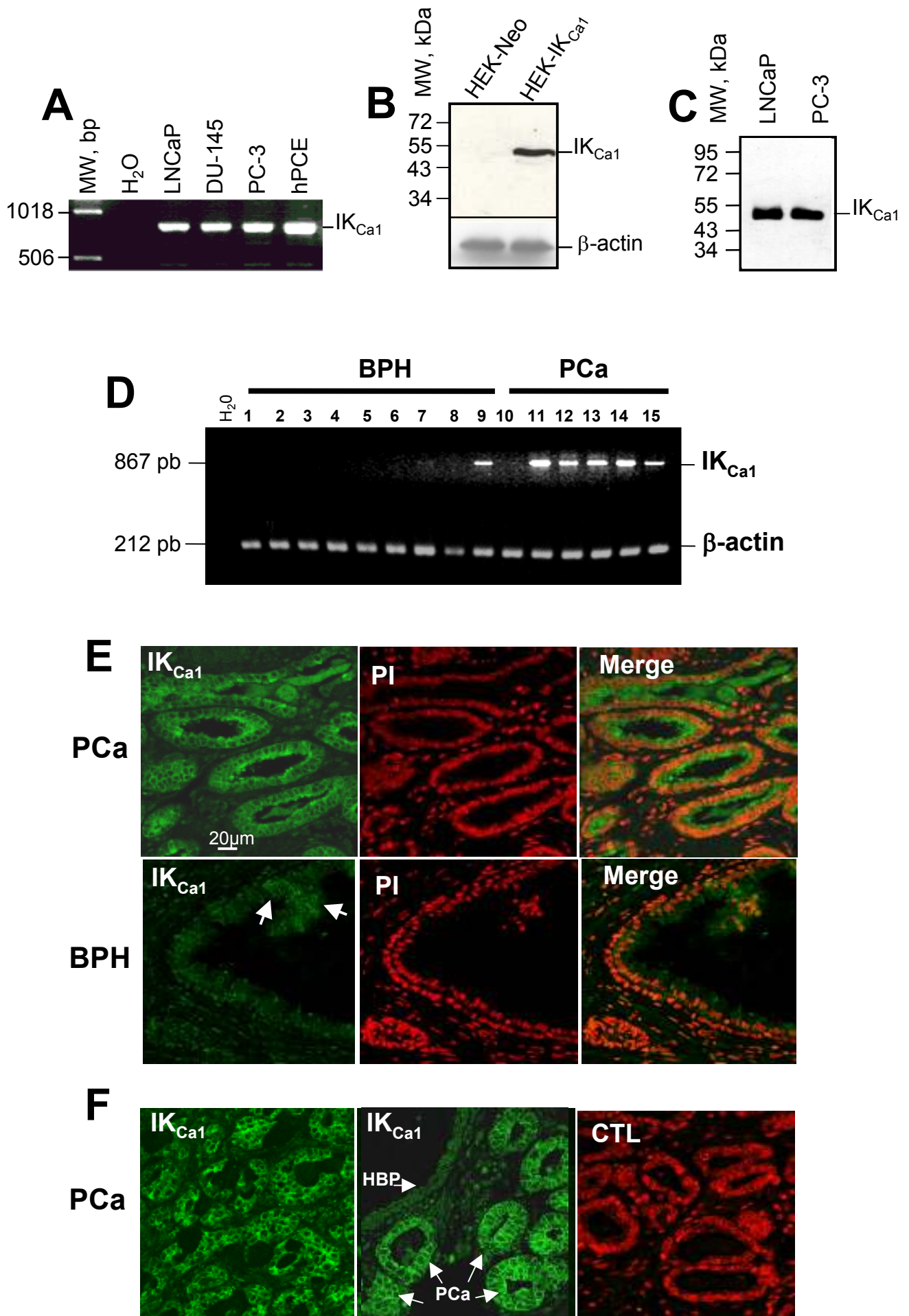


Figure 1: Lallet-Daher et al., 2008

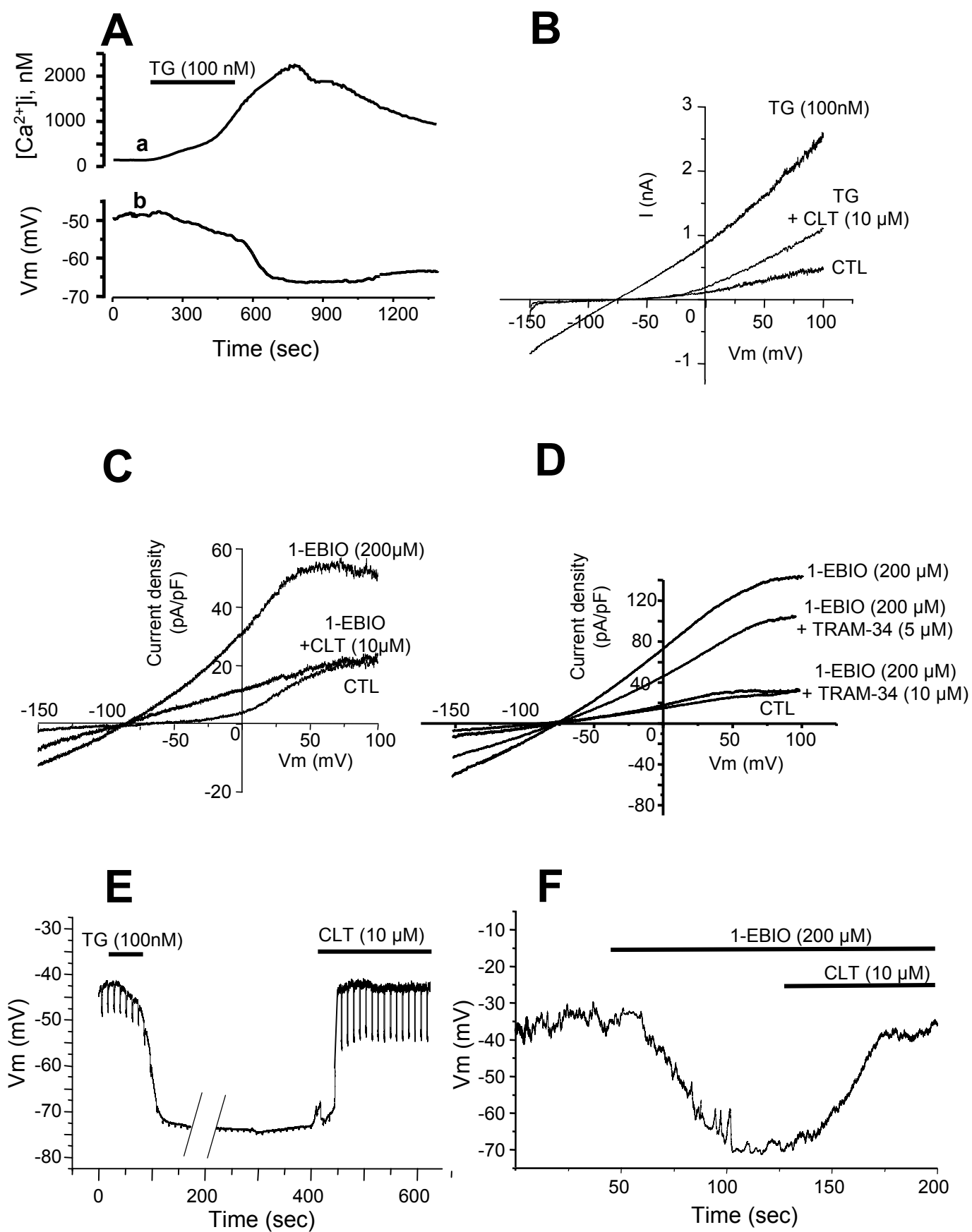


Figure 2: Lallet-Daher et al., 2008

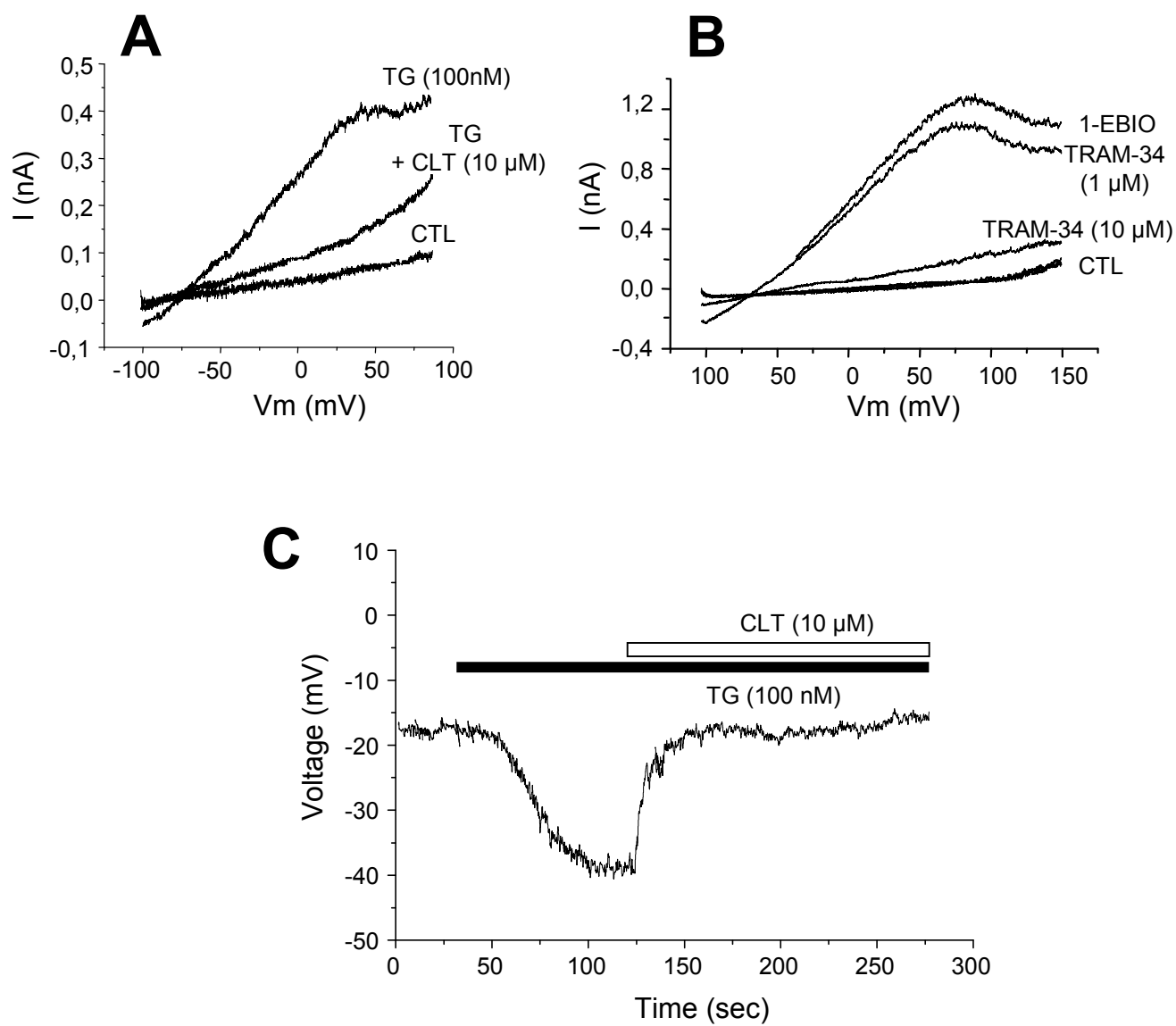
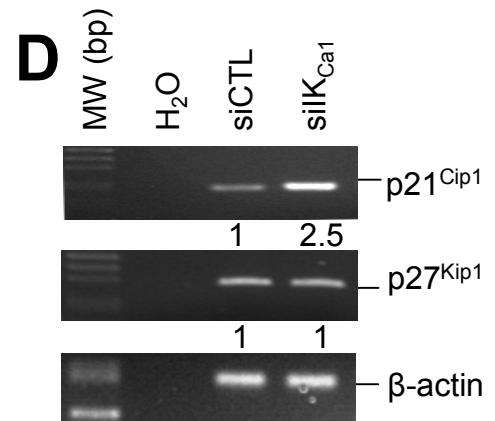
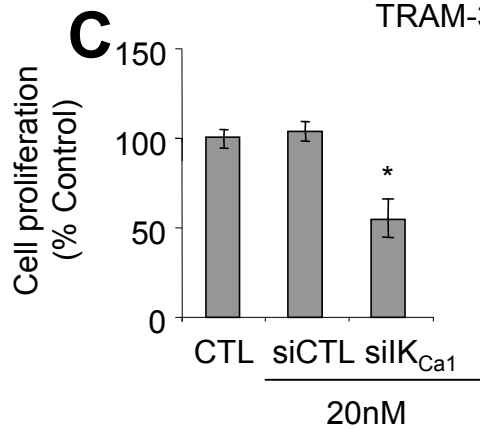
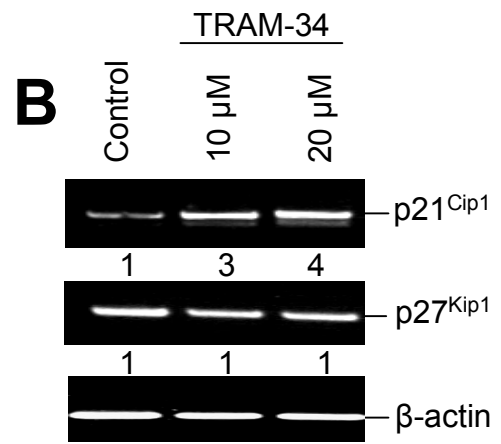
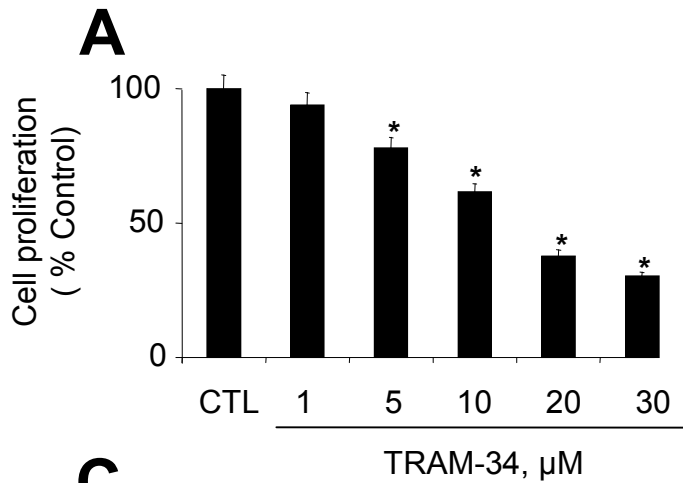


Figure 3: Lallet-Daher et al., 2008

LNCaP



PC-3

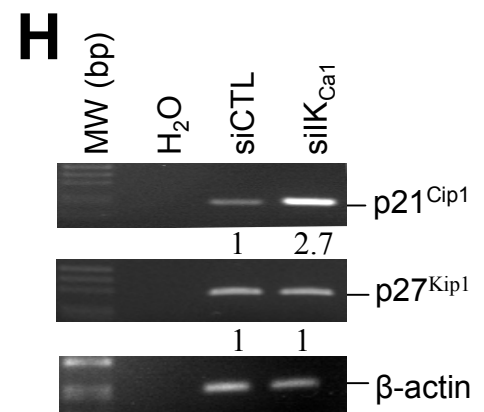
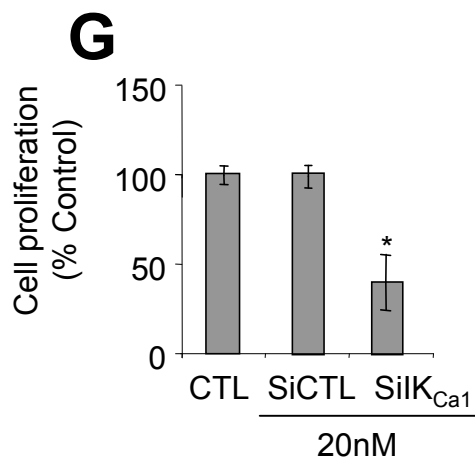
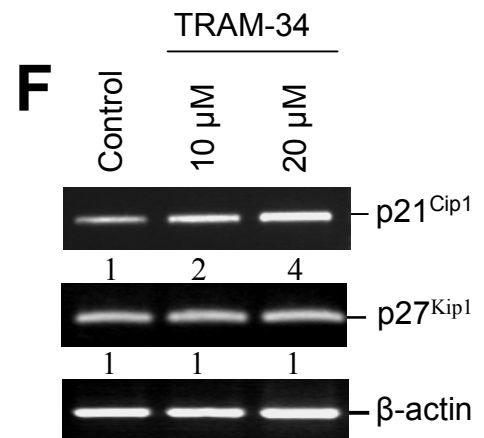
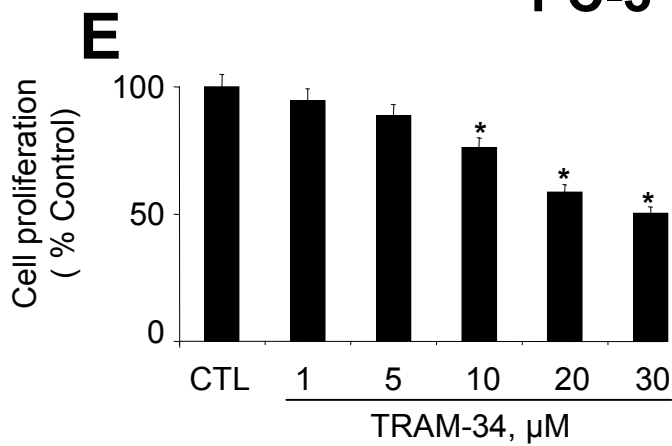


Figure 4: Lallet-Daher et al., 2008

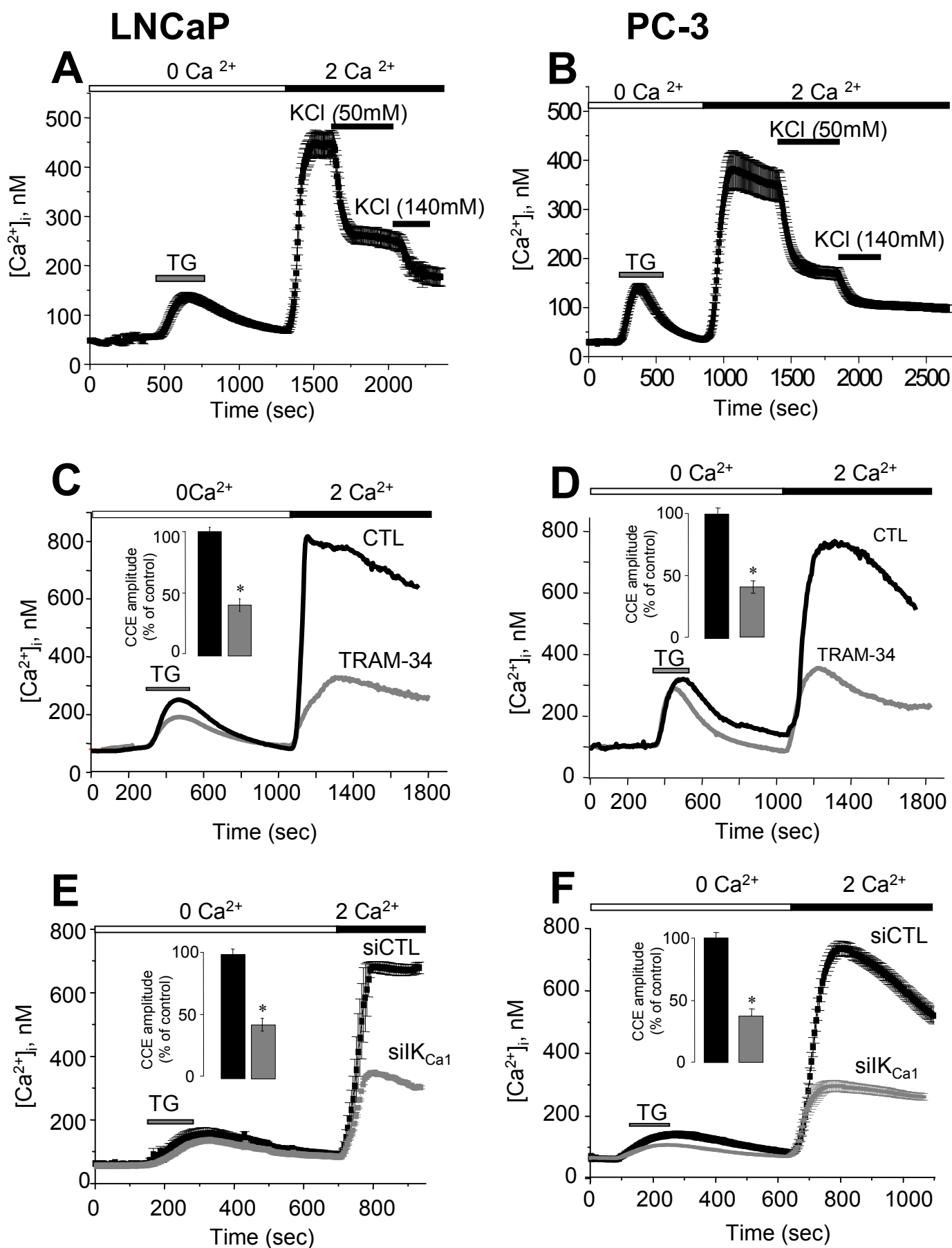


Figure 5: Lallet-Daher et al., 2008

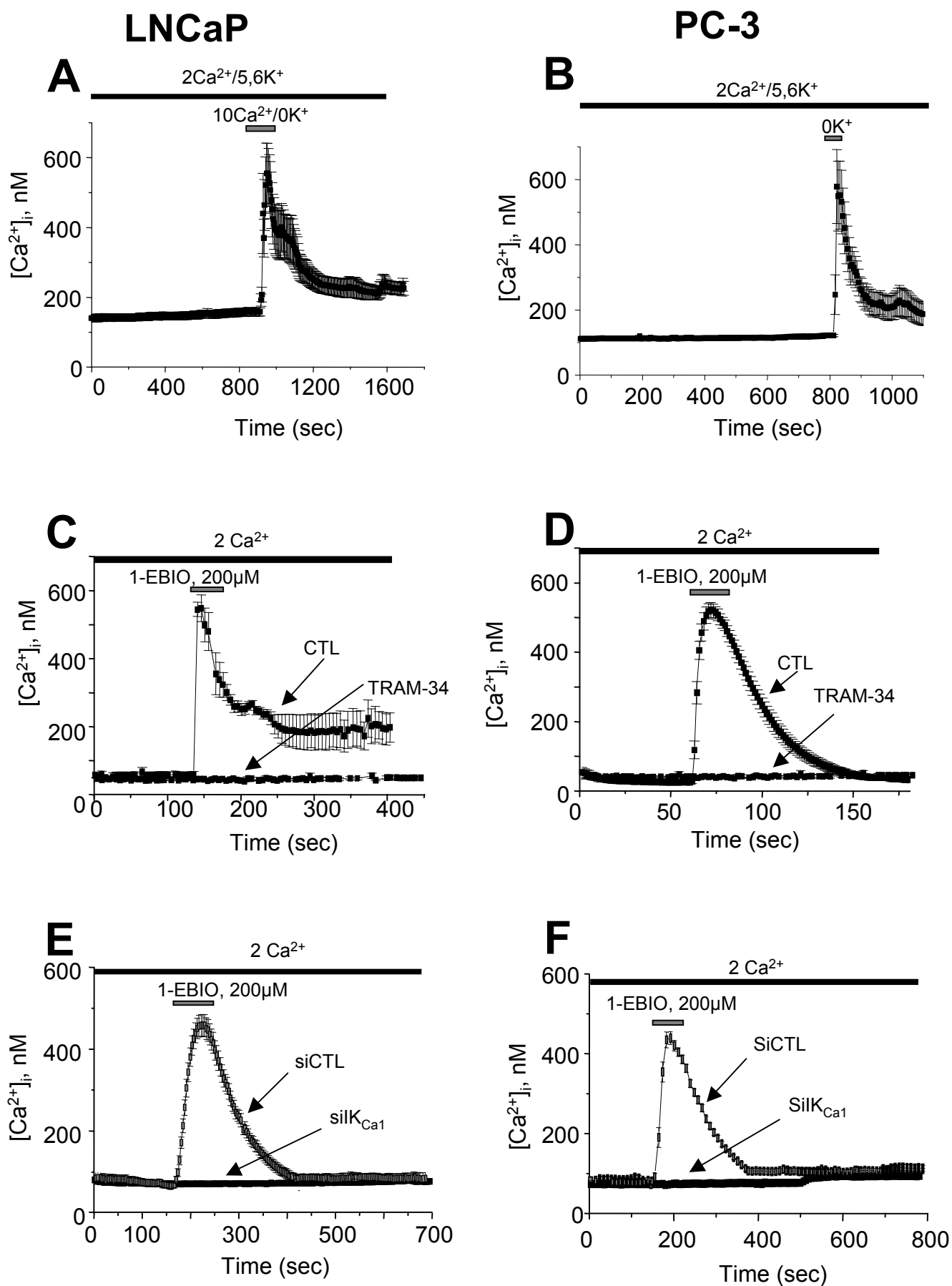


Figure 6: Lallet-Daher et al., 2008

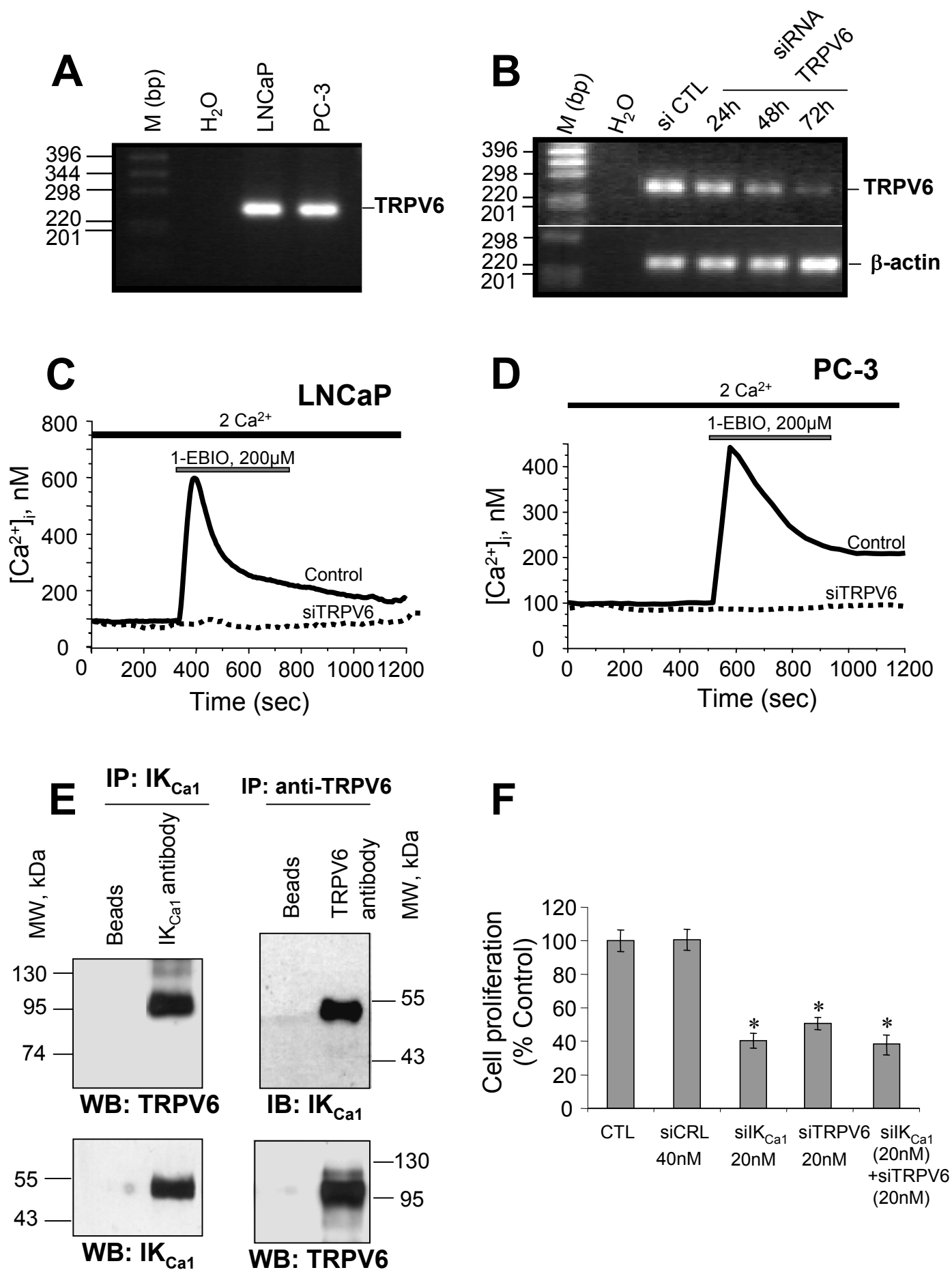
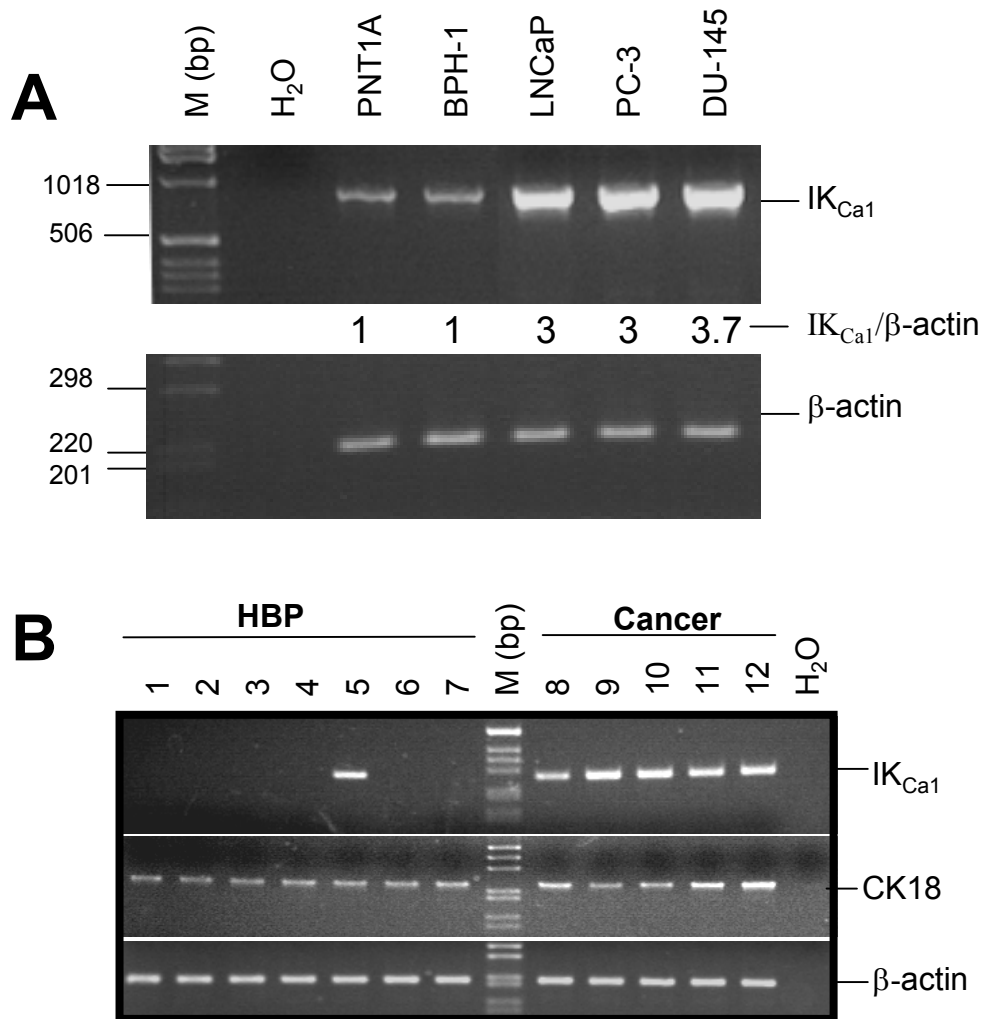


Figure 7: Lallet-Daher et al., 2008

Supplemental data: Figure 1

Expression of IK_{Ca1} potassium channel in human prostate cells and tissues

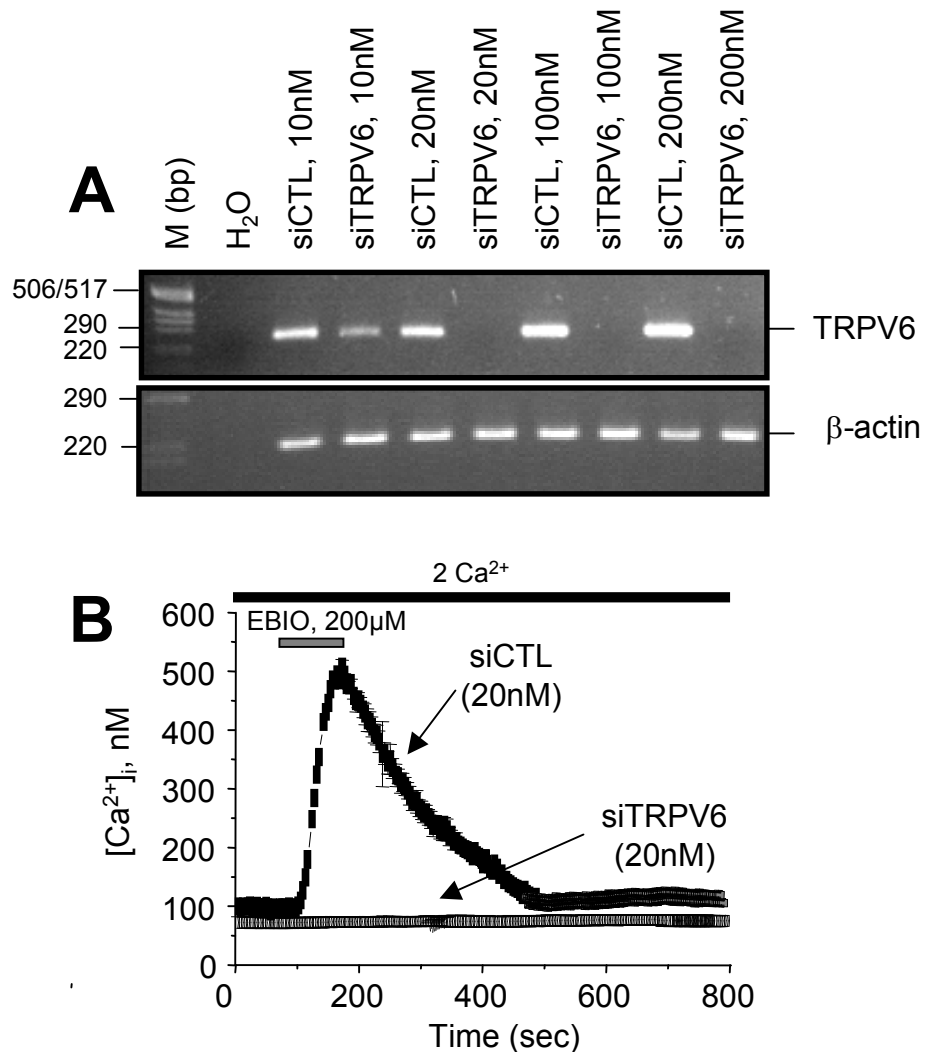


IK_{Ca1} expression level was studied at the mRNA level by RT-PCR in human prostate non-cancer (PNT1A, BPH1) and cancer (LNCaP, DU-145, PC-3) cells (**A**) as well as in benign prostate hyperplasia (BPH) and prostate cancer tissues (**B**). The RT-PCR was performed as described in *Materials and Methods*. IK_{Ca1} expression level was 3 fold higher in human prostate cancer cell lines compared to that of transformed cell lines issued of a healthy patient (PNT1A) or from a BPH (BPH1).

In human prostate issue specimens, IK_{Ca1} mRNA was preferentially expressed in cancer tissue (**B**). The absence of the IK_{Ca1} expression in BPH tissues was not due to the absence of epithelial cells as judged by the homogenous expression of Cytokeratin 18 (CK18), a apical epithelial cells marker in BPH and cancer tissues.

Supplemental data: Figure 2

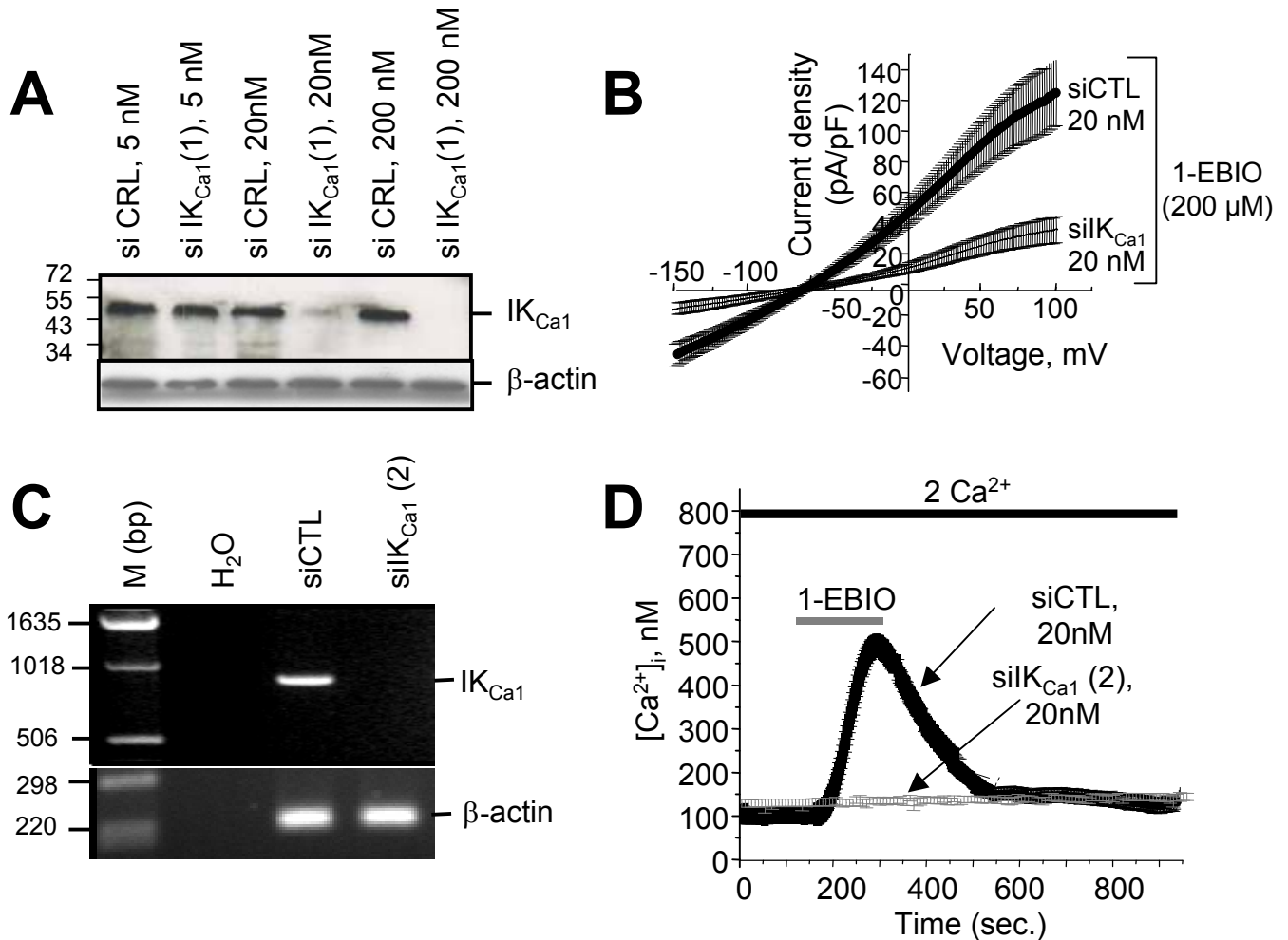
Involvement of TRPV6 in IK_{Ca1} -induced calcium entry in LNCaP prostate cancer cells.



LNCaP were transfected for 72h with 10-200 nM of either siRNA control (siRNA number 1, Dharmacon Inc.) (siCTL) or siRNA raised against TRPV6 mRNA (GACUCUCUAUGACCUCACA, Accession number NM_018646, nt 1041-1059) (siTRPV6) using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) according to the manufacturer's recommended protocol. The cells were then used either for RT-PCR experiments for TRPV6 mRNA expression (**A**) or for calcium imaging experiments (**B**). The RT-PCR experiments were performed on total RNAs isolated from LNCaP cells as described in the manuscript. For PCR amplifications, TRPV6 cDNA specific primers (Invitrogen) were used. β-actin cDNA expression was used as an internal standard of the cDNA amounts used for each sample. These experiments show the efficiency of the TRPV6 siRNA to down-regulate the expression of the calcium channel in LNCaP cells. For the calcium imaging experiments (**B**), cells were loaded with Fura2/AM calcium probe as described in the manuscript and then the effects of the IK_{Ca1} activator (1-EBIO, 200 μM) on the intracellular free calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) were studied on cells transfected for 72h by either Control siRNA (siCTL, 20 nM) or by (siTRPV6, 20 nM) and a representative experiment is presented in (B). These observations suggest that the TRPV6 channel mediates the IK_{Ca1} -induced calcium entry in LNCaP cells.

Supplemental data: Figure 3

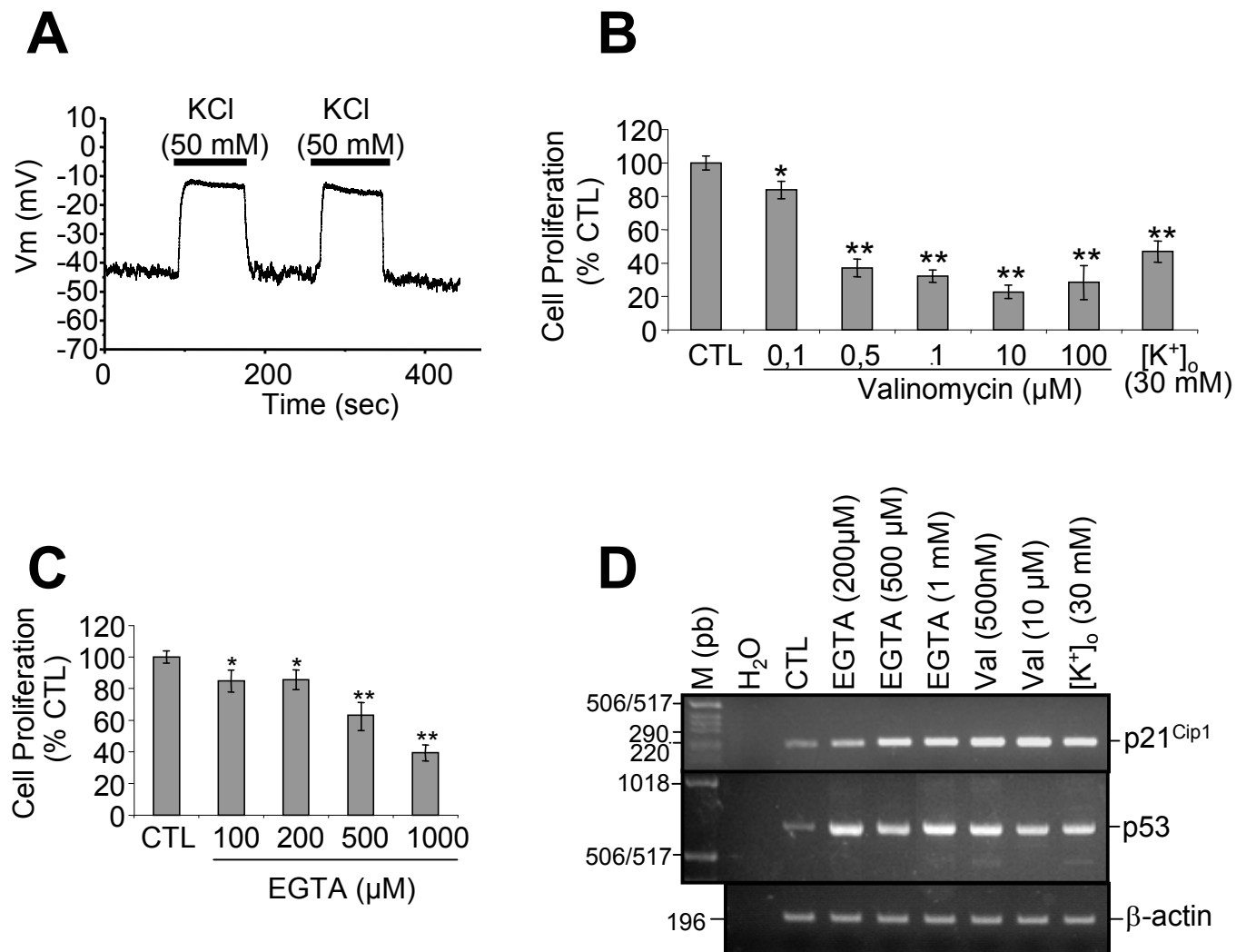
Functionality of IK_{Ca1} potassium channel in LNCaP prostate cancer cells.



Two siRNAs raised against IK_{Ca1} mRNA (si IK_{Ca1}) were used to study the functionality of the potassium channel in prostate cancer cells. LNCaP cells were transfected for 72h with 5-200 nM of either siRNA control (siRNA number 1, Dharmacon Inc.) (siCTL) or siRNAs raised against IK_{Ca1} mRNA {si IK_{Ca1} (1): UGUAAAGCUUGGCCACGAAC, nt 975-994; si IK_{Ca1} (2): CCUGUCCUGGUUAAAUGC, nt 567-585, Accession number NM_002250) using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) according to the manufacturer's recommended protocol. The cells were then used for either IK_{Ca1} protein expression by western-blot analysis (A) or IK_{Ca1} mRNA expression by RT-PCR (C) as described in *materials and methods*. β -actin expression was used as an internal standard of protein or mRNA amounts used for each sample. These experiments show the efficiency of both IK_{Ca1} siRNAs to down-regulate the expression of the potassium channel in LNCaP cells. In order to study the functionality of IK_{Ca1} potassium channel in LNCaP prostate cancer cells, either electrophysiological experiments in whole cell configuration (B) or by calcium imaging (D). In electrophysiological experiments, a voltage ramp of -150mV to +100 mV was applied to the LNCaP cells and the resulting currents were recorded after application of 1-EBIO (200 μ M) on the cells treated with either control siRNA (siCTL) (n = 20) or with si IK_{Ca1} (1) (20 nM) (n = 20) and the mean currents in each condition is presented in B. In calcium imaging experiments, 1-EBIO (200 μ M) was applied to the cells treated with either control siRNA (siCTL) (n = 80) or with si IK_{Ca1} (2) (20 nM) (n = 80). These observations suggest that the IK_{Ca1} channel is functional in LNCaP cells and the functionality of the channel is responsible for the 1-EBIO-elicited currents and calcium increase in these cells.

Supplemental data: Figure 4

Effects of membrane potential and extracellular calcium concentration on prostate cancer cell proliferation and p21^{Cip1} expression



The membrane potential of LNCaP cells was measured by electrophysiological technique of patch clamp in whole cell configuration as described in *Materials and Methods*. External application of LNCaP cells with 50 mM K⁺ containing solution induced a depolarization of the membrane potential, showing the involvement of K⁺ ion in LNCaP cells membrane potential (**A**).

Addition of a potassium ionophore (Valinomycin) or depolarizing the membrane potential by increasing the external potassium concentration ([K⁺]_o) (**B**) induced LNCaP cells growth arrest. In the same way, reducing extracellular calcium concentrations by the addition of a calcium chelating agent (EGTA) in the culture medium induced LNCaP cells growth arrest (**C**). The effects of the depolarization of the cells membrane potential (Valinomycin, increase in extracellular potassium)(**B**) or decrease in the calcium entry on cells growth was accompanied by the mRNA expression of p21^{Cip1} and p53, a protein known to be involved in the modulation of the p21^{Cip1} expression (**D**).

Article 2

Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate the neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells: Involvement of REST transcription factor

H. Lallet-Daher, F. Gackière, P. Mariot, R. Urbain, P. Gosset, P. Delcourt, L. Fleurisse, C. Slomianny, E. Dewailly, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma N. Prevarskaia and M. Roudbaraki

(En cours de soumission *Cell Death and Differentiation*)

Dans les études précédemment décrites, afin d'étudier l'implication du canal potassique IK_{Ca1} dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques, nous avons utilisé la méthode pharmacologique (TRAM-34, un inhibiteur du canal) et la stratégie ARN interférent (siARN) permettant de diminuer ou de supprimer l'expression du canal. En utilisant ces méthodologies permettant d'inhiber ou de supprimer le canal IK_{Ca1} , nous avons observé que l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques était accompagnée de l'apparition du phénotype des cellules différenciées avec le développement des prolongements cellulaires.

Par la suite, nous avons mené des travaux pour étudier la corrélation entre l'expression du canal IK_{Ca1} et la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Nous avons montré que la suppression (stratégie siARN) ou l'inhibition du canal était accompagnées de l'expression des marqueurs des cellules neuroendocrines (Neurone specific enolase, NSE et Chromogranine A, CgA) et l'expression protéique et fonctionnelle d'un canal calcique de type T précédemment décrit par les chercheurs de notre laboratoire pour être surexprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques lors de la différenciation neuroendocrine (NE). Nous avons également montré que l'induction de la différenciation par le traitement des cellules par de AMPc/IBMX ou par incubation des cellules dans un milieu dépourvu des stéroïdes est accompagnée l'expression du canal calcique voltage-dépendant de type T et par la suppression de l'expression du canal potassique IK_{Ca1} . L'étude du mécanisme régissant ces remaniements d'expression des canaux ioniques dans la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques a montré qu'un facteur de transcription, NRSF (*neuron-restrictive silencer factor*) (ou REST) était impliqué et dont l'expression augmentait lors de la différenciation neuroendocrine. Ce facteur NRSF, un facteur de transcription considéré comme un suppresseur de tumeurs, est connu pour son rôle répresseur de la transcription du gène d' IK_{Ca1} .

Par des études de surexpression ou suppression, nous avons clairement établi le lien entre l'induction de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses, l'expression

de ce facteur de transcription REST, l'expression du canal calcique voltage-dépendant de type T Cav3.2 ($\alpha 1$ -H) et la suppression de l'expression du canal potassique de type IK_{Ca1} . **Ces études montrent clairement le rôle central joué par le canal IK_{Ca1} pour diriger les cellules dans le sens de la prolifération par sa présence et dans le sens de la différenciation neuroendocrine par son absence.**

Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate the Neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells: Involvement of REST transcription factor

H. Lallet-Daher^{*1}, F. Gackière¹, P. Mariot¹, R. Urbain², P. Gosset³, P. Delcourt¹, L. Fleurisse³, B. Mauroy⁴, JL Bonnal⁴, R. Skryma¹, N. Prevarskaya^{1‡} and M. Roudbaraki^{*‡1}
INSERM U800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq F-59655, France, and USTL (Université des Sciences et Technologies de Lille), Villeneuve d'Ascq F-59655, France.

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire; INSERM U800

²Institut de Recherche Pierre Fabre

³Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille

⁴Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert

Running title: IK_{Ca1} and prostate cancer cell differentiation.

Key words: Intermediate conductance potassium channels, IK_{Ca1} , TRPV6, Cav3.2, Prostate cancer, differentiation, proliferation, Capacitative Calcium Entry, patch clamp.

Abbreviations: IK_{Ca1} , Ca^{2+} -activated K^+ channel with intermediate conductance; BK, Ca^{2+} -activated K^+ channel with big conductance; 1-EBIO, 1-ethyl-2-benzimidazolinone; TRAM-34, 1-[(2-chlorophenyl)diphenylmethyl]-1*H*-pyrazole; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; CRAC, calcium release-activated Ca^{2+} channel; CCE, capacitative calcium entry.

ABSTRACT

Expression of IK_{Ca1} potassium channel plays an important role in prostate cancer cell proliferation. Here, we report that the induction of Neuroendocrine differentiation (NED) in prostate cancer cells is associated with down-regulation of the IK_{Ca1} potassium channel expression. Interestingly, the pharmacologically or siRNA-induced inhibition or down-regulation of the IK_{Ca1} induced morphological and molecular Neuroendocrine differentiation with the apparition of the NED markers (NSE, CgA Cav3.2 calcium channel) in prostate cancer cells. We also showed that the PCa cells NED is associated also with the increase in the repressor element 1 (RE1)-silencing transcription factor (REST or NRSF) expression. As the gene encoding IK_{Ca1} contains a functional RE-1 REST binding site and is repressed by REST, we showed that the down-regulation of IK_{Ca1} in NED is mediated by the increase in the REST expression. Furthermore, exogenous REST induced NED and reduced the expression of IK_{Ca1} . Interestingly, the exogenously expressed IK_{Ca1} in PCa cells prevented the induction of the NED and the associated NED markers, suggesting a central role for IK_{Ca1} to maintain the PCa cells in proliferative state and its absence induces NED in these cells. Here, we show REST plays a previously unrecognized role as a switch regulating potassium channel expression and consequently the phenotype of PCa cells.

INTRODUCTION

The prostate cancer (PCa) is currently the most frequently diagnosed form of cancer in men and the second leading cause of cancer-related deaths among males. PCa is dependent on the androgens in the early stages. Consequently, androgen ablation therapies may, at this time, cause a tumor to regress. Nevertheless, these treatments do not prevent evolution to an androgen-independent stage, for which there is currently no successful therapy (Feldman and Feldman, 2001). Therefore, an understanding of what drives the progression to androgen independence is critical. It is well established that androgen-independence is associated with tumor enrichment in cell phenotypes, for which apoptosis inhibition rather than enhanced proliferation is the main feature (Raffo et al., 1995; Fixemer et al., 2002). Thus, an understanding of the physiological, cellular, and molecular mechanisms underlying prostate cancer progression is critical in the development of novel and more effective therapies against this disease.

Recently, neuroendocrine differentiation has gained increasing interest as a likely mechanism contributing to prostate cancer progression. Neuroendocrine tumours are defined by a common phenotype, characterized by the expression of general neuroendocrine markers and sometimes by cell specific hormonal products. Multiple lines of evidence support the idea that malignant prostate cell precursors can differentiate into neuroendocrine-like (NE) cells, both *in vitro* and *in vivo* (Deeble PD et al., 2001), and these NE cells are involved in the development of advanced

disease. A large number of clinical studies have demonstrated that prostatic NE cells and their associated markers serve as prognostic indicators of tumor progression and patient survival (Hvamstad T et al., 2003). Nevertheless, accumulating molecular evidence indicate a high probability of NE cell involvement in androgen-independent prostate cancer progression and metastases. These present study have been carried out in the androgen-responsive LNCaP cell line. The LNCaP cell acquire NE characteristics in response to treatment with physiological and pharmacological agents that elevate intracellular cAMP, such as epinephrine, isoproterenol, forskolin and dibutyryl cAMP ((Deeble PD et al., 2001). NE phenotype was monitored in these studies by the appearance of the extension of neurolike processes, loss of mitogenic activity, and the expression of NE markers. Two major markers that reflect NE status are chromogranin A (CgA) and neuron-specific enolase (NSE) (Abrahamsson PA. 1999) and the concentration of CgA and NSE have been reported to be elevated in relation to neuroendocrine differentiation of prostate cancer. Conversely, the NE-cell phenotype is associated with the lack of both prostatic-specific antigen (PSA) and the androgen receptor (AR) (di Sant'Agnese PA. 2001). Calcium, a universal regulator of cell function, is required for growth and differentiation (Wamhoff BR et al., 2004)(Golovina VA et al., 2001). It is believed that specific patterns of changes in the cytosolic-free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) are used to control cellular processes such as gene transcription, cell proliferation, differentiation, and secretion. Calcium dynamics and influx have long been associated with secretory function in neuronal cells; and are likely to play a role in acquisition of NE characteristics by prostate cancer cells. NE-differentiation regimens results in a reduced endoplasmic reticulum Ca^{2+} store content and apoptotic resistance in prostate cancer cells (Vanoverbergh K et al., 2004), suggesting that intracellular calcium signalling is involved in the development of the NE phenotype. This is reinforced by studies demonstrating the overexpression of α_1 -H T-type calcium channels during NE differentiation in LNCaP prostate cancer cells (Mariot P et al., 2002). The calcium channel was further shown to be involved in secretion in Neuroendocrine differentiated LNCaP cells (Gackière et al., 2008). Another class of ion channels, the potassium channels, are also shown to be centrally involved in the cell differentiation process, with several types being either upregulated or downregulated during the complex steps leading to differentiated cells (Bernheim and Bader, 2002) (Fioretti et al., 2004). Nevertheless, studies clearly showed that potassium channels are essential for cell proliferation and appear to play a role in carcinogenesis. In a previous work, we showed that

the IK_{Ca1} potassium channel (Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels also known as $IK_{Ca3.1}$, hIK , and $KCNN4$) controls prostate cancer cell proliferation by close regulation of passive calcium entry *via* TRPV6 calcium channel (Lallet-Daher et al., 2008).

The aim of the present investigations was to explore the relationship between NE differentiation of the human prostate cancer cells and the IK_{Ca1} potassium channel. As the IK_{Ca1} expression is under the control of a silencer transcription factor REST (RE-1 silencer of transcription), a transcriptional repressor which binds to the RE-1 element present in the potassium channel gene (Bruce et al., 2005), this work was undertaken to study the relation between the induction of the NE differentiation, the expression of the REST protein, the IK_{Ca1} expression and the appearance of the NE differentiation markers in human prostate cancer cells.

MATERIAL AND METHODS

Cell culture and treatments

LNCaP prostate cancer cell line, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), were cultured as described by (Gackiere et al., 2006). The cells were seeded in either 60-mm (for RT-PCR analysis) or 35 mm Petri dishes, with or without coverslips, for calcium imaging and electrophysiological studies. For the induction of the neuroendocrine differentiation, the LNCaP cells were treated for 1-5 days with cAMP permeant analogs (dibutyryl cAMP (Bt_2cAMP), 8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP), 1 mM) and/or a phosphodiesterase inhibitor (isobutylmethylxanthine, IBMX, 100 μ M). Alternatively, the cells were incubated in phenol red-free and steroid-depleted medium (-ST) to induce neuroendocrine differentiation of LNCaP cells.

Charcoal-stripped medium

To deplete the steroids, FCS (fetal calf serum) was incubated with charcoal 10% (w/v) under agitation for 16 h at 4°C. Following 1 h's centrifugation at 10 000 g and 4°C, the supernatant was collected and centrifuged again for 30 min at 27 000 g. The resultant supernatant was filtrated through 0.22 μ m filters. Before use, the charcoal-stripped FBS was decomplexed for 30 min at 56°C.

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA was isolated as described by Chomczynski et al. (Chomczynski and Sacchi, 1987). After DNase I (Invitrogen) treatment to eliminate genomic DNA, RT-PCR experiments were carried out using a GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler (Applied Biosystems), as previously described (Roudbaraki et al., 1999). The PCR primers used in this study, listed in Table 1,

were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen.

Semi-quantitative RT-PCR experiments were performed using specific primers (Table 1). The expression of β -actin mRNA was used as an internal standard. PCRs were carried out using 1 μ l of either a 5-fold (cell cycle markers) or 10-fold (β -actin) diluted samples of the RT reaction of different LNCaP cells samples. The conditions were as follows: 7 min at 95°C, then 32-34 cycles of 30 sec extension at 72°C each, and a final 7 min extension step. Half of the PCR samples were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml) and viewed by Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Gene	Seas (5'→3')	Antisens (3'→5')	Fragment size (bp)	Accession number
IKCa1	GCTGGAGTTTAA CAAGGCAGA	TCCTGCACCTGA GGAGCTTT	618	NM_002250
REST	GAATCTGAAGAA CAGTTTGTCGA	TTTGAAGTGTCT CTATCTGCTGT	627	NM_005612
TRPV6	ATGGTGATGCG GCTCATCAGTG	GTAGAAGTGG CTTADCTCTCG	255	NM_001126541
CaV3.2	GTGGTCGAGAAC TTCCACAAGT	GAAGACGTAGTT GCACTACTT	205	NM_021098
NSE	TGAGGATGGAG ACAAACAG	CTTGTCTGATGC TCTCTTAC	528	X14327
CgA	GATTTCAGGAGG ACAGAA	AGGAGAGACAG GAGCACT	496	NM_001275
β -actin	CAGAGCAGAA GAGGCATCT	GTGAACTGCT CAACATGATC	212	NM_001101

TABLE 1: List of primers used for RT-PCR studies

Plasmides expression vectors and siRNA cell transfections

Plasmides expression vectors for IKCa1 (pN1n-IKCa1), REST (pCDNA3-REST), pmaxGFP expression vector encoding the green fluorescent protein (GFP) and the plasmide vector for the expression of the siRNA targeting and down-regulating the human REST (ShREST) were used in the present work. Three μ g of each plasmide were nucleofected in 2×10^6 LNCaP cells using Amaxa nucleofector system according to the recommended protocols provided by the Amaxa compangny. The transfection of the LNCaP cells by pmaxGFP was used to control the transfection efficiency and for control of the transfection with a vector bearing any genes of interest in the present study. The pmaxGFP vector expressing cells can easily be analyzed by fluorescence microscopy to monitor also the transfection efficiency.

For siRNA experiments, LNCaP cells were transfected overnight with 20nM of control siRNA (siRNA number 1, Dharmacon Inc.) or raised against IKCa1 mRNA (siIKCa1) (UGUAAAGCUUGGCCACGAAC, Accession number NM_002250, nt 975-994) using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) in serum-free DMEM, according to the manufacturer's instructions. The cells were then incubated in RPMI containing 10% SVF for three days to down-regulate the IKCa1 mRNA prior to use in experiments.

Western Blot Analysis

Cells cultured at 80% of confluency were harvested and total proteins extracted and then, 10-50 μ g of each sample were analyzed by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide and processed for western-blotting as described by (Vanoverberghe et al., 2004) using Rabbit IKCa1 (Sigma, 1/200e), mouse REST (abcam, 1/1000e), NSE (DAKO, 1/250e), CgA (Euromedex, 1/250e), TRPV6 (Alomone, 1/500e) and β -actin (Sigma, 1/10000e) polyclonal antibodies. For the antibodies used for the first time in our studies (anti-IKCa1 from Sigma and anti-REST from abcam), we performed some control experiments to check their specificity. To control the specificity of anti-IKCa1 from Sigma, western-blotting experiments were performed on 10 μ g of the total protein extracts from HEK-293 cell lines stably transfected either by empty vector (HEK-Neo) or bearing the IKCa1 coding cDNA (HEK-IKCa1). In these experiments the anti-IKCa1 antibody revealed a band of about 52 ± 2 kDa only in proteins extracts from HEK-IKCa1 cells (Fig. 1D). The presence of REST protein was assayed by using a custom mouse polyclonal anti-human REST antibody raised against the 1-100 N-terminal amino acids. The specificity of the anti-human REST antibody was checked by Western blot of recombinant REST protein exonously expressed in HEK-293 or by co-transfection of these cells by recombinant REST vector and ShREST vector to down-regulate the REST expression (Fig. 4C).

Cell Proliferation and apoptosis assays.

Cell growth and apoptosis assays were performed as previously described by (Vanoverberghe et al., 2003). Cells were incubated for 4 days in a medium containing the solvent (DMSO) either alone (control) or 1-EBIO (200 μ M) or cAMP/IBMX (1mM/100 μ M). In studies aimed to determine the effects of IKCa1 knock-down on the cell proliferation, cells were transfected with either non-targetting siRNA (siCTL) or with siRNA targeting IKCa1 (siIKCa1) as described above and incubated for 3-4 days. The commercial assay kit, consisting of MTS (inner salt) and PMS (an electron coupling reagent), was then used to estimate cell growth. One-hundred percent reflected the number of viable cells after incubation in normal medium without drugs for 4 days.

[Ca²⁺]_i measurements

PC-3 and LNCaP cells were grown on glass coverslips for Ca²⁺ imaging experiments. (Ca²⁺)_i was measured using fura-2-loaded cells, as previously described (Gackiere et al., 2006). Cells were loaded with 2 μ M fura 2-AM (fura-2 acetoxymethyl ester) (Calbiochem, Meudon, France) in HBSS solution (Hank's Balanced Salt solution) containing (in mM): 142 NaCl, 5.6 KCl, 1

MgCl₂, 2 CaCl₂, 0.34 Na₂HPO₄, 0.44 KH₂PO₄, 4.2 NaHCO₃, 10 HEPES, and 5.6 glucose, at room temperature for 45 min. All recordings were carried out at room temperature. The cells were continuously perfused with the HBSS solution and chemicals were added *via* the perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1 ml/min and chamber volume was 500 µl.

Electrophysiological Recordings

Patch-clamp recordings were performed in the whole cell configuration (Hamill et al., 1981) using a RK-300 patch-clamp amplifier (Biologic, Grenoble, France). The patch-clamp amplifier was driven by Pulse 8.30 software (HEKA Elektronik, Lambrecht, Germany). Membrane currents were digitized at 20 kHz using a ITC16 computer interface (Instrutech Corp., Long Island, NY, low-pass filtered at 3 kHz and stored on-line on the hard-drive of the computer. Electrodes were pulled on a PIP5 puller (HEKA, Germany) in two stages from borosilicate glass capillaries (PG52151, World Precision Instruments, Aston, UK) to a tip diameter giving a pipette resistance of 5 MΩ. For each cell, the membrane potential was clamped initially at -80 mV and the passive membrane components (membrane resistance and capacitance) were determined immediately after the establishment of the whole cell configuration. A protocol to assess the current/voltage (I/V) relationship was then initiated. For such experiments, a p/n protocol (8 negative prepulses at 1/10th of the pulse magnitude) was used to correct for the background leak and capacitive membrane currents.

Bath medium used current-clamp experiments consisted in Hank's balanced salt solution containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, and 5.6 mM glucose. For measuring calcium currents in patch-clamp experiments, the external buffer contained 142 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose, 10 mM TEA-Cl (tetra-ethyl ammonium chloride), and 10 mM CaCl₂ or BaCl₂. All the data shown in this study were obtained with a bath medium containing 10 mM BaCl₂. The osmolarity and pH of external buffers were adjusted to 310 mOsm liter⁻¹ and 7.4, respectively.

For current-clamp experiments, the pipette solution contained 140 mM K-glutamate, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES. For voltage-dependent calcium current studies, recording pipettes were filled with a solution containing 140 mM n-methylglucamine, 110 mM L-glutamic acid, 30 mM HCl, 5 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA. Osmolarity and pH were adjusted to 290 mOsm liter⁻¹ and 7.2, respectively.

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean ± S.E. Statistical analysis was performed using unpaired *t* tests or ANOVA tests followed by either Dunnett (for multiple control *versus* test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons). Student's *t*-test was used for statistical comparison of the differences and *P* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

IKCa1 down-regulation induces Neuroendocrine Differentiation in human prostate cancer cells LNCaP.

In a previous study, we showed that the pharmacological IKCa1 blockade by TRAM-34 or siRNA-induced IKCa1 down-regulation reduced the cell proliferation in human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3 (Lallet-Daher et al., 2008). In these studies, we observed that the IKCa1 inhibition- or down-regulation-induced cell growth arrest was accompanied by the apparition of differentiated neuroendocrine cell morphology. In fact, NE differentiation in LNCaP cells stimulated with increased cAMP levels. Cells were incubated in presence of cAMP permeant analogs (dibutyl cAMP (Bt₂cAMP), 1 mM; A) and a phosphodiesterase inhibitor (isobutylmethylxanthine, IBMX, 100 µM, I)(AI) for a period of 24h to 4 days, and the morphology of the cells was examined by phase-contrast microscopy. AI-treated cells during 4 days (Fig1.A) developed rounded cell bodies and extended numerous fine branched processes with defined growth cones, whereas untreated LNCaP cells exhibited a fusiform morphology, tapering into branching processes typically less than one cell body in length (Bang et al., 1994; Mariot et al., 2002). The formation of neurite processes was already visible after 8 h of treatment, continued to develop, and persisted as long as the cells were maintained under differentiating conditions. In our experiments, treatments of the cells with either siIKCa1 or 1-EBIO, an IKCa1 activator known to down-regulate the channel expression in long term treatments of the cells (Keel H et al., 2003), induced a morphological changes in LNCaP cells similar to the AI-treated cells. These results suggest that the suppression of the IKCa1 in LNCaP cells induces NE differentiation and that the AI-induced NE differentiation is due to the down-regulation of the IKCa1 channel. To verify this hypothesis, RT-PCR and western blot experiments were performed for the IKCa1 expression on the total RNA and protein extract from LNCaP cells treated (AI) or not (CTL) by AI (Fig. 1E). In these experiments, These experiments included also the total RNA and protein extract from LNCaP cells treated by either siCTL or siIKCa1 or by the activator 1-EBIO (200 µM) were also included to check the down-

regulation of the IKCa1 by the specific siRNA or the activator of the channel in LNCaP cells. As shown in Fig. 1C, The AI, 1-EBIO and siIKCa1 treatments induced a down-regulation of the IKCa1 mRNA. In western blot experiments, to validate the specificity of the anti-IKCa1 antibody, western-blotting experiments were performed on 10 µg of the total protein extracts from HEK-293 cell lines stably transfected either by empty vector (HEK-Neo) or bearing the IKCa1 coding cDNA (HEK-IKCa1). In these experiments the anti-IKCa1 antibody revealed a band of about 52 ± 2 kDa only in proteins extracts from HEK-IKCa1 cells (Fig. 1D). As shown in Fig. 1E, the AI, 1-EBIO and siIKCa1 treatments induced a down-regulation of the IKCa1 also at the protein level. Taken together, these observations suggest that the suppression of the IKCa1 protein induces the NE differentiation of the LNCaP prostate cancer cells and that the AI-induced NE differentiation of the LNCaP cells is mediated by the down-regulation of the IKCa1 potassium channel.

In our previous work (Lallet-Daher et al., 2008), we showed that the IKCa1 was involved in Thapsigargin (TG)-induced capacitative calcium entry (CCE) in PCa cells LNCaP. As the expression of the IKCa1 is inhibited in NE differentiation, we studied the functional impact of the AI-induced NE differentiation on the CCE in LNCaP cells. As shown in calcium imaging experiments in Fig. 2A, the NED induction by AI inhibited the CCE by 40-50% compared to control cells (CTL). We also previously shown that the pharmacological activation of the IKCa1 channel by 1-EBIO (200 µM) induced a calcium entry mediated by TRPV6, a calcium channel of the TRP family. In the present work, as shown in Fig.2B, the 1-EBIO-induced calcium entry was inhibited by 75-90 % in AI-induced NE differentiated cells (AI) compared to the amplitude of the 1-EBIO response in control (CTL) cells. As shown in Fig. 2, the AI-induced NED by the treatments of the cells either by siIKCa1 or by AI or 1-EBIO did not modify the expression of the TRPV6 neither at the mRNA (Fig. 2C) nor at the protein level (Fig. 2D). These observations suggest that the decrease in TG-induced CCE and in the 1-EBIO-induced calcium rise in AI-induced NE-differentiated cells is due to the decrease or suppression of the IKCa1 potassium channel.

IKCa1 down-regulation induces the expression of the Neuroendocrine Differentiation molecular markers in human prostate cancer cells LNCaP.

As shown in Fig. 1, the suppression of the IKCa1 induced morphological differentiation of the PCa LNCaP cells similar to the effects of the AI treatments on these cells. We thus studied the expression of the NE differentiation markers in LNCaP cells treated by either siIKCa1 or 1-EBIO

compared to those of AI treatments on these cells. As shown in Fig. 3, the suppression of the IKCa1 potassium channel by siIKCa1 or by 1-EBIO (200 µM) treatments for 3 days induced the mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) expression of NSE (Neuron Specific Enolase) and CgA (Chromogranin A) in LNCaP cells. The apparition of these NED markers was accompanied by a concomitant expression of a voltage-dependent calcium channel (Cav3.2 or $\alpha 1$ -H) previously shown to be up-regulated in AI-induced NE differentiated LNCaP cells (Mariot et al., 2001). This up-regulation of the Cav3.2 calcium channel expression was confirmed at the functionality level (Fig.3C) as shown by electrophysiological techniques of patch-clamp in whole cell configuration in conditions where voltage-dependent potassium channels were eliminated (see "Experimental Procedures"). Voltage-dependent calcium currents were investigated in non-treated (CTL) cells or in cells treated either with siRNA control (siCTL) or by siIKCa1 or by 1-EBIO (200 µM) for 3 days. Fig. 3C represents typical experiments performed on LNCaP cells. No significant voltage-dependent inward current was observed on neither control cells (CTL) nor on the cells treated by siCTL (20 nM). On the opposite, the cells treated with either siIKCa1 (20 nM) or 1-EBIO (200µM) for 3 days displayed an inward current activating at membrane potentials positive to -50 mV and peaking around -10 mV. The inward current reached its peak value 15 ms after the beginning of the voltage step to -10 mV and then exponentially decayed with a time constant of 20.3 ms. These observations show that the down-regulation of the IKCa1 induces the NED in LNCaP cells with the apparition of the NED markers. These data suggest that the IKCa1 play a central role in the destiny of the prostate cancer cells: the presence of the channel directs the cells to proliferation and the absence induces the NED of these cells. Taken together, these data also suggest that there is a link between the activation of the NED-inducing pathways and the suppression of the IKCa1 potassium channel expression

Involvement of REST transcription silencer in the induction of Neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells

The NED inducing agents like as the Bt₂cAMP and IBMX (AI) target the activation of PKA and expression of constitutively activated PKA catalytic subunit is sufficient to induce NE differentiation of LNCaP cells (Cox et al., 2000). It is possible that the activation of PKA pathways induces the down-regulation of the IKCa1 potassium channel via an up-regulation of a factor to favour the NED induction. One transcription factor implicated in regulating peripheral gene expression is the transcriptional repressor REST (also known as NRSF) (Chong et al., 1995 and Schoenherr and

Anderson, 1995). REST binds to a 21 bp consensus sequence known as repressor element 1 (RE1) and represses transcription. RE1 sequences have been identified in ~1800 genes (Bruce et al., 2004). One of these genes is *KCNN4*, the gene encoding IKCa1. This observation led us to explore the involvement of REST in the PKA pathways to induce NED and in the NE-induced down-regulation of the IKCa1 potassium channel in LNCaP cells. RT-PCR experiments performed on the LNCaP cells following different cells treatments (Fig. 4) showed that the AI-induced differentiation was accompanied by the mRNA expression of the NSE, a NED marker and the voltage-activated calcium channel Cav3.2 with a concomitant up-regulation of the REST mRNA, suggesting a role for REST transcription silencer in the NED. In addition, when the cells were treated by an inhibitor of PKA (H-89, 10 μ M) in the presence or absence of differentiating agents (AI), the expression of REST was suppressed accompanied by the inhibition of the NSE and Cav3.2 expression. Taken together, these results suggest that the differentiating agents (AI) targeting PKA pathways induce the expression of the REST silencer which is known to down-regulate the IKCa1 the absence of which induces NE differentiation of the LNCaP cells.

The involvement of IKCa1 and REST transcription silencer in the Neuroendocrine differentiation of the LNCaP cells.

In order to study the correlation between REST and IKCa1 expression in neuroendocrine differentiation of the LNCaP cells, a series of experiments were performed. First, the LNCaP cells were transfected by either GFP vector or IKCa1 expression vector. Then the cells were incubated in medium alone (CTL) or by AI or by AI and the inhibitor of the IKCa1 potassium channel (TRAM-34, 10 μ M) for 3 days where the cells were examined for morphological changes by phase-contrast microscopy (Fig. 5A) and for the expression of the NED markers in LNCaP cells (Cav3.2 calcium channel), REST transcription silencer and IKCa1 at the mRNA level by RT-PCR (Fig. 5B) and at the protein level (Fig. 5D). The REST antibody was validated by the western blot analysis performed on the proteins extracted from HEK293 cells transfected either by the REST expression vector (pCDNA3-REST) or by both pCDNA3-REST and an expression vector allowing the generation of the siRNA targeting REST mRNA (ShREST). The REST protein was detected at the expected size in REST-transfected cells and was down-regulated in the HEK293 cells transfected also by ShREST (Fig. 5C). These results validate also the use of ShREST vector to down-regulate the expression of REST.

As shown in Fig. 5A, when the cells were transfected by IKCa1, where the channel is

constitutively expressed in LNCaP cells, the AI treatments did not induce NED whereas in GFP-transfected cells, the AI induced the morphological differentiation of these cells. When the IKCa1 transfected cells were treated by TRAM-34 (10 μ M) in the presence of AI, the morphological differentiation appeared. These results suggest that the presence of the IKCa1 potassium channel and its functionality prevents the NED in LNCaP cells. In the other hand, When the LNCaP cells were transfected by GFP alone, all differentiating treatments (AI, AI+TRAM-34) and another differentiating condition (incubation of the cells in steroid-depleted medium, -ST), induced the up-regulation of REST and down-regulation of the IKCa1 at the mRNA level (Fig. 5B) and at the protein level (Fig. 5D) and the concomitant expression of Cav3.2. In contrast, in IKCa1-transfected LNCaP cells, AI failed to induce the up-regulation of the REST and Cav3.2 but in the same conditions, the inhibition of the IKCa1 channel induces molecular differentiation of the cells where REST and Cav3.2 are up-regulated. These observations confirm the IKCa1 down-regulation in NED and show that the suppression of IKCa1 is responsible for the induction of the NED and that this IKCa1 suppression in NED might be mediated by REST which is up-regulated in NED.

The overexpression of REST transcription silencer induces the down-regulation of IKCa1 and the Neuroendocrine differentiation of the LNCaP cells.

To confirm that the IKCa1 suppression in NED is mediated by REST, the LNCaP were transfected by either GFP vector or REST expression vector or by an expression vector allowing the generation of the siRNA targeting REST mRNA (ShREST). Then the cells were incubated in medium alone (CTL) or by AI or by AI and the inhibitor of the IKCa1 potassium channel (TRAM-34, 10 μ M) for 3 days where the cells were examined for morphological changes by phase-contrast microscopy (Fig. 6A) and for the expression of the NED markers in LNCaP cells (Cav3.2 calcium channel), REST transcription silencer and IKCa1 at the mRNA level by RT-PCR (Fig. 6B) and at the protein level (Fig. 6C).

In these experiments, the REST-transfected LNCaP cells appeared to be morphologically Neuroendocrine differentiated and the treatments of these cells by AI or AI+TRAM-34 did not changed the REST-induced NE differentiated phenotype of the cells. These morphologic modifications of the REST-transfected cells are to correlated by the down-regulation of the IKCa1 and the up-regulation of the Cav3.2 calcium channel in these cells. These observations suggest that in NED, the up-regulation of REST is responsible for the down-regulation of the IKCa1

and the apparition of the Neuroendocrine-differentiated morphology of the cells. These results are confirmed by the transfection of the cells by ShREST allowing to down-regulate the REST in LNCaP cells. In ShREST-transfected cells, AI treatments failed to induce NED of the cells (Fig. 6A), but in these cells AI+TRAM is able to induce the NED. As shown in Fig. 6B and 6C, in ShREST-transfected cells, the IKCa1 is up-regulated and this overexpression of the IKCa1 prevents the NED and the apparition of NED marker Cav3.2. When these cells are treated by AI+TRAM-34 (to inhibit the overexpressed IKCa1), the cells are able to NE differentiate (Fig. 6A) and express the NED marker Cav3.2 (Fig. 6B).

To confirm the functionality of the IKCa1 potassium channel to its expression in GFP-, REST- and ShREST-transfected LNCaP cells, calcium imaging experiments were performed using 1-EBIO, the activator of the IKCa1 channel we previously showed to induce a calcium increase in LNCaP cells. As shown, in Fig. 7, 1-EBIO (200 μ M) increased a calcium increase in non-transfected (NT) and GFP-transfected cells, a calcium response which is reduced when the cells are NE differentiated by AI treatments for 3 days. This calcium response to 1-EBIO was suppressed by the constitutively REST expression of the LNCaP cells by cell transfection inducing the down-regulation of the IKCa1 protein (Fig. 7C). When the cells were transfected by ShREST expression vector, the AI treatments failed to induce the reduction of the 1-EBIO-induced calcium response (Fig. 7D) confirming the absence of the AI-induced IKCa1 expression when REST is down-regulated in LNCaP cells (Fig. 6C).

The presence of IKCa1 is sufficient to prevent the Neuroendocrine differentiation

To confirm that the effects of the REST transcription silencer in induction of the NED is mediated by the suppression of the IKCa1 potassium channel, LNCaP cells were transfected by either GFP vector or by both IKCa1 and REST expression vectors and then the morphological and molecular NED were examined in control (CTL) and AI-treated conditions. In GFP transfected cells, as previously shown in the present work, the AI treatments induced the NED phenotype in the cells accompanied by the up-regulation of REST (Fig. 8B), down-regulation of the IKCa1 and the up-regulation of the NED marker NSE (Fig. 8B). As shown in Fig. 6A, the constitutively expression of the REST induced spontaneous NED in LNCaP cells. In the present experiments, when both IKCa1 and REST were constitutively expressed in LNCaP cells, the spontaneous NED observed in REST expressing LNCaP cells was suppressed and in addition, AI treatments failed to induce NED in

these cells. These data confirm the fact that the effects of REST in NED are mediated by the suppression of the IKCa1. These observations are also confirmed by the fact that when the constitutively IKCa1- and REST-expressing cells were treated by AI+TRAM-34, the cells showed the classical NED phenotype (Fig 8A). Taken together, the data presented here show that the NED is accompanied by the suppression of the IKCa1 expression by REST transcription silencer and that the IKCa1 play a central role for the destiny (proliferation or differentiation) of the LNCaP prostate cancer cells.

DISCUSSION

Here, we provide evidence that the transcriptional repressor REST through the modulation of the IKCa1 expression plays a major role in regulating prostate cancer LNCaP cell phenotype and propose REST acts as a switch controlling the Neuroendocrine differentiation. We show REST serves to repress IK_{Ca1} expression in quiescent, resting, prostate cancer cells and that a decrease in REST serves to enable expression of IK_{Ca1}, which facilitates proliferation. There are several critical observations: the gene encoding IK_{Ca1} (*KCNN4*) contains REST binding sites that bind REST as previously shown by Cheong et al., (2005) in vascular smooth muscle cells in vivo; REST expression is inversely correlated with *KCNN4* expression; IK_{Ca1} function is detected in proliferating cells, but not in Neuroendocrine differentiated cells; and delivery of exogenous REST to prostate cancer cells suppresses IK_{Ca1} expression and function, whereas delivery of ShREST increases it. Our studies show that REST acts to repress *KCNN4*, therefore stimulatory cofactors must also be involved in regulating *KCNN4* levels. Although no other transcription factors controlling prostate cancer cells *KCNN4* expression have been identified, in lymphocytes the transcription factor AP1 is important for activating *KCNN4* expression (Ghanshani et al., 2000). AP1 activity has been identified in vascular smooth muscle (Rivard et al., 2000 and Sylvester et al., 1998) and linked with proliferation. Therefore, AP1 is a potential transcriptional activator that may operate in a coordinated manner with derepression as REST is removed. Whatever the identity of the transcriptional activators of *KCNN4*, REST plays a role in *KCNN4* regulation in prostate cancer cells because introduction of exogenous full-length or siRNA-induced down-regulation of REST affects native IK_{Ca1} expression. Two tandem RE1 sites within promoter of *KCNN4* was described but the significance of these tandem RE1 sites within promoters is not clear. Two other genes have been noted to contain two RE1 sites, *SNAP25* and *LICAM*, and like the *KCNN4* gene, the two RE1

sites within the *SNAP25* gene have different affinities (Bruce et al., 2004). The significance of two RE1 site in these genes is not known, but their presence is correlated with greater occupancy by REST compared to genes with only a single RE1 site (Bruce et al., 2004).

The original studies of REST led to the hypothesis that its role is to silence RE1 containing genes within nonneuronal cells. More recent data have, however, shown that the function of REST is more complex: in any particular cell type, REST is recruited to a subset of its target genes and REST can act to regulate expression levels rather than silence expression completely (Bruce et al., 2004 and Wood et al., 2003). REST has been shown to play a role in regulating glutamate receptor gene expression within neurones and atrial natriuretic peptide gene expression in cardiomyocytes (Calderone et al., 2003, Kuwahara et al., 2003, Ogawa et al., 2002 and Timmusk et al., 1999). Furthermore, changes in REST levels have been shown to be physiologically important in response to injury within the brain (Calderone et al., 2003) and in the normal development of the heart (Kuwahara et al., 2003). During mouse embryogenesis, REST is initially expressed at low levels but then at increasingly higher levels after birth, reaching adult levels after about 8 weeks (Kuwahara et al., 2003). If the function of REST is inhibited during this time, the heart continues to grow, but then becomes hypertrophic, and there is death due to heart failure (Kuwahara et al., 2003). Our data reveal another tissue where the function of REST is important in regulating cell phenotype. REST has no previous association with prostate cancer, but we reveal it is expressed and represses IKCa1 expression when the cells are induced for NED. Of particular interest is the marked reduced expression of REST when the cells are in the proliferative phenotype and increase in NED. Thus, the removal of REST repression is a critical switch enabling expression of the proproliferative potassium channel IKCa1. Our findings provide important insight into the molecular mechanisms linking potassium ion transport with Neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. Analysis of REST regulation of ion channel genes may have important implications for our conceptual understanding of how cells shift between functional phenotypes. It may also help in the development of therapeutic strategies aimed at preventing the evolution of the prostate cancers in humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. H. Lallet was supported by the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP).

REFERENCES

- Feldman BJ and Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1: 34–45
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS and Buttyan R (1995) Overexpression of Bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res.* 55: 4438–4445
- Fixemer T, Remberger K and Bonkhoff H (2002) Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 53: 118–123
- Bruce AW, I.J. Donaldson, I.C. Wood, S.A. Yerbury, M.I. Sadowski, M. Chapman, B. Gottgens and N.J. Buckley, Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004), pp. 10458–10463.
- Chong JA, J. Tapia-Ramirez, S. Kim, J.J. Toledo-Aral, Y. Zheng, M.C. Boutros, Y.M. Altshuler, M.A. Frohman, S.D. Kraner and G. Mandel, REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons, *Cell* 80 (1995), pp. 949–957.
- Koegel H., S. Kaesler, R. Burgstahler, S. Werner, and C. Alzheimer Unexpected Down-regulation of the hK1 Ca²⁺-activated K⁺ Channel by Its Opener 1-Ethyl-2-benzimidazolinone in HaCaT Keratinocytes. INVERSE EFFECTS ON CELL GROWTH AND PROLIFERATION. *J. Biol. Chem.*, January 24, 2003; 278(5): 3323 - 3330.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981) *Pflugers Arch.* 391, 85-100
- Lallet-Daher H, M. Roudbaraki, A. Bavencoffe, P. Mariot, F. Gackière, G. Bidaux, R. Urbain P. Gosset P. Delcourt, L. Fleurisse, C. Slomianny, E. Dewailly, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma and N. Prevarskaya (2008) Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IK_{Ca1}) regulate human prostate cancer cells proliferation *via* a close control of calcium entry *Oncogene* (accepted for publication)
- Schoenherr CJ and D.J. Anderson, The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes, *Science* 267 (1995), pp. 1360–1363.
- Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2004). Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 11(3), 321-30.
- Roudbaraki, M., Lorsignol, A., Langouche, L., Callewaert, G., Vankelecom, H., and Denef, C. (1999). Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute

a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* **140**(10), 4874-85.

Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.

Y.J. Bang, F. Pirnia and W.G. Fang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91** (1994), p. 5330.

Ghanshani S, H. Wulff, M.J. Miller, H. Rohm, A. Neben, G.A. Gutman, M.D. Cahalan and K.G. Chandy, Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences, *J. Biol. Chem.* **275** (2000), pp. 37137-37149.

Rivard A., N. Principe and V. Andres, Age-dependent increase in c-fos activity and cyclin A expression in vascular smooth muscle cells. A potential link between aging, smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis, *Cardiovasc. Res.* **45** (2000), pp. 1026-1034.

Sylvester A.M., D. Chen, K. Krasinski and V. Andres, Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Clin. Invest.* **101** (1998), pp. 940-948.

Bruce A.W., I.J. Donaldson, I.C. Wood, S.A. Yerbury, M.I. Sadowski, M. Chapman, B. Gottgens and N.J. Buckley, Genome-wide analysis of repressor element 1 silencing transcription factor/neuron-restrictive silencing factor (REST/NRSF) target genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004), pp. 10458-10463.

Calderone A, T. Jover, K.M. Noh, H. Tanaka, H. Yokota, Y. Lin, S.Y. Grooms, R. Regis, M.V. Bennett and R.S. Zukin, Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die, *J. Neurosci.* **23** (2003), pp. 2112-2121.

Chong J.A., J. Tapia-Ramirez, S. Kim, J.J. Toledo-Aral, Y. Zheng, M.C. Boutros, Y.M. Altshuler, M.A. Frohman, S.D. Kraner and G. Mandel, REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons, *Cell* **80** (1995), pp. 949-957.

Wood I.C., N.D. Belyaev, A.W. Bruce, C. Jones, M. Mistry, A. Roopra and N.J. Buckley, Interaction of the repressor element 1-silencing transcription factor (REST) with target genes, *J. Mol. Biol.* **334** (2003), pp. 863-874.

Kuwahara K., Y. Saito, M. Takano, Y. Arai, S. Yasuno, Y. Nakagawa, N. Takahashi, Y. Adachi, G. Takemura and M. Horie *et al.*, NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function, *EMBO J.* **22** (2003), pp. 6310-6321.

Ogawa E, Y. Saito, K. Kuwahara, M. Harada, Y. Miyamoto, I. Hamanaka, N. Kajiyama, N. Takahashi, T. Izumi and R. Kawakami *et al.*, Fibronectin signaling stimulates BNP gene

transcription by inhibiting neuron-restrictive silencer element-dependent repression, *Cardiovasc. Res.* **53** (2002), pp. 451-459.

Gackiere F., G. Bidaux, P. Delcourt, F. Van Coppenolle, M. Katsogiannou, E. Dewailly, A. Bavencoffe, M. T. Van Chuoi-Mariot, B. Mauroy, N. Prevarskaya, *et al.*

CaV3.2 T-type Calcium Channels Are Involved in Calcium-dependent Secretion of Neuroendocrine Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.*, April 11, 2008; 283(15): 10162 - 10173.

Timmusk T., K. Palm, U. Lendahl and M. Metsis, Brain-derived neurotrophic factor expression in vivo is under the control of neuron-restrictive silencer element, *J. Biol. Chem.* **274** (1999), pp. 1078-1084.

Cox M.E., Paul D. Deeble, Eric A. Bissonette, and Sarah J. Parsons' Activated 3',5'-Cyclic AMP-dependent Protein Kinase Is Sufficient to Induce Neuroendocrine-like Differentiation of the LNCaP Prostate Tumor Cell Line* *J Biol Chem*, 275 (2000):13812-13818.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. The down-regulation of IKCa1 potassium channel induces Neuroendocrine differentiation prostate cancer LNCaP cells.

LNCaP cells were treated with either control siRNA (siCTL) or siRNA targeting IKCa1 mRNA (siIKCa1) or the differentiating agents AI (1mM/100µM) or the IKCa1 activator (1-EBIO, 200 µM) for 3 days for the study of their growth rate (A) or for their morphological neuroendocrine differentiation by phase contrast microscopy examination (B) or for the expression of the IKCa1 mRNA by RT-PCR (C) and by western blot analysis (E) using anti-IKCa1 antibody as described in *materials and methods*. To control the specificity of anti-IKCa1 from Sigma, western-blotting experiments were performed on 10 µg of the total protein extracts from HEK-293 cell lines stably transfected either by empty vector (HEK-Neo) or bearing the IKCa1 coding cDNA (HEK-IKCa1) (D). In RT-PCR experiments, H₂O and samples without reverse transcriptase (not shown) were used as negative controls. Amplified fragments were resolved on 1.5% agarose-gel by electrophoresis and visualized by EtBr staining. M, 1Kb DNA ladder a molecular weight marker. The experiments were performed at least 3 times and representative figures are presented. **p* < 0.001 compared with their respective controls.

Figure 2. The down-regulation of IKCa1 is involved in the decrease in the capacitative calcium entry (CCE) in neuroendocrine differentiated LNCaP cells. Calcium imaging experiments showing the effects of cell membrane hyperpolarization by a direct activation of IKCa1 on the basal cytosolic free Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i)

in human prostate cancer cells. To study the impact of IK_{Ca1} activity on $[Ca^{2+}]_i$, 1-EBIO (200 μ M) was used to activate the channel in calcium imaging studies of LNCaP cells in control conditions (CTL) and in cells treated by AI for 3 days to induce Neuroendocrine differentiation (NED)(B). To study the amplitude of capacitative calcium entry (CCE) in control and in cells treated by AI for 3 days to induce Neuroendocrine differentiation (A), CCE was induced by depleting endoplasmic reticulum Ca^{2+} stores with 1 μ M thapsigargin in a Ca^{2+} -free solution. Then Ca^{2+} was readmitted while the cells were bathed in a solution containing. Each experiment was repeated at least 6 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative experiments are presented. A quantification of the capacitative calcium entry (CCE) for each experiment (A, B) is presented in insert (mean \pm SE, n = 45-50 cells). Periods of TG and 1-EBIO applications and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0Ca) to 2mM (2Ca) are marked by horizontal bars; *see text for details*.

To verify if the expression rate of TRPV6 which is associated with the IK_{Ca1} -induced calcium entry is modified in different NED-inducing conditions, the expression of the calcium channel was studied by RT-PCR (C) and by western blot analysis (D) on the extracts from the cells treated by either si IK_{Ca1} or by AI or 1-EBIO. M, 1Kb DNA ladder a molecular weight marker. The experiments were performed at least 3 times and representative figures are presented. * $p < 0.001$ compared with their respective controls.

Figure 3. IK_{Ca1} down-regulation induces the expression of the Neuroendocrine Differentiation molecular markers in human prostate cancer cells LNCaP. The expression of the NE differentiation markers was studied in LNCaP cells treated by either si IK_{Ca1} or 1-EBIO compared to those of AI treatments on these cells. Are presented the expression at the mRNA (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) level of NSE (Neuron Specific Enolase) and CgA (Chromogranin A) and of a voltage-dependent calcium channel (Cav3.2 or $\alpha 1$ -H) previously shown to be up-regulated in AI-induced NE differentiated LNCaP cells. The up-regulation of the Cav3.2 calcium channel expression was confirmed at the functionality level (Fig.3C) as shown by electrophysiological techniques of patch-clamp in whole cell configuration in conditions where voltage-dependent potassium channels were eliminated (see "materials and methods"). Voltage-dependent calcium currents were investigated in non-treated (CTL) cells or in cells treated either with siRNA control (siCTL) or by si IK_{Ca1} or by 1-EBIO (200 μ M) for 3 days. Typical experiments performed on LNCaP cells are presented.

Figure 4. Up-regulation of REST transcription silencer in the induction of Neuroendocrine differentiation in prostate cancer cells. The effects of the NED induction and the involvement of the PKA on the expression level of REST along with NSE and Cav3.2 calcium channel were studied by RT-PCR. The RT-PCR experiments were performed on the LNCaP cells following different cells treatments. To study the involvement of the PKA in NED induction, the inhibitor of PKA (H-89, 10 μ M) was used alone or along with the AI treatments. M, 1Kb DNA ladder a molecular weight marker. The experiments were performed at least 3 times and representative figures are presented.

Figure 5. Constitutively expression of IK_{Ca1} is sufficient to prevent NE differentiation of LNCaP cells. LNCaP cells were transfected with plasmids encoding GFP or IK_{Ca1} as described in materials and methods. The cells were maintained under normal culture conditions or in phenol red-free RPMI 1640 plus 10% charcoal stripped FCS steroid-depleted medium (-ST) or treated by AI or AI+TRAM-34 or for 3 days. For each condition, the morphology of cells was determined (A) from at least five random fields for the NE phenotype as defined by cells with neuritic processes at least 2 times the length of the or for the molecular expression changes (B) of *IKCa1*, *REST*, *Cav3.2*. The experiments were performed at least 3 times and representative figures are presented.

Figure 6. The overexpression of REST transcription silencer induces the down-regulation of IK_{Ca1} and the Neuroendocrine differentiation of the LNCaP cells. The LNCaP were transfected by either GFP vector or REST expression vector or by an expression vector allowing the generation of the siRNA targeting REST mRNA (ShREST). Then the cells were incubated in medium alone (CTL) or by AI or by AI and the inhibitor of the IK_{Ca1} potassium channel (TRAM-34, 10 μ M) for 3 days where the cells were examined for morphological changes by phase-contrast microscopy (A) and for the expression of the NED markers in LNCaP cells (Cav3.2 calcium channel), REST transcription silencer and IK_{Ca1} at the mRNA level by RT-PCR (B) and at the protein level (C).

Figure 7. Functionality of the IK_{Ca1} potassium channel in REST and ShREST transfected cells. To correlate the expression of IK_{Ca1} to its functionality in GFP-, REST- and ShREST-transfected LNCaP cells in control (CTL) and in 3-day AI-induced differentiated cells (AI), calcium imaging experiments (fura-2 calcium probe) were performed using 1-EBIO (200 μ M), the activator of the IK_{Ca1} channel we previously showed to induce a calcium increase in LNCaP cells. Each

experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures and transfections on a field of 25 to 40 cells and representative experiments are presented. Periods of 1-EBIO applications are marked by horizontal bars.

Figure 8. The presence of IKCa1 is sufficient to prevent the Neuroendocrine differentiation. To confirm that the effects of the REST transcription silencer in induction of the NED is mediated by the suppression of the IKCa1 potassium channel, LNCaP cells were transfected by either GFP vector or by both IKCa1 and REST expression vectors and then the morphological (A) and molecular NED (NSE, REST, Cav3.2) were examined in control (CTL) and AI-treated conditions by using RT-PCR technique (B) and western blot analysis (C). Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures and transfections and representative experiments are presented.

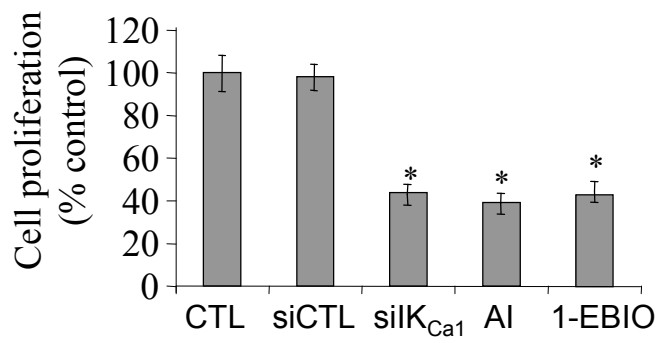
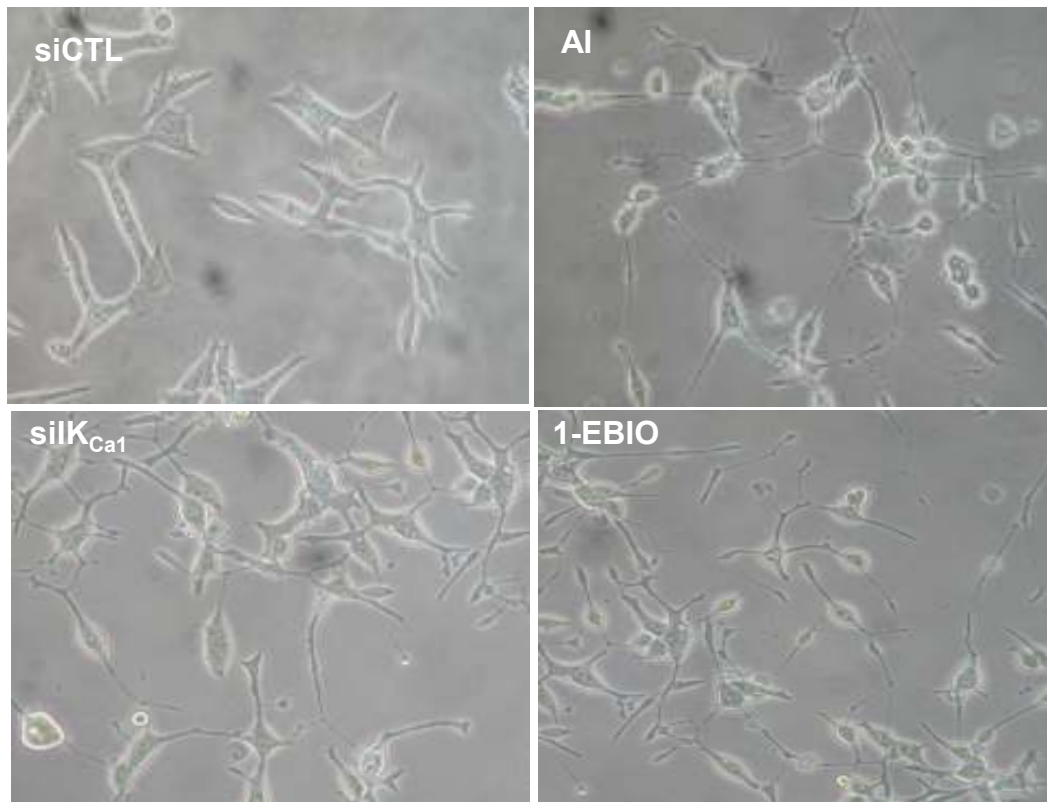
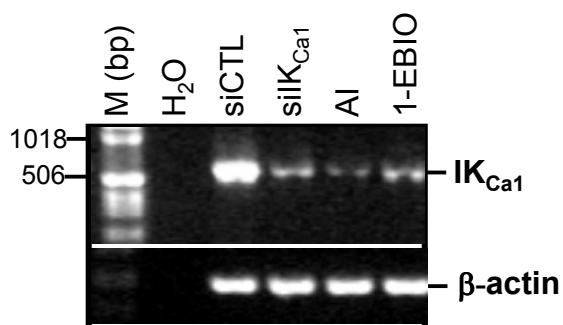
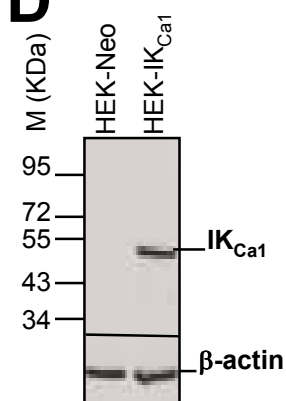
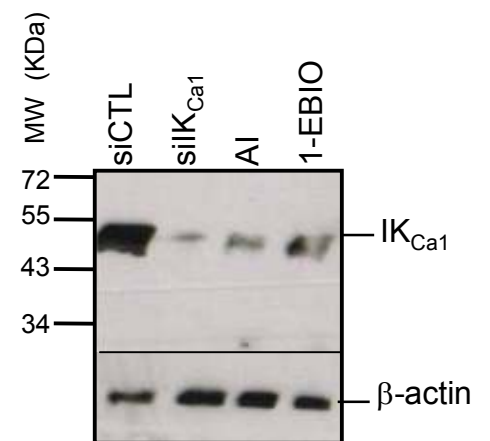
A**B****C****D****E**

Figure 1: Lallet-Daher et al., 2008

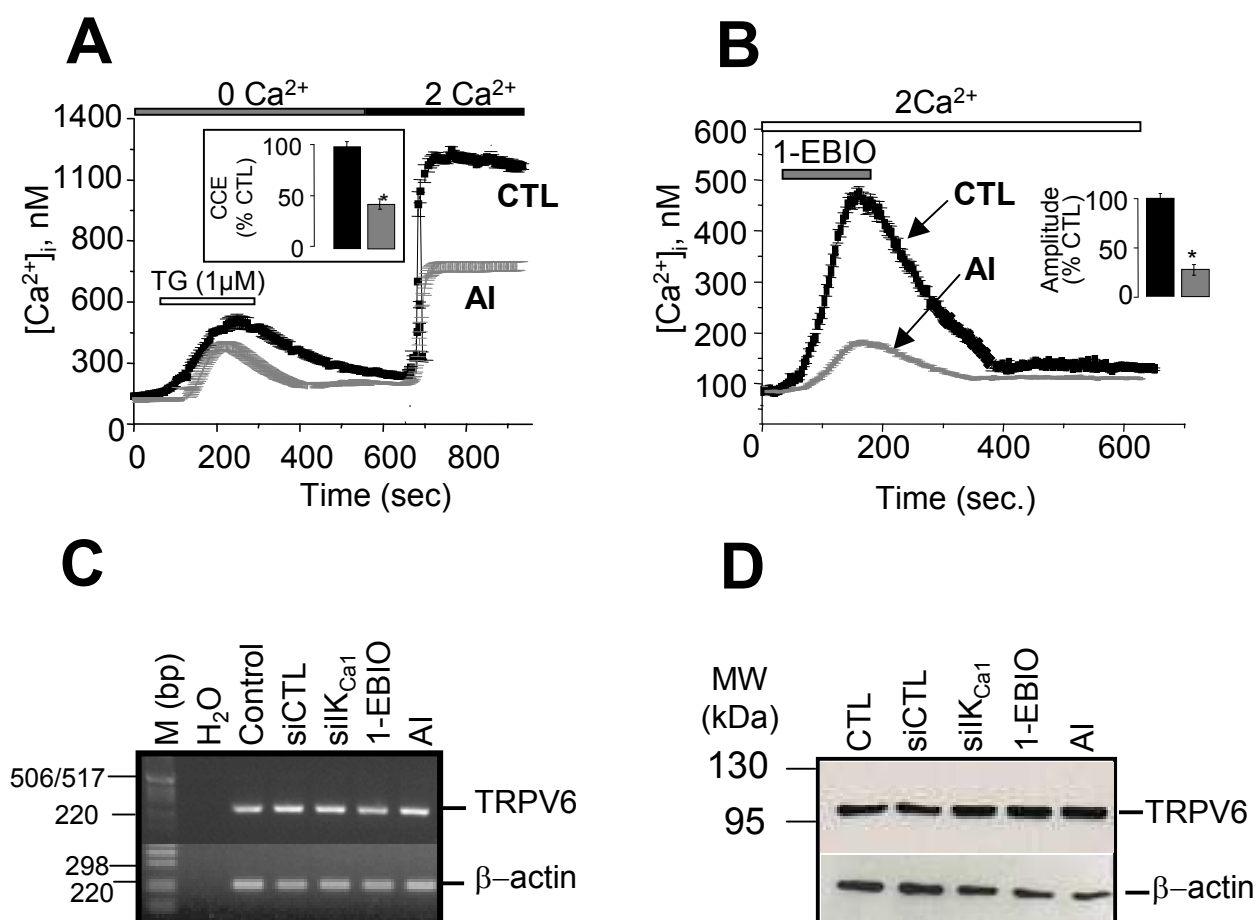


Figure 2: Lallet-Daher et al., 2008

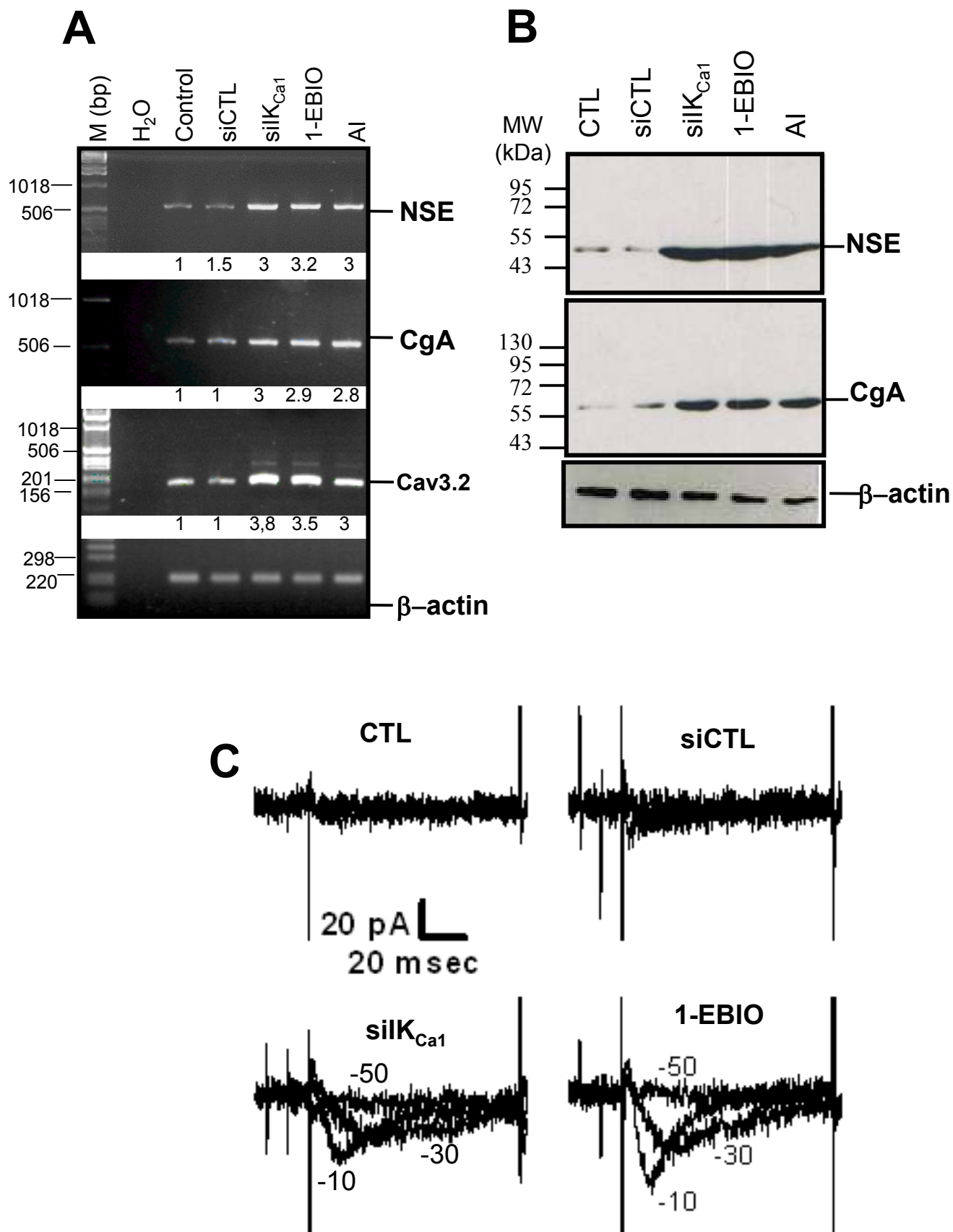


Figure 3: Lallet-Daher et al., 2008

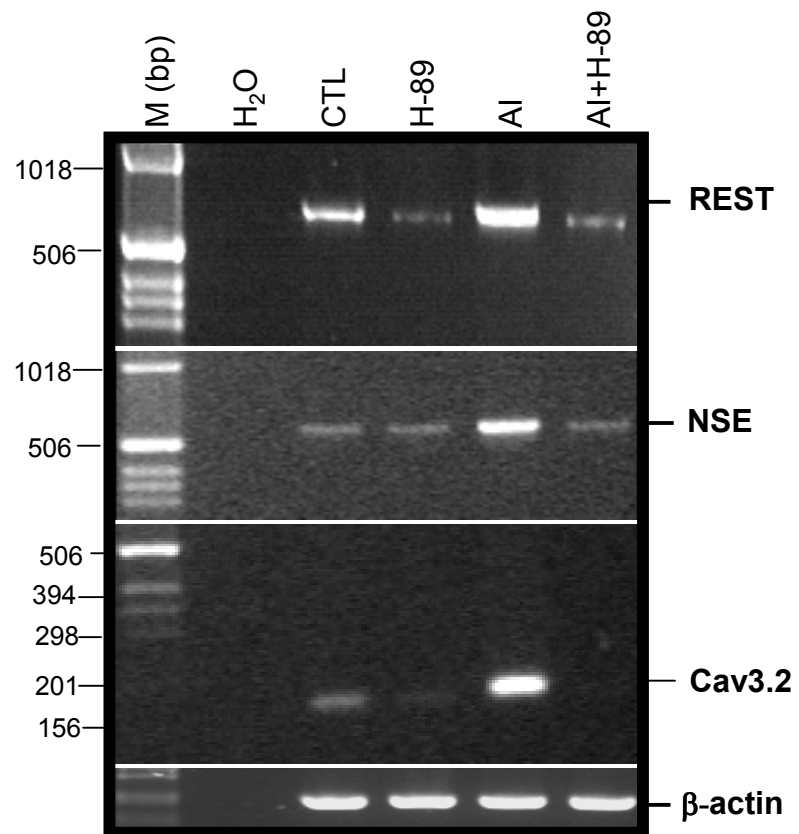


Figure 4: Lallet-Daher et al., 2008

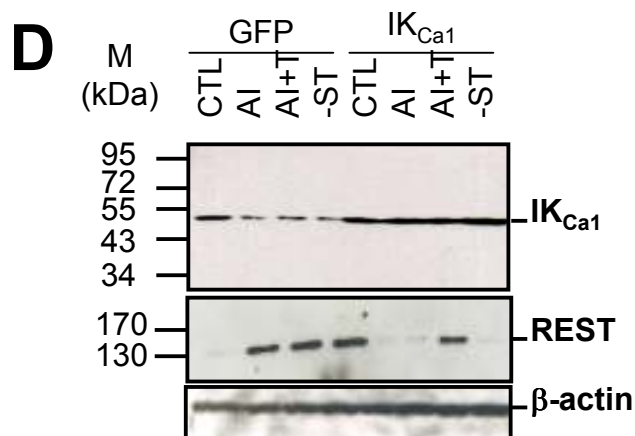
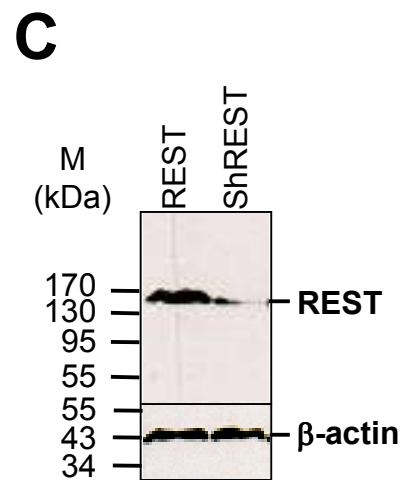
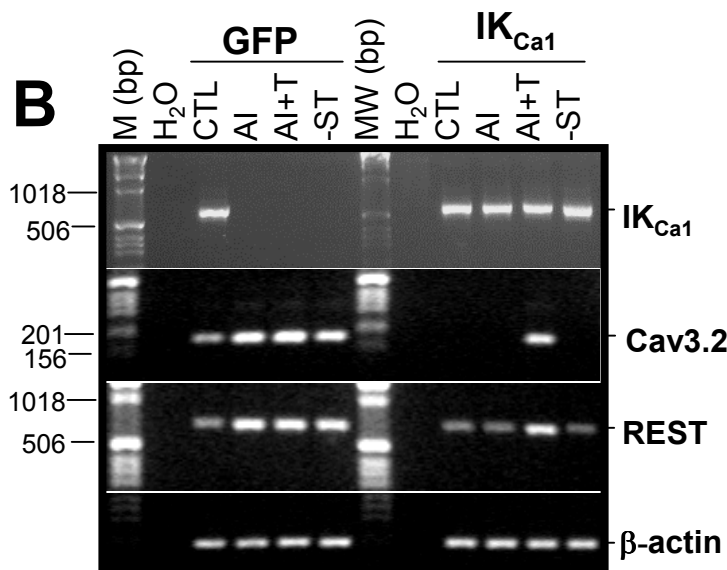
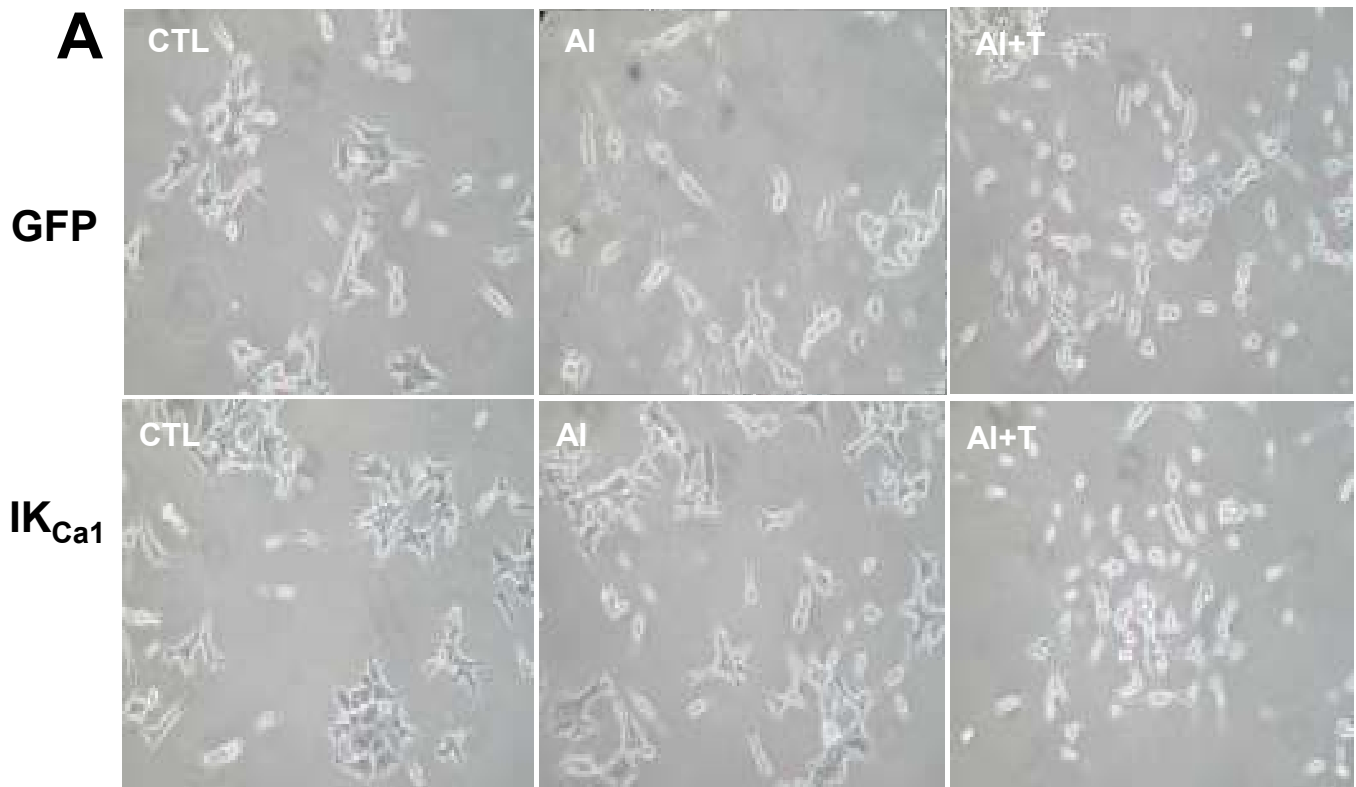


Figure 5: Lallet-Daher et al., 2008

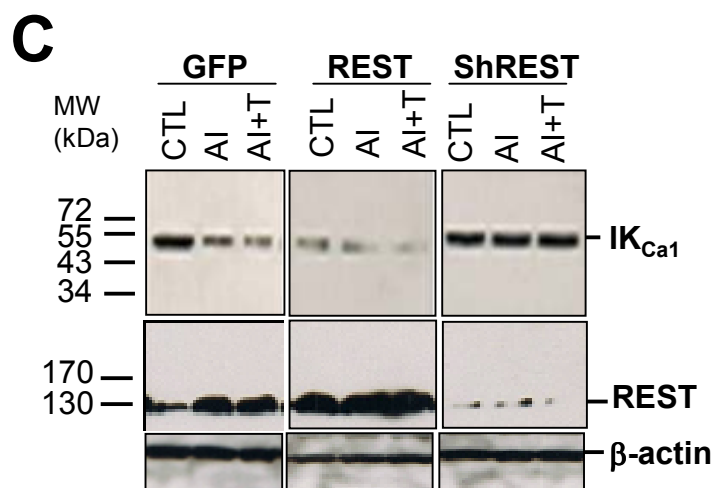
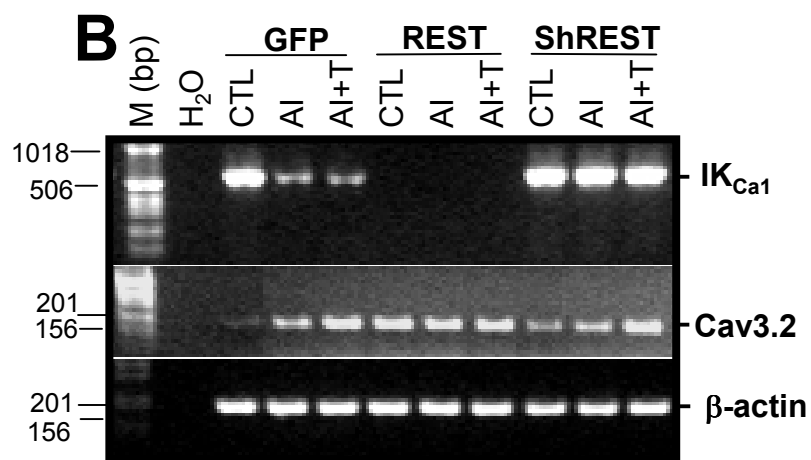
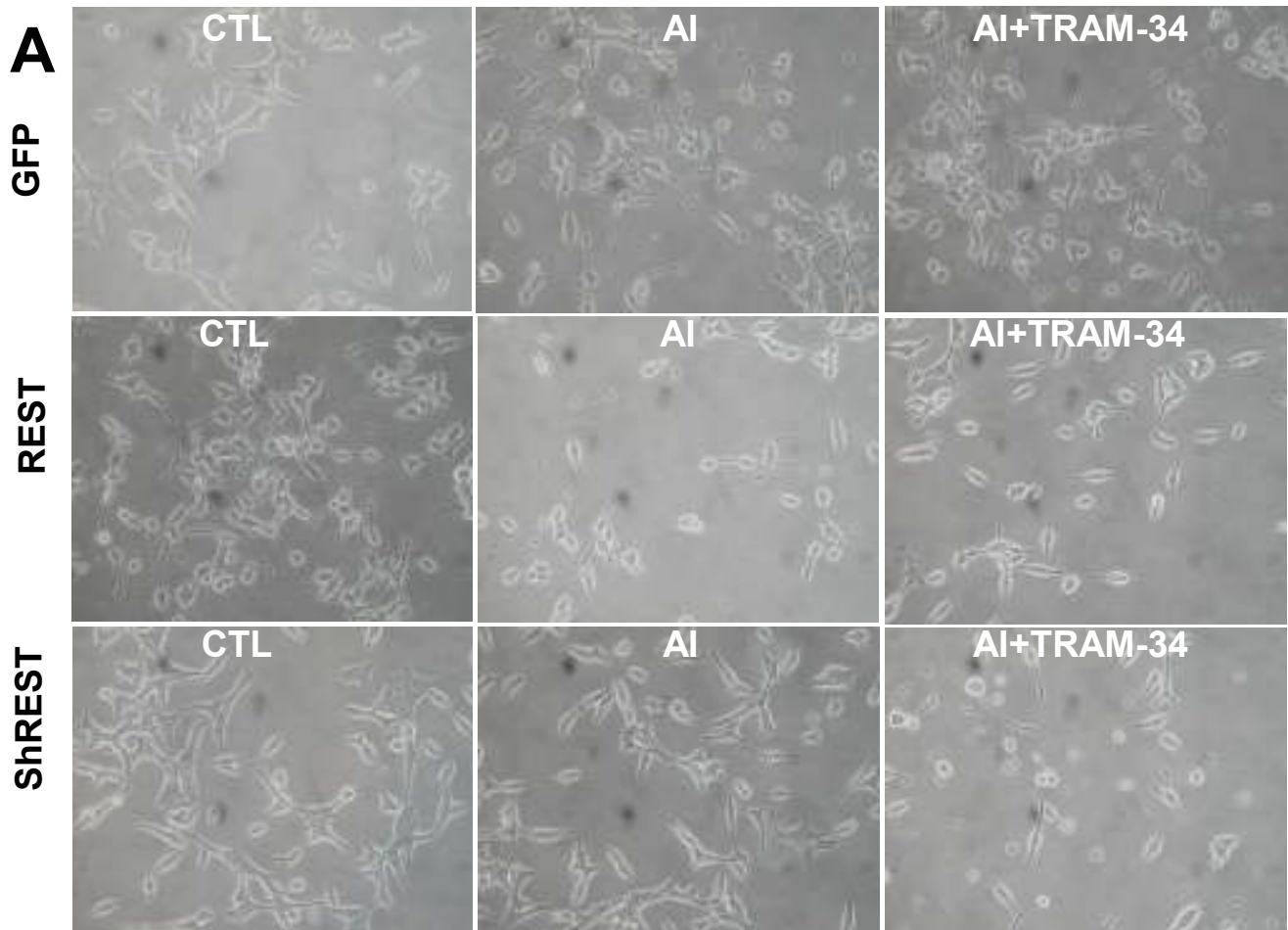


Figure 6: Lallet-Daher et al., 2008

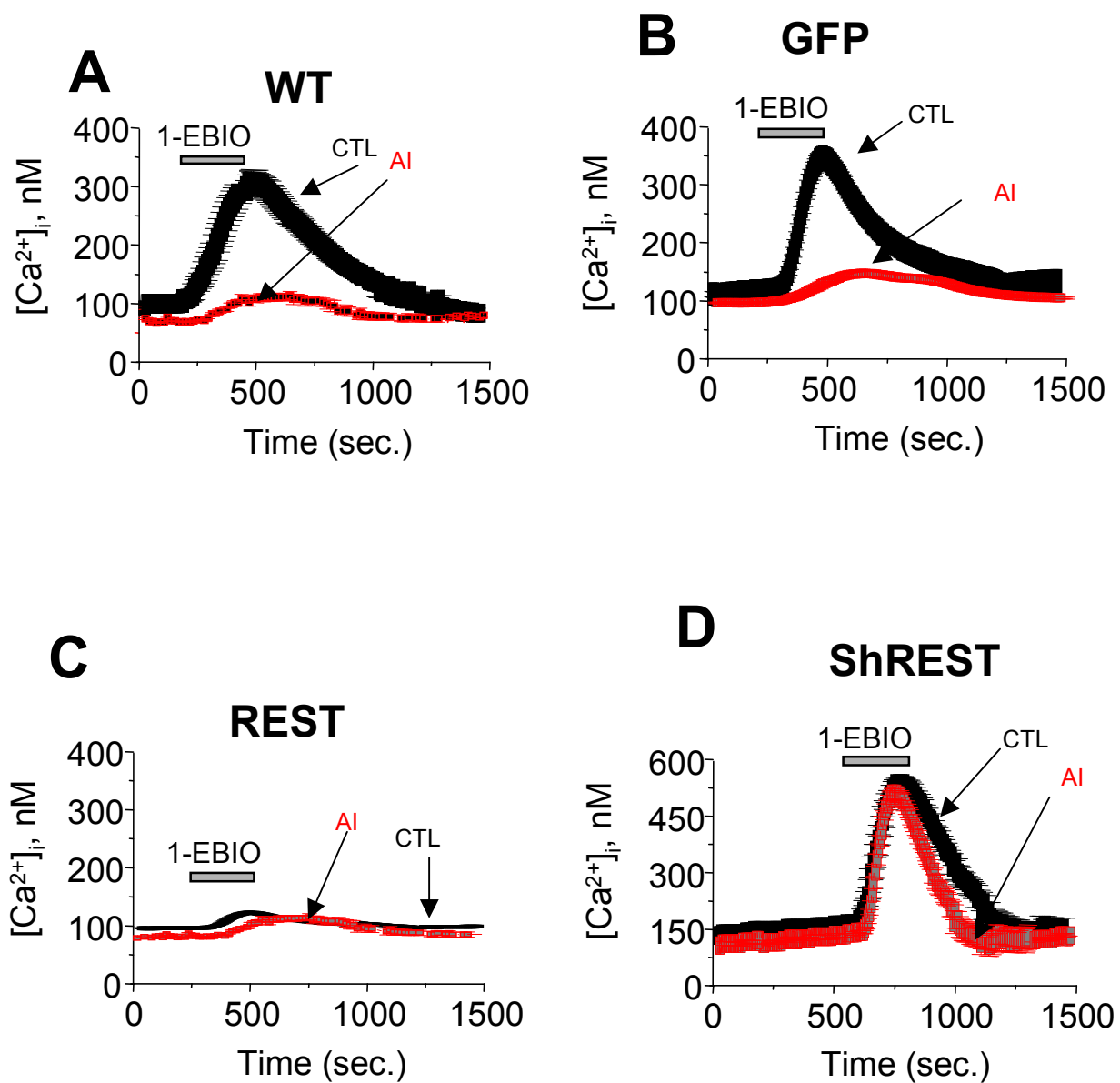


Figure 7: Lallet-Daher et al., 2008

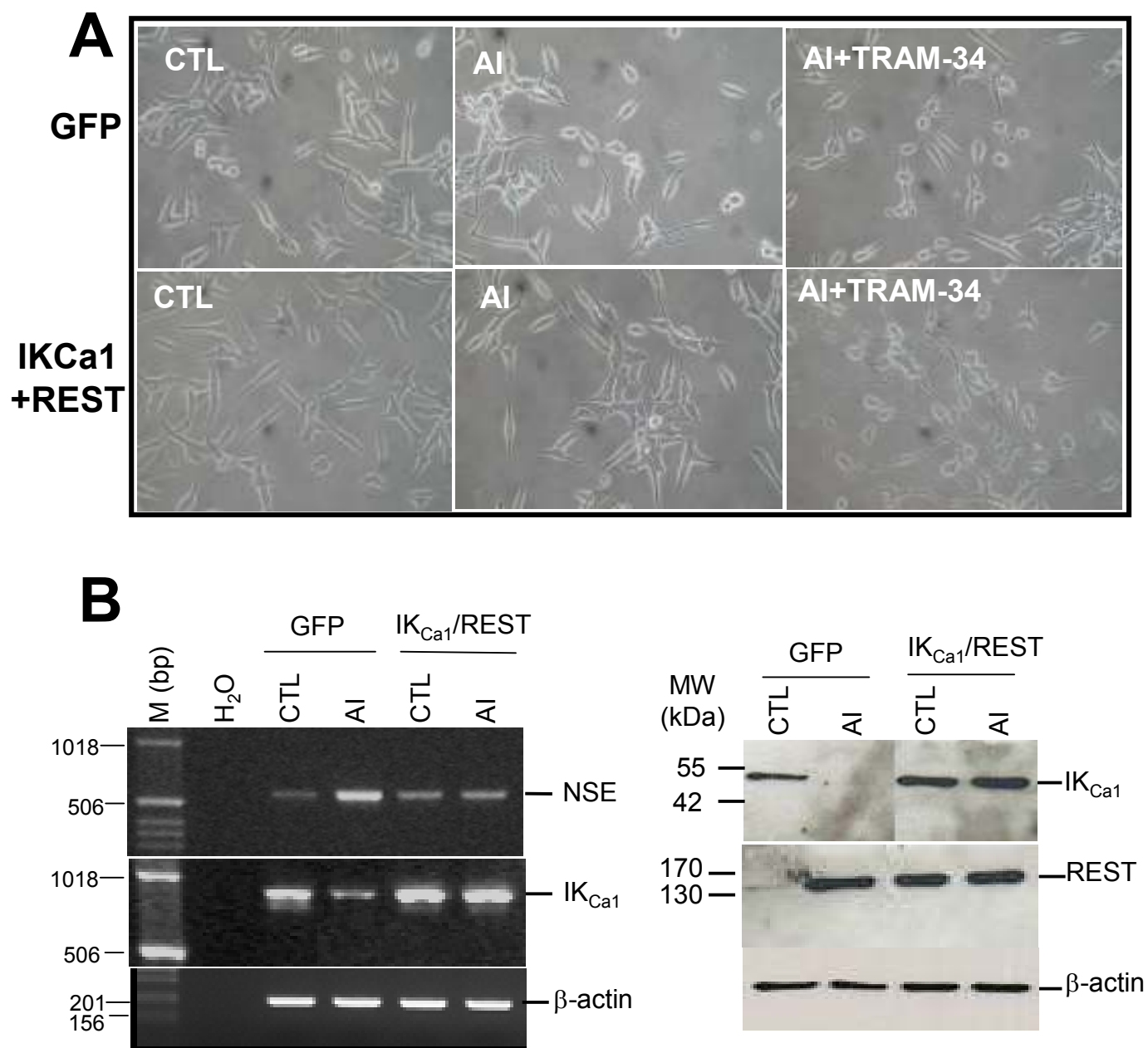


Figure 8: Lallet-Daher et al., 2008

Article 3

Involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in Endothelin-1-induced human prostate cancer cells proliferation.

H. Lallet-Daher, P. Delcourt, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma N. Prevarskaya and M. Roudbaraki

(En cours de soumission *Cell calcium*)

Comme nous l'avons précédemment décrit, nous avons montré que la présence du canal potassique IK_{Ca1} favorise la prolifération cellulaire et que la suppression de l'expression de ce canal induit un arrêt de la prolifération cellulaire et oriente les cellules vers la différenciation neuroendocrine. Nous avons également mis en évidence l'un des mécanismes par lequel les canaux potassiques de type IK_{Ca1} modulent la croissance cellulaire en contribuant au remplissage des stocks calciques intracellulaires. Pour la suite de notre projet de recherche, nous avons mené des études de l'intervention du canal IK_{Ca1} dans les voies de transduction des facteurs protéiques, tel que l'Endothéline 1 (ET-1), connues pour induire une prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

L'endothéline-1 (ET-1), un facteur vasoconstricteur libéré par les cellules endothéliales et qui module l'activité des cellules musculaires lisses vasculaires. Des études récentes ont montré que ce facteur pourrait être impliqué dans la croissance des cellules de nombreux tissus. En effet, il a été démontré que ce facteur est surexprimé dans le cancer intraprostatique et métastatique (Nelson et al., 1995) et est impliqué dans la progression du cancer de la prostate (Nelson J et al., 2003). L'ET-1 se fixe sur deux types de récepteurs, $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ et $\text{ET}_\text{B}\text{R}$. Selon ces auteurs, l'activation de l' $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ induit la voie de transduction conduisant à la survie cellulaire alors que la voie de signalisation de l' $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ active l'apoptose. Dans le cancer de la prostate, l'expression du récepteur de type $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ est prédominante comparée à celle de l' $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ (promoteur hyperméthylé) alors que dans les tissus prostatiques sains et hyperplasiques, l'expression de l' $\text{ET}_\text{B}\text{R}$ est prédominante (Nelson et al., 1996). **La voie de l'ET-1 est connue pour jouer un rôle physiologique important dans les processus de différenciation, de développement tissulaire et de prolifération cellulaire.** Des études récentes ont montré le rôle de cette voie dans la mitose, l'inhibition de l'apoptose, l'invasion des tumeurs, l'angiogenèse et le remodelage osseux (Nelson J et al., 2003). Ces données suggèrent que la voie de l'ET-1 participe à la croissance et à la progression de tumeurs telles que le cancer de la prostate (Nelson et al., 1995, 1996, 1997, Wang et al., 2006) où ET-1 est surexprimé mais aussi qu'elle favoriserait la métastase osseuse comme décrit dans le cas du cancer du sein (Wulfinf et al., 2003) et des métastases osseuses (Guisse et al., 2000. Yin et al., 2003).

Les voies de signalisation de l'ET-1 sont impliquées dans la croissance cellulaire en augmentant le taux de calcium intracellulaire (Sato et al., 1996). Il a été démontré que l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, suite à l'activation des récepteurs à l'ET-1 active la voie calcineurine/NFAT (Nuclear Factor of Activated T lymphocytes) conduisant à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Iwai-Kanai, and Hasegawa, .2004).

Malgré ces évidences de l'expression de l'ET-1 et de ses récepteurs dans le cancer, ses voies de transduction sont mal connues dans la prostate humaine. Nous avons étudié les voies de transduction de l'ET-1, ses effets sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques ainsi que l'implication du canal IK_{Ca1} dans les voies de transduction de cet agoniste.

Nous avons montré pour que l'ET-1 induit la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques et que ces effets de l'ET-1 sont médiés par l'activation des récepteurs de type A ($ET_A R$). Dans cette étude, l'utilisation de l'inhibiteur du canal IK_{Ca1} (TRAM-34) diminuait la prolifération induite par l'ET-1. Ceci nous a donc permis de mettre en évidence l'implication du canal potassique IK_{Ca1} dans les voies de transduction de l'ET-1 conduisant à la prolifération cellulaire. Par ailleurs, nous avons montré que la voie calcineurine/NFAT, une voie activée par une augmentation du calcium intracellulaire, est impliquée dans la prolifération cellulaire induite par l'ET-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques. Afin d'étudier les voies de transduction de l'ET-1 impliquant une augmentation du calcium libre dans les cellules cancéreuses prostatiques, nous avons réalisé de l'imagerie calcique utilisant la sonde Fura-2. Nous avons montré que l'ET-1 induit une augmentation du calcium intracellulaire en mobilisant du calcium à partir des stocks intracellulaires et en stimulant une entrée capacitive de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques. Dans ces études, nous avons montré que les fonctionnalités des canaux potassiques calcium-activés (IK_{Ca1} et BK_{Ca}) sont impliquées dans l'entrée capacitive de calcium induite par l'ET-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques.

La connaissance des voies de transduction de l'ET-1 conduisant à la prolifération cellulaire et l'implication du canal potassique IK_{Ca1} dans les effets de l'ET-1 permettra d'envisager le développement des thérapies ciblant le canal IK_{Ca1} dans le but de traiter le cancer de la prostate au même titre les antagonistes du récepteur à l'ET-1 actuellement en cours d'essais cliniques pour l'utilisation dans le traitement des cancers de la prostate humaine.

Involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in Endothelin-1-induced human prostate cancer cells proliferation.

H. Lallet-Daher¹, P. Delcourt¹, B. Mauroy², JL Bonnal², R. Skryma¹, N. Prevarskaia^{1†} and M. Roudbaraki^{1†}
INSERM U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Equipe labellisée par la Ligue contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, F-59650 France.

¹ INSERM U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire

² Hôpital Saint-Philibert, Service Urologie, Lomme, F-59160, France

Running title: IK_{Ca1} and prostate cancer cell proliferation.

Abbreviations: IK_{Ca1} , Ca^{2+} -activated K^+ channel with intermediate conductance; endothelin-1 (ET-1), BK_{Ca} , Ca^{2+} -activated K^+ channel with big conductance; TRP channels, RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction, calcium release-activated Ca^{2+} channel; CCE, capacitative calcium entry.

Keywords: Potassium channels calcium-activated, IK_{Ca1} , endothelin-1, TRPV6, TRPC1, Orai-1, Prostate cancer, proliferation, Capacitative Calcium Entry.

ABSTRACT

The endothelin (ET) axis represents a novel and exciting target in the treatment of prostate cancer. ET-1, acting primarily through the endothelin receptors is integrally involved in multiple facets of prostate cancer progression, including cell growth, inhibition of apoptosis, angiogenesis, development and progression of bone metastases, and mediation of pain responses. It was previously reported that the ET-1 and endothelin receptors (ETRs) are expressed in prostate cancer cells and tissues and their expression are modulated during the evolution of prostate cancers. The purpose of the present work was to study the effects of ET-1 on proliferation of the human prostate cells LNCaP and PC-3 cells and the mechanisms by which activation of ETRs may allow the growth of these cancer cells. We show that the application of ET-1 caused a dose-dependent cell proliferation and an increase in intracellular free Ca^{2+} concentrations ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) via a mobilisation of the internal calcium stores and by a capacitative calcium entry (CCE) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells. These effects of ET-1 were completely abolished by BQ123, a selective ET_A R antagonist, but not by BQ788, a selective ET_B R antagonist. By use of siRNA targeting calcium-activated (IK_{Ca1} and BK_{Ca}) potassium channels and calcium channels of TRP family (TRPC1, TRPV6), we showed that these ion channels play an important role in calcium entry induced by ET-1 in PCa cells. These results suggest that these ion channels evidenced here may provide potential targets to block the ET axis in prostate cancers.

INTRODUCTION

Prostate cancer is characterized by low rates of cell proliferation coupled with diminished rates of cell death [1]. This pattern has made prostate cancer among the most resistant of malignancies to cytotoxic chemotherapeutic agents. Furthermore, the cornerstone of the management of advanced prostate cancer, androgen deprivation therapy, relies on the effective induction of apoptotic pathways. The emergence of androgen refractory prostate cancer, which leads to the lethal form of the disease, indicates that these cells likely have developed survival mechanisms to escape death.

The potent vasoconstrictor endothelin-1 (ET-1) has been implicated in prostate cancer disease progression. ET-1 expression occurs in almost every human prostate cancer tissue studied [2]. Interest in the role of ET-1 in cancer has grown over the last decade since studies [3], [4] reporting that several human tumor cell lines released ET-1 into the culture medium and that this stimulated proliferation of these cells. Recent studies in the understanding of prostate cancer biology have led to the development of drugs directed against precise molecular alterations in the prostate tumor cell. Endothelins (ETs) and their receptors have emerged as a potential target in prostate cancer. By activating of the ET_A R, ET-1 is involved in several aspects of prostate cancer progression, including proliferation, escape from apoptosis, invasion, and new bone formation, processes that are general to many malignancies. Moreover, patients with metastatic prostate cancer have elevated levels of plasma ET-1 compared with patients with organ-confined cancer as well as healthy individuals [5]. Biological activity of the ETs is mediated by the activation of two G protein-coupled

receptor subtypes, endothelin receptor A (ET_AR) and B (ET_BR) interacting with heterotrimeric G proteins. Each G-protein activates several downstream effectors [6] through the activation of phospholipase C (PLC) [7], which cleaves phosphatidylinositol bisphosphates generating two second messengers IP₃ and DAG leading to an increase in intracellular calcium levels and an activation of protein kinase C (PKC) and MAPK. These transduction pathways relay the mitogenic signal induced by ETs to the nucleus and promote cell proliferation. Activation of the endothelin receptor A (ET_A) can lead to induction of a survival pathway, whereas activation of the endothelin receptor B (ET_B) can result in clearance of circulating ET-1 as well as in stimulation of apoptosis. However, the response to the binding of either receptor remains cell type-dependent. In prostate cancer, the expression of the endothelin receptors, ET_A and ET_B, is altered compared to the pattern seen in normal prostatic tissues [2, 8]. The ET_B, predominant on benign prostatic epithelial cells, has a much lower expression on prostate cancer cells, owing, at least in part, to frequent hypermethylation of the ET_B gene, *EDNRB* [9]. Increased ET-1 expression, coupled with the increased ET_A expression that occurs with higher prostate tumor stage and grade, may produce a survival advantage for the prostate cancer cells. Specific ET_AR antagonists may therefore provide an improved approach in tumor treatment in which ET_AR blockade could result in tumor growth inhibition. Selective ET_AR antagonists may block the proliferative effects of exogenous ET-1 in both prostate cancer cells and osteoblasts by direct effects on the tumor cells. Indeed, in a phase III clinical trial of the ET_A antagonist, atrasentan, there was a significant delay in time to disease progression compared to placebo in men with hormone refractory disease [10]. Clinical trials of atrasentan has also demonstrated benefits in prostate cancer progression [11] and this drug is actually in phase 3 of clinical trial [12] decreased pain in men with prostate cancer.

A lot of studies has shown that the ET-1 induced elevation of intracellular free Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i, nM) plays an important role in ET-1 induced cell growth. This elevation of [Ca²⁺]_i caused by ET-1 is controlled by different pathways of transmembrane Ca²⁺ influx and intracellular Ca²⁺ release from inositol triphosphate receptor (IP₃R) and ryanodine receptor (RyR) gated Ca²⁺ stores. Increasing number of works show the implication of potassium and calcium channels in the ET-1 effect on the cell proliferation [13]. Recently, we have shown that the potassium channel calcium activated IK_{Ca1} controls prostate cancer cell proliferation by close regulation of passive calcium entry *via* TRPV6 (Lallet-Daher et al., 2008).

Even though little is known about the mechanism of ET-1-induced proliferation of tumor cells, early evidence for the role of the [Ca²⁺]_i in ET-1 induced proliferation of tumor cells was described by Shichiri et al. (1991) [4] in epithelial carcinoma cell lines derived from the human cervix (HeLa) and larynx (Hep-2). They found that ET-1 stimulated both Ca²⁺ signalling and proliferation of quiescent cells in a dose-dependent manner. Similar results were reported in ovarian cancer cells by Bagnato et al. (1995) [14]. The presence of ET-1 mRNA has been identified in human prostate cancer tissues and prostate cancer cell lines [15]. Actually, no information is available about the biological role of ET-1 and its receptors in prostate cancer.

In the present study, we show the mitogenic effect of ET-1 and ETRs in the human prostate cancer cells LNCaP and PC-3 and then explore the role of [Ca²⁺]_i and Ca²⁺-activated K⁺ channels and calcium channels TRP family, in this process. We also studied the ET-1 induced Ca²⁺ signalling in prostate cancer cells and determined the Ca²⁺ and potassium channels involved in this process.

MATERIELS AND METHODS

Reagents and chemicals

All chemicals were from Sigma (l'Isle d'Abeau, France), except for fura-2/AM purchased from France Biochem (Meudon, France).

Cell culture

LNCaP and PC-3 prostate cancer cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), were cultured as described by [16]. Primary prostate cancer epithelial cells (hPCE) were obtained and cultured at 37° C in a humidified incubator in an air/CO₂ (95/5%) atmosphere, as described in a previous work [17].

RNA extraction and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was isolated as described by Chomczynski et al [18]. After DNase I (Invitrogen) treatment to eliminate genomic DNA, RT-PCR experiments were carried out using a GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler (Applied Biostems), as previously described [19]. The PCR primers used in this study (Table 1) were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen. The expression of β-actin mRNA was used as an internal standard. PCRs were carried out using 1μl of the RT reaction the total RNA extracted from LNCaP and PC-3 cells. The conditions were as follows: 7 min at 95°C, then 40 cycles of 30 sec extension at 72°C each, 30 sec to 1 minute according

to the size of amplicons and a final 7 min extension step. Half of the PCR samples were analyzed by electrophoresis in a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 µg/ml) and viewed by Gel Doc 1000 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Gene	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	Expected RT-PCR Product Size (bp)	Accession number
IKCa1	ACTGGTTCGTGGCCA AGCTTACA	TCCAGCAGGCATC ADCAAGCCA	887	NM_002250
BKCa	AGTACAAAGTCTD CCAACCGAAGAG	TCAAAGCCCTCTT CTTCCACGTAC	1634	NM_002247
TRPV6	ATGDTATCCCGCTC ATCAATG	GTAGAAATDCCCT AGCTCTCG	255	NM_00112641
ETAR	GATCACAATGA CTTGGCGTA	CTCAAGCTGCC ATTCTTCT	328	NM_001957
ETBR	TGGTGGCTGTTT AGTTCT	TGCTACCCAA TACAGAGCA	351	NM_000115
Orai-1	CTTCTCGACCTC GTCTCTCT	CCTAAGGCCAA AGCATGGAA	406	NM_032790
TRPC1	AGCGCATGTGGCAA TCTTTGT	CGCTCCATGATTTA GAAAATGG	595	NM_003304
β-actin	CAGAGCAAGAGAGG CATCTT	GTTGAAGGTCTCA AAGATGATC	212	NM_001101

TABLE 1: List of primers used for RT-PCR studies

siRNA. Cell Transfection

LNCaP and PC-3 cells were transfected overnight with 20 nM siRNA control (siRNA number 1, Dharmacon Inc.) or raised against IK_{Ca1} (UGUAAAGCUUGGCCACGAAC, Accession number NM_002250), BK_{Ca} (GAGUCCUGGUGUCUUAGU), Orai-1 (UGAGCAACGUGCACAACUCU), TRPV6 (GACUCUCUAUGACCUCACA, Accession number NM_018646, nt 1041-1059) and TRPC1 (GGGUGACUUAUUAUGGUU) using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) in serum-free DMEM, according to the manufacturer's recommended protocol. The cells were then incubated in RPMI containing 10% SVF for three days to down-regulate the expression of these targets (mRNA) prior to use in experiments.

Cell growth assays

Cell growth assays were performed as previously described by [20]. Cells were incubated for 4 days in a medium containing the solvent (DMSO) either alone (control) or with ET-1, U73122, U73433 at various concentrations. Treatments by the siRNA targeting ions channels mRNA were performed as described above. The selective ET_AR antagonist BQ123 [21] and the selective ET_BR antagonist BQ788 [22] were used. Since previous studies described ET-1 as a co-mitogen requiring low concentrations of serum for maximal mitogenic activity (Simonson and Herman, 1993), assays for ET-1-induced mitogenic effects in this study were performed by incubating the LNCaP and PC-3 cells in culture medium containing 2% SVF. The commercial assay kit, consisting of MTS (inner salt) and PMS (an electron coupling reagent), was then used to estimate cell growth. One-hundred percent reflected the

number of viable cells after incubation in normal medium without drugs for 4 days.

Measurement of [Ca²⁺]_i

PC-3 and LNCaP cells were grown on glass coverslips for Ca²⁺ imaging experiments. (Ca²⁺)_i was measured using fura-2-loaded cells, as previously described [16]. Briefly, cells were loaded with 2 µM fura 2-AM (fura-2 acetoxymethyl ester) (Calbiochem, Meudon, France) in HBSS solution (Hank's Balanced Salt solution) containing (in mM): 142 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 0.34 Na₂HPO₄, 0.44 KH₂PO₄, 4.2 NaHCO₃, 10 HEPES, and 5.6 glucose, at room temperature for 45 min. All recordings were carried out at room temperature. The cells were continuously perfused with the HBSS solution and chemicals were added via the perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1ml/min and chamber volume was 500µl.

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean ± S.E. Statistical analysis were performed using unpaired *t* tests or ANOVA tests followed by either Dunnett (for multiple control *versus* test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons). Student's *t*-test was used for statistical comparison of the differences, and *P*<0.05 was considered significant.

RESULTS

Expression of ET_AR and ET_BR in human prostate cancer cells

The RT-PCR technique was used to study the mRNA expression of ET_AR and ET_BR in human PCa cell lines (LNCaP, PC-3) and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells from tissue specimens. The specific primers for ET_AR and ET_BR allowed to amplify the PCR products of the expected size for ET_AR (328 pb) (**Fig.1A**) and ET_BR (351 bp) (**Fig. 1B**) from the cDNA of all cell lines and hPCE cells (**Fig.1A and 1B**). The identity of the amplicons was verified by cloning and sequencing and corresponded to the cDNA of the human ortholog of these receptors.

Effects of ET-1 on human prostate cancer cells proliferation

The effects of ET-1 was studied on prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3 cells. At concentrations of 10⁻¹²-10⁻⁷ M, ET-1 induced significant and dose-dependent increases in cell number reaching the maximal effect at 10⁻⁷M for LNCaP (**Fig 1C**) and PC-3 (**Fig 1D**) cells. For the

time course, mitogenic effects of ET-1 (10^{-7} M) were observed after 3 days of culture respectively in LNCaP and PC-3 cells. To define the receptor-mediated action of ET-1 on the proliferation of LNCaP and PC-3 cells, highly selective ET_AR and ET_BR antagonists were used. Cell proliferation induced by ET-1 (10^{-7} M) was abolished by BQ123 at 10^{-6} M, a highly selective ET_AR antagonist, but not by BQ788, a highly selective ET_BR antagonist used at the same concentration (**Fig 1E and 1F**). Besides, ET-1 induced cell proliferation in LNCaP (**Fig.1G**) and PC-3 cells (**Fig. 1H**) was significantly reduced by the specific phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 used at 10^{-5} M, but not by its inactive analogue U73433. However the inhibition of the proliferation induced by U73122 is not completed suggesting the involvement of other transduction mechanism like as CD-38 pathway as described in smooth muscle cells [23].

The role of $[Ca^{2+}]_i$ in ET-1-induced proliferation of LNCaP and PC-3 cells

One of the way by which Ca^{2+} may act to affect cell proliferation is the activation of NFAT transcription factor. The well known calcium-sensitive phosphatase calcineurin is a CaM - Ca^{2+} -activated phosphatase, activated by an increase of $[Ca^{2+}]_i$. After activation, the phosphatase dephosphorylate the NFAT transcription factor and induces its translocation in the nucleus to activate the gene transcription. A number of activated-NFAT transcription factor are known to favour the cell proliferation by inducing the transcription of genes involved in cell growth. To explore the involvement of Ca^{2+} and the calcineurin/NFAT pathway in ET-1 induced prostate cancer cell proliferation, we used calcineurin inhibitor, FK506. When the prostate cancer cells were treated by FK506 (10 μ M), the cell proliferation induced by ET-1 was completely blocked (**Fig. 2A and 2B**). These results indicated that the increase in free cytosolic calcium concentration is implicated in the mitogenic effect of ET-1 on LNCaP and PC-3 cells.

We therefore studied the effects of ET-1 on free cytosolic calcium concentrations ($[Ca^{2+}]_i$) by calcium imaging in Fura-2-loaded cells. As shown in **Fig. 2**, ET-1 (100 nM) induced the $[Ca^{2+}]_i$ response typically consisted of a spike phase with an amplitude 350 nM for LNCaP and PC-3 cells. The ET-1 induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ was blocked by ET_AR-selective receptor antagonist BQ123 (1 μ M), but not by the ET_BR-selective receptor antagonist BQ788 (1 μ M) (**Fig. 2E and 2F**). These data indicate that the ET_AR expressed in the human prostate cancer cells are functional receptors, and are linked to the intracellular Ca^{2+} signaling pathway, probably

through the activation of the phosphoinositol/ Ca^{2+} pathway.

Origin of ET-1-induced calcium response in prostate cancer cells

To explore the origin of the calcium response induced by ET-1 in prostate cancer cells, following experiments were performed. As illustrated in **figure 3**, in the control conditions, application of ET-1 (10^{-7} M) in $0Ca^{2+}$ medium induced a calcium rise originating from the release from internal stores and the subsequent capacitative calcium entry (CCE) in $2Ca^{2+}$ medium in both LNCaP (**Fig. 3A**) and PC-3 cells (**Fig. 3B**). However the amplitude of the CCE is 3 times superior to the $[Ca^{2+}]$ rise observed following the application of ET-1 in $2Ca^{2+}$ shown in **Fig. 2C and 2D** for LNCaP and PC-3 cells. To clarify these discrepancies, we incubated the cells for 10 minutes in $0Ca^{2+}$ medium before challenging them to ET-1 (100 nM) in $2Ca^{2+}$. Interestingly, when the cells were placed before in medium without calcium ($0Ca^{2+}$) then replaced in calcium ($2Ca^{2+}$) and ET-1, we observed a calcium response with an amplitude similar to those obtained in the experiments shown in **Fig. 3A and Fig. 3B** for LNCaP and PC-3 cells respectively. These observations suggest that the incubation of the cells in calcium-depleted medium favours the recruitment of the plasma membrane calcium channels in the response to ET-1, probably by favouring the translocation of the calcium channels to the membrane.

Involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in ET-1-induced CCE

In a previous work (Lallet et al., 2008), we showed that the Ca^{2+} -activated K^+ channels are involved in the thapsigargin-induced CCE in prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. In the following works, we studied the involvement of calcium-activated K^+ channels (IK_{Ca1} and BK_{Ca}) in the CCE induced by ET-1. First by using RT-PCR technique, we confirmed the expression of these potassium channels in prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3) and in primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells from tissue specimens. Analysis of RT-PCR products revealed the amplification of a single fragment of the expected size for IK_{Ca1} (867 pb) and BK_{Ca} (1600 bp) from the cDNA of all cell lines and hPCE cells (**Fig.4A and 4B**). In order to assess the involvement of these channels in the CCE induced by ET-1 (100 nM), we used either the siRNA technology to down-regulate IK_{Ca1} and BK_{Ca} or the pharmacological tools to inhibit the IK_{Ca1} (TRAM-34, 10 μ M) or the BK_{Ca} (Paxillin, 1 μ M) potassium channels in LNCaP and PC-3 cells. The down-regulation of IK_{Ca1} and BK_{Ca} mRNA and

proteins are verified by RT-PCR and western blotting following the treatments of these cells by the specific siRNA used in the present study (data not shown). As shown in **Fig. 4C and 4D**, treatments of the cells with siIK_{Ca1} or siBK_{Ca} (20 nM for 72h) did not modify significantly the ET-1-induced calcium release from intracellular stores whereas the amplitude of the CCE was decreased by $30 \pm 4.5\%$ vs CTL (n=140) in LNCaP cells for siIK_{Ca1} (Fig. 4C) and by $60 \pm 6\%$ vs CTL (n=210) in PC-3 cells (Fig. 4D). Similar results were also obtained with siBK_{Ca}, the ET-1-induced calcium release from intracellular stores was not significantly modified whereas the amplitude of the CCE was decreased by $60 \pm 4.5\%$ vs CTL (n=110) in LNCaP (Fig. 4E) and by $50 \pm 6\%$ vs CTL (n=180) in PC-3 cells (Fig. 4F) after the treatments of the cells by siBK_{Ca}. These results suggest that IK_{Ca1} and BK_{Ca} channels regulate CCE induced by ET-1 in LNCaP and PC-3 cells. Next, the co-implication of IK_{Ca1} and BK_{Ca} channels in the ET-induced CCE was studied by using the pharmacological inhibitors, TRAM-34 (10 μ M) for IK_{Ca1} and paxillin (1 μ M) for BK_{Ca} channels. These experiments were performed on the cells treated either by siControl (siCTL) or siIK_{Ca1} or siBK_{Ca}. After siRNA treatments for one potassium channel type, the ET-1-induced calcium entry was elicited to evaluate the contribution of each potassium channel (IK_{Ca1} or BK_{Ca}) in ET-1-induced CCE. Then, the inhibitor of the other calcium-activated channel was applied on the remaining CCE to evaluate the contribution of the channel. These experiments were performed on the LNCaP (Fig.4C and 4D) and PC-3 (Fig.4E and 4F) cells and showed that both IK_{Ca1} and BK_{Ca} were involved in the ET-1-induced CCE in these cells. However, the percentage of the contribution of these potassium channels depended on the cell line: in the LNCaP cells, BK_{Ca} predominately participated in ET-induced CCE whereas in PC-3 cells, the IK_{Ca1} favoured the majority of the ET-induced calcium entry.

Identification of Ca²⁺ channels involved in ET-1-induced CCE

We have showed that IK_{Ca1} regulate the cell prostate cancer cell proliferation by association with a calcium channel of the TRP family, the TRPV6. In the other hand, we previously showed that both TRPV6 and TRPC1 could be implicated in CCE in human prostate cancer cell lines (Vanden Abeel et al., 2001 and 2003). Therefore, we studied the involvement of these TRP channels in ET-1-induced CCE. First, by RT-PCR, we confirmed by the RT-PCR experiments the expression of TRPC1, TRPV6 and of a recently cloned calcium channel, the Orai-1, known to contribute to the CCE, in human prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3) and primary cultured human

prostate cancer epithelial (PrEC) cells derived from tissue specimens. Analysis of RT-PCR products revealed the amplification of a single fragment of the expected size for TRPC1 (595bp), and TRPV6 (255bp) from the cDNA of all cell lines and hPCE cells (Fig.5A and 5B). In order to assess the involvement of these channels in the calcium entry induced by ET-1, we used the siRNA technology to down-regulate TRPC1 and/or TRPV6 expression in LNCaP and PC-3 cells. The use of these siRNA were already validated for their effects on the down-regulation of the TRPV6 and TRPC1 expression in prostate cancer cells whereas non-targeting siRNA (siCTL) had no effect on TRPV6 and TRPC1 expression (data not shown). As shown in **Fig. 5**, the siTRPV6 (20 nM) or the siTRPC1 (20 nM) alone for 3 days induced a moderate inhibition of the ET-induced CCE in LNCaP (Fig. 5C and 5E) and PC-3 (Fig. 5D and 5F) cells whereas the combined treatments for 3 days of the cells by both siTRPV6 and siTRPC1 (10 nM each) reduced by about 50% of the ET-induced CCE in LNCaP (Fig. 5G) (n=135) and PC-3 (Fig. 5H) cells (n=110). In these experiments, the ET-1-induced calcium release from intracellular stores was not significantly modified. The increased inhibition rate of the ET-induced CCE by the combined siTRPV6 and siTRPC1 can result from the homo- and heterotetrameric associations of these channels to form the CCE channels.

To identify the calcium channels involved in the remaining 50% of the CCE not inhibited by the siTRPV6 and siTRPC1 treatments of the cells, we addressed the participation of the orai1 calcium channel. Therefore, another channel is implicated in the CCE induced by ET-1 in LNCaP and PC-3 cells. Recently, Orai1 protein have been proposed to form SOCE channels [24]. The RT-PCR technique was used to check the mRNA expression of Orai-1 calcium channels in human prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC-3) and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells from tissue specimens. The use of the specific Orai-1 primers in RT-PCR analysis revealed the amplification of a single fragment of the expected size for Orai-1 (406 bp) from the cDNA of all cell lines and hPCE cells (**Fig.6A**). As shown in **Fig. 6C and 6C**, in siOrai-1 (20 nM for 72h)-treated cells, the ET-1-induced calcium release from intracellular stores was not significantly modified whereas the amplitude of the CCE was decreased by $50 \pm 3\%$ vs CTL (n=101) for LNCaP cells (Fig. 6B) whereas the amplitude of the CCE was not modified in PC-3 cells (Fig. 6C). These data suggest that 50% remaining of the CCE induced by ET-1 in LNCaP is Orai-1 whereas is not implicated in PC-3 cells. Taken together, these results suggest that in LNCaP cells, the TRPC1, TRPV6 and

Orai1 are involved in the ET-1-induced CCE whereas in PC-3 cells 50% of the ET-1 induced CCE is due to TRPC1 and TRPV6 and the remaining CCE in these cells is assured by an unknown calcium channel which needs further investigations.

DISCUSSION

The ET-1 axis has recently been identified as contributing to prostate cancer progression by inducing cell proliferation [25], apoptosis protection, angiogenesis, and invasiveness. ET-1 has been also shown to be mitogenic and to act as an autocrine or paracrine regulator of growth in many tumor cells [26, 27] and anti-apoptotic in prostate cancer (Nelson et al., 2005). The ET_AR is thus actually considered as a new therapeutic target in drug design for the prostate cancers treatments. Ion channels play important roles in several cellular functions such as excitability, contraction, cell cycle progression and metabolism and the link between ion channels and disease has received widespread attention in the last decade. The activation of the ET-1 axis was shown to involve the intracellular Ca²⁺ signalling pathways implicating calcium and potassium channels (4, 8, 32). However, the cell signalling involved in the ET-1 transduction pathways remain unknown in human prostate cancer cells.

In the present work, we studied the effects of ET-1 on proliferation of the human prostate cells LNCaP and PC-3 cells and the mechanisms by which activation of ETRs may allow the growth of these cancer cells. We show that the application of ET-1 caused a dose-dependent cell proliferation and an increase in intracellular free Ca²⁺ concentrations ([Ca²⁺]_i) via a mobilisation of the internal calcium stores and by a capacitative calcium entry (CCE) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells. These effects of ET-1 were completely abolished by BQ123, a selective ET_AR antagonist, but not by BQ788, a selective ET_BR antagonist. By use of siRNA targeting calcium-activated (IK_{Ca1} and BK_{Ca}) potassium channels and calcium channels of TRP family (TRPC1, TRPV6), we showed that these ion channels play an important role in calcium entry induced by ET-1 in PCa cells. These results suggest that these ions channels evidenced hier may provide potential targets to block the ET axis in prostate cancers.

Among the Ca²⁺-activated K⁺ channels family, BK_{Ca} and IK_{Ca1} may contribute to cell proliferation and migration. We have recently showed that the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IK_{Ca1}) is implicated in prostate cancer cell proliferation. Moreover, a recent study has shown that the maxi-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (BK_{Ca} channels) may play an important role in the progression of human cancer [28]. These results indicate that BK_{Ca} channels play an important role in

regulating proliferation of human ovarian cancer cells and may induce apoptosis through induction of p21^{Cip1} expression in a p53-dependent manner.

The ET-1 axis has recently been identified as contributing to prostate cancer progression by inducing cell proliferation [25], apoptosis protection, angiogenesis, and invasiveness, indicating that the pharmacologic inhibition of the ET_AR signaling pathway. ET-1 has been shown to be mitogenic and to act as an autocrine or paracrine regulator of growth in many tumor cells [26, 27]. ET-1 may exert its mitogenic effect in LNCaP and PC-3 cells through autocrine mechanisms. A criterion for autocrine growth regulation is an inhibition of spontaneous growth by selective receptor antagonists that specifically block the biological action of the endogenous growth-promoting ligand. Data obtained in this study do support such a view. The results of the present study showed that spontaneous proliferation of unstimulated LNCaP and PC-3 cells was inhibited by the ET_AR antagonist BQ123, but not by ET_BR antagonist BQ788, suggesting that ET-1 is an autocrine growth factor involved in the regulation of prostate cancer cell proliferation. ET-1 and ET_AR not only influence cell proliferation directly but also act synergistically with polypeptide growth factors that are relevant to cancer progression, such as EGF and its receptors [29-31]. ET-1 is known to exert its action through activation of ET_AR and ET_BR, both of which are expressed in many tumor cells. The mitogenic contributions of the ET receptor subtypes are different in different types of tumors. Several groups have demonstrated that in epithelial tumors in vitro, the ET-1-induced mitogenic effect is mediated *via* the ET_AR and in nonepithelial tumors in vitro ET_BR is involved in this process [14, 26, 30, 32]. The present study showed that even though both ET_AR and ET_BR are found in LNCaP and PC-3 cells, the mitogenic effect and calcium signaling of ET-1 LNCaP and PC-3 cells were mediated predominantly by ET_AR. This is evident from the fact that the proliferation and increase of [Ca²⁺]_i induced by ET-1 (10⁻⁷M) could be blocked by BQ123, a selective ET_AR antagonist, but not by BQ788, a selective ET_BR antagonist. These results are consistent with previous studies showing that the major function of ET_AR is linked to mitogenic signal transduction [26] and [27]. However, the specific function of ET_BR expressed in prostate cancer cells remains unknown. It has been proposed in lung cancer that ET_BR exerts a variety of compensatory activities, including ET-1 clearance, inhibition of ET-1 secretion, and activation of signal transduction pathways that feedback-regulate the effects of ET-1 [33]. Moreover, a previous study showed that the ET_AR-mediated mitogenic and proliferative effect of ET-1 could be enhanced by

methylation-induced inactivation of ET_BR, leading to the loss of its unique negative regulatory functions [2]. Further investigation is needed to explore the biological role of ET_BR in prostate cancer. [Ca²⁺]_i has been shown to be an intracellular secondary messenger that mediates ET-1-induced mitogenic actions in a variety of cell including endothelial cells and vascular smooth muscle cells [34]. However, little is known about the role of [Ca²⁺]_i in ET-1-induced mitogenic effects in tumor cells, and no information is yet available in prostate cancer cells. To obtain direct evidence, we first determined the effect of ET-1 on [Ca²⁺]_i and then explored its role in the ET-1-induced mitogenic effects in LNCaP and PC-3 cells. The [Ca²⁺]_i response typically consisted of a spike phase followed by a prolonged plateau phase and was blocked by the ET_A-selective receptor antagonist BQ123, which further indicates that the ET_AR expressed by human prostate cancer cells is a functional receptor that is linked to the intracellular Ca²⁺ signalling pathway. Data from this study are consistent with previous observations in human ovarian carcinoma cells [14, 35] and human cervix (HeLa) and larynx (Hep-2) cells [4]. In such cells, the functional activity of the ET_AR was indicated by the ability of ET-1 to induce dose-dependent increases in [Ca²⁺]_i which are inhibited by the specific ET_AR antagonist, BQ123. It is well established that the elevation of [Ca²⁺]_i induced by ET-1 and ET_AR mainly results from Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release from intracellular Ca²⁺ stores *via* the PLC/phosphoinositol/Ca²⁺ pathway. To further determine the role of [Ca²⁺]_i in ET-1-induced proliferation of LNCaP and PC-3 cells and to identify possible alternative Ca²⁺ pathways, we investigated two different mechanisms by using a PLC inhibitor and an potassium and calcium channel blockers. The ET-1-induced cell proliferation and increases of [Ca²⁺]_i at 10⁻⁷ M were significantly reduced by U73122, the specific inhibitor of PLC, but not by U73433, its inactive analogue. But we could observe that the inhibition of the PLC pathway, by the use of the U73122, was not completed. The mitogenic effect of the ET-1 may involve another membrane signaling pathway such the CD38 pathway. ADP-ribosyl cyclase (ADPR cyclase) and ryanodine receptors (RyR) participate in calcium transduction in cancer cell lines. A study has been shown that the ET-1 uses the CD38 pathway in the T. We hypothesized that this signaling pathway is activated by ET_AR receptors in cancer cell lines to mediate partially cell proliferation *in vivo* and induces [Ca²⁺]_i. Chelating extracellular Ca²⁺ reduced the ET-1-induced mitogenic effects and increased [Ca²⁺]_i in LNCaP and PC-3 cells. These data indicate that the ET-1-induced elevation of [Ca²⁺]_i and that the Ca²⁺

release from intracellular stores *via* activation of the phospholipase C/phosphoinositol/Ca²⁺ pathway (1). The [Ca²⁺]_i plays an important role in the ET-1-induced cell proliferation. The results of the present study are compatible with the importance of Ca²⁺ signaling and related responses in the ET-1-induced mitogenesis in vascular smooth muscle cells [34], human ovarian carcinoma cells [14] and two epithelial carcinoma cell lines [4]. Taken together with the findings presented above, we provide the first evidence that [Ca²⁺]_i plays an important role in the ET-1-induced cell proliferation in prostate cancer cells. Number of studies have shown that the ET-1 effects on cell proliferation of osteoblasts involve the activation of the calcineurin/NFAT pathways leading to the nuclear translocation of NFAT1, [36]. Our results obtained by using an inhibitor of the Calcineurin (FK506) suggest the involvement of the calcineurin/NFAT pathways in ET-1-induced cell growth in human prostate cancer cells.

Since it was reported that intracellular downstream effectors for direct ET-1-induced proliferative action, including PKC, EGF, insulin-like growth factor-1 and mitogen-activated protein kinase (MAPK), have been identified to various degrees in a number of cancers [29, 37, 38], it is likely that the molecular mechanisms that underlie this activity are varied in different tumors. Further studies are required to explore whether the Ca²⁺-independent signaling pathway is involved in this process.

Increased ET_AR expression is also seen in both primary and metastatic prostate cancer, correlating positively with advancing tumor stage and grade. The results of this study showed that mRNA of ET_AR and ET_BR are expressed in the human prostate cancer cells LNCaP and PC-3. We are finding in this study that ET-1 increase [Ca²⁺]_i in the prostate cancer cells androgeno-dependent LNCaP and androgeno-independent PC-3 and that the [Ca²⁺]_i plays an important role in the mitogenic effect of ET-1 in prostate cancer cells.

This increase of the [Ca²⁺]_i is inhibited by the agonist of the ET_AR (BQ123) demonstrating that this mechanism passes by the activation of ET_AR. We have studied the capacitive calcium entry (CCE) induced by the ET-1. However we observe a CCE whose amplitude is 3 times superior at the increase of calcium that one observes in condition 2Ca²⁺. However, when the cells are placed in a medium without calcium, we observed an increase in the amplitude of the calcium response corresponding to the mobilization from internal stores and to the CCE. These observations could be due to the fact that the calcium channels implied in this CCE in response to ET-1 are translocated to the plasmique membrane when the cells are incubated in a without calcium. In

the present studies, using the pharmacological tools and the siRNA technology, we identified the calcium-activated potassium channels and the calcium channels involved in CCE induced by ET-1 in prostate cancer cells. As the calcium entry appear to be a pathway involved in the effects of the ET-1 on the prostate cancer cells, these channels could constitute the targets in the development of the therapeutic strategies targeting the ET-1 axis in prostate cancer.

ET-1 production by prostate cancer cells is down-regulated by androgens and up-regulated by factors involved in tumour progression indicating a role for this peptide in the biology of prostate cancer [39]. The ET-1 is overexpressed with prostate cancer evolution so this peptide can promote cancer proliferation. Overexpression of the ET_AR has been found in a number of human cancer cell lines. Activation of the ET_AR by endothelin-1 (ET-1) promotes cell proliferation and survival in these tumours, whereas activation of the ET_BR results in an opposing effect. Therefore, blockade of ET_AR may have antitumor effects, while sparing ET_BR-mediated effects such as induction of apoptosis and clearance of ET-1. However, a study showed that the inhibition of the ET_BR, and not the ET_AR, inhibited the growth of the cancerous cells of skin [40]. Actually, the ET-1 axis is considered as a therapeutic target in cancer. The discovery of the ET-1 axis components and their function in human cancer has propelled the development a number of different approaches to target them. One of the most promising approaches is represented by the use of potent and selective ET_AR, ET_BR, or mixed ET_AR/ET_BR antagonists, which enhance tumor perfusion, thus potentiating the therapeutic efficacy of anticancer agents. The critical role of ET-1 axis and the therapeutic relevance of ET-1 receptor antagonists in a range of malignancies have lead to a new generation of molecularly targeted therapies for cancer. Clinical testing of atrasentan, ET_AR antagonist, has demonstrated benefit in prostate-specific antigen (PSA) progression, markers of bone turnover, and decreases pain in men with prostate cancer, but has not demonstrated significant improvement in survival or time to cancer progression [11]. The ET-1 axis has recently been identified as contributing a lot of cancer as prostate cancer [25]. The endothelin-converting enzyme (ECE-1) is overexpressed in prostate cancer [41]. In the noncancerous prostate gland, ET-1 is produced by epithelial cells, the highest concentration of ET-1 being found in the seminal fluid. In prostate cancer, key components of the ET-1 clearance pathway, such as ET_BR, are diminished, resulting in an increase in local ET-1 concentrations. Increased ET_AR expression is also seen in both primary and metastatic

prostate cancer, correlating positively with advancing tumor stage and grade. In prostate cancer cell lines, ET-1 promotes cell proliferation and survival, new bone formation, and stimulation of nociceptors. Actually, Atrasentan is a potent, oral, selective endothelin-A (ET_A) receptor antagonist that has clinical activity in patients with hormone-refractory prostate cancer (HRPC). The authors of this study report the results from a phase 3, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic HRPC [12].

In summary, we showed that the ET_AR and ET_BR are expressed in the human prostate cancer cell line LNCaP and PC-3; and ET-1 enhances the proliferation of LNCaP and PC-3 cells through activation of ET_AR. The activation of this receptor induced phosphoinositol/Ca²⁺ pathway with a mobilisation of the calcium from internal stores and a passive calcium entry (CCE). The ET-induced CCE in human prostate cancer cells involved the activation of calcium-activated potassium channels (IK_{Ca1} and BK_{Ca}) and calcium channels of the TRP family (TRPC1, TRPV6). The present data raise the intriguing possibility that the ion channels described here may be considered as a novel therapeutic target for the treatment prostate cancer.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. H. Lallet was supported by the Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP).

REFERENCES

1. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. (1996) Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate*, 28, 251-65.
2. Nelson JB, Chan-Tack K, Hedican SP, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Bova GS, Simons JW. (1996) Endothelin-1 production and decreased endothelin B receptor expression in advanced prostate cancer. *Cancer Res*, 56, 663-8.
3. Kusuhashi M, Yamaguchi K, Nagasaki K, Hayashi C, Suzuki A, Hori S, Handa S, Nakamura Y, Abe K. (1990) Production of endothelin in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 50, 3257-61.
4. Shichiri M, Hirata Y, Nakajima T, Ando K, Imai T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. (1991) Endothelin-1 is an

- autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest*, 87, 1867-71.
5. Nelson JB, Hedican SP, George DJ, Reddi AH, Piantadosi S, Eisenberger MA, Simons JW. (1995) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med*, 1, 944-9.
6. Bagnato A, Rosano L. (2008) The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 40, 1443-51.
7. Masaki T. (2000) The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35, S3-5.
8. Le Brun G, Moldovan F, Aubin P, Ropiquet F, Cussenot O, Fiet J. (1996) Identification of endothelin receptors in normal and hyperplasic human prostate tissues. *Prostate*, 28, 379-84.
9. Nelson JB, Lee WH, Nguyen SH, Jarrard DF, Brooks JD, Magnuson SR, Opgenorth TJ, Nelson WG, Bova GS. (1997) Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res*, 57, 35-7.
10. Nelson JB. (2001) Endothelin receptor antagonists in the treatment of prostate cancer. *Prostate*, 49, 91-2.
11. Jimeno A, Carducci M. (2006) Atrasentan: a rationally designed targeted therapy for cancer. *Drugs Today (Barc)*, 42, 299-312.
12. Nelson JB, Love W, Chin JL, Saad F, Schulman CC, Sleep DJ, Qian J, Steinberg J, Carducci M. (2008) Phase 3, randomized, controlled trial of atrasentan in patients with nonmetastatic, hormone-refractory prostate cancer. *Cancer*.
13. Plant TD, Zollner C, Kepura F, Mousa SS, Eichhorst J, Schaefer M, Furkert J, Stein C, Oksche A. (2007) Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain*, 3, 35.
14. Bagnato A, Tecce R, Moretti C, Di Castro V, Spergel D, Catt KJ. (1995) Autocrine actions of endothelin-1 as a growth factor in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 1, 1059-66.
15. Lee JG, Zheng R, McCafferty-Cepero JM, Burnstein KL, Nanus DM, Shen R. (2008) Endothelin-1 enhances the expression of the androgen receptor via activation of the c-myc pathway in prostate cancer cells. *Mol Carcinog*.
16. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P. (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium*, 39, 357-66.
17. Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, Crepin A, Delcourt P, Slomianny C, Thebault S, Bonnal JL, Benahmed M, Cabon F, Mauroy B, Prevarskaya N. (2005) Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer*, 12, 367-82.
18. Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
19. Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H, Denef C. (1999) Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology*, 140, 4874-85.
20. Vanoverberghe K, Mariot P, Vanden Abeele F, Delcourt P, Parys JB, Prevarskaya N. (2003) Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium*, 34, 75-85.
21. Douglas SA, Meek TD, Ohlstein EH. (1994) Novel receptor antagonists welcome a new era in endothelin biology. *Trends Pharmacol Sci*, 15, 313-6.
22. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, Mase T, Mino N, Saeki T, Fukuroda T, Fukami T, Ozaki S, Nagase T, et al. (1994) Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4892-6.
23. White TA, Kannan MS, Walseth TF. (2003) Intracellular calcium signaling through the cADPR pathway is agonist specific in porcine airway smooth muscle. *Faseb J*, 17, 482-4.
24. Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. (2007) Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 4682-7.
25. Kopetz ES, Nelson JB, Carducci MA. (2002) Endothelin-1 as a target for therapeutic

- intervention in prostate cancer. *Invest New Drugs*, 20, 173-82.
26. Grant K, Loizidou M, Taylor I. (2003) Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*, 88, 163-6.
 27. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, 110-6.
 28. Han X, Xi L, Wang H, Huang X, Ma X, Han Z, Wu P, Lu Y, Wang G, Zhou J, Ma D. (2008) The potassium ion channel opener NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 375, 205-9.
 29. Grant K, Knowles J, Dawas K, Burnstock G, Taylor I, Loizidou M. (2007) Mechanisms of endothelin 1-stimulated proliferation in colorectal cancer cell lines. *Br J Surg*, 94, 106-12.
 30. Rosano GM, Gebara O, Sheiban I, Silvestri A, Wajngarten M, Vitale C, Aldrighi JM, Ramires AF, Fini M, Mercurio G. (2007) Acute administration of 17beta-estradiol reduces endothelin-1 release during pacing-induced ischemia. *Int J Cardiol*, 116, 34-9.
 31. Jia RP, Jiang YF, Xu LW, Wang SK, Wang ZZ, Li WC, He BS. (2008) [Epidermal growth factor up-regulates the mRNA expression of endothelin-1 and its receptors in prostate cancer PC-3 cell lines]. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 14, 15-9.
 32. Bagnato A, Rosano L, Di Castro V, Albini A, Salani D, Varmi M, Nicotra MR, Natali PG. (2001) Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am J Pathol*, 158, 841-7.
 33. Fukuroda T, Ozaki S, Ihara M, Ishikawa K, Yano M, Nishikibe M. (1994) Synergistic inhibition by BQ-123 and BQ-788 of endothelin-1-induced contractions of the rabbit pulmonary artery. *Br J Pharmacol*, 113, 336-8.
 34. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. (1988) Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 238, 249-52.
 35. Bagnato A, Venuti A, Di Castro V, Marcante ML. (1995) Identification of the ETA receptor subtype that mediates endothelin induced autocrine proliferation of normal human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 209, 80-6.
 36. Van Sant C, Wang G, Anderson MG, Trask OJ, Lesniewski R, Semizarov D. (2007) Endothelin signaling in osteoblasts: global genome view and implication of the calcineurin/NFAT pathway. *Mol Cancer Ther*, 6, 253-61.
 37. Vacca F, Bagnato A, Catt KJ, Tecce R. (2000) Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 60, 5310-7.
 38. Pirtskhalaishvili G, Nelson JB. (2000) Endothelium-derived factors as paracrine mediators of prostate cancer progression. *Prostate*, 44, 77-87.
 39. Granchi S, Brocchi S, Bonaccorsi L, Baldi E, Vinci MC, Forti G, Serio M, Maggi M. (2001) Endothelin-1 production by prostate cancer cell lines is up-regulated by factors involved in cancer progression and down-regulated by androgens. *Prostate*, 49, 267-77.
 40. Rosano L, Spinella F, Genovesi G, Di Castro V, Natali PG, Bagnato A. (2004) Endothelin-B receptor blockade inhibits molecular effectors of melanoma cell progression. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44 Suppl 1, S136-9.
 41. Dawson LA, Maitland NJ, Berry P, Turner AJ, Usmani BA. (2006) Expression and localization of endothelin-converting enzyme-1 in human prostate cancer. *Exp Biol Med* (Maywood), 231, 1106-10.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. The effects of ET-1 on the cell proliferation in prostate cancer cells. (A-B) RT-PCR analysis of ET_AR and ET_BR expression in androgen-sensitive (LNCaP), androgen-insensitive (PC-3), and primary cultured human prostate cancer epithelial (hPCE) cells. The amplified cDNA fragments with respective specific primers are 328-bp for ET_AR and 351-bp for ET_BR. **(C-D)** ET-1 stimulated a dose-dependent increase in cell number when added to quiescent LNCaP and PC-3 cells. Cells in 96-well plates were rendered quiescent in RPMI 1640 medium with 2% CS. Quiescent monolayers were stimulated with ET-1 at the indicated concentrations and then cultured for a further 72h. **(E-F)** ET-1 induced cell proliferation was blocked by ET_AR antagonist BQ123. ET-1 (10⁻⁷ M) was added to quiescent cells or to quiescent cells preincubated for 10 min at 37°C with BQ123 or BQ788, respectively. Effects of BQ123 (10⁻⁷ M) and BQ788 (10⁻⁷ M) on ET-1 induced cell proliferation in LNCaP (E) and PC-3 (F). **(G-H)** ET-1 induced cell proliferation was significantly reduced by U73122 at 10⁻⁵ M, a specific inhibitor of phospholipase C

(PLC). ET-1 (10^{-7} M) was added to quiescent cells or to quiescent cells preincubated for 10 min at 37°C with U73122 or the inactive U73122 analogue U73433, respectively.

Figure 2. Involvement of calcium signaling in the ET-1 effects in human prostate cancer cells. The effects of endothelin-1 were studied in cell proliferation and in fura-2-loaded LNCaP and PC-3 cells by calcium imaging where the cells were perfused with in 2Ca^{2+} solution and endothelin-1 (ET-1, 100nM) as indicated. **(A-B)** ET-1-induced LNCaP and PC-3 cell proliferation was blocked by the calcineurine inhibitor FK-506 (10 μM). **(C-D)** LNCaP and PC-3 cells were loaded with the sensitive fluorescent dye, Fura-2, and changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were measured as described under “*Materials and methods*”. Representative traces of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to ET-1 (10^{-7} M) in LNCaP (C) and PC-3 (D) cells. **(E-F)** Effects of BQ123 (10^{-7} M), ET_A R specific agonist, and BQ788 (10^{-7} M), ET_B R specific agonist, on ET-1 induced increases of $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Figure 3. Characterization of the Ca^{2+} signal evoked by endothelin-1 in human prostate cancer cells. The effects of endothelin-1 in fura-2-loaded LNCaP and PC-3 cells were studied by calcium imaging. **(A-B)** To study the involvement of calcium-activated potassium channels functions in passive calcium entry, CCE was induced in LNCaP (A) and PC-3 (B) prostate cancer cells, as described above. **(C-D)** Representative traces of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to ET-1 (10^{-7} M) in LNCaP (C) and PC-3 (D) cells in HBSS 0Ca^{2+} then 2Ca^{2+} . Periods of ET-1 applications and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0Ca) to 2mM (2Ca) are marked by horizontal bars

Figure 4. Involvement of calcium-activated potassium channels in ET-1-induced CCE (A-B) RT-PCR analysis of IK_{Ca1} and BK_{Ca} expression in androgen-sensitive (LNCaP), androgen-insensitive (PC-3), and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells. The amplified cDNA fragments with respective specific primers are 867-bp for IK_{Ca1} and 1634-bp for BK_{Ca} . To study the involvement of potassium channels calcium-activated functions in passive calcium entry, CCE was induced in LNCaP **(B)** and PC-3 **(C)** prostate cancer cells, as described above, in the absence (CTL) or presence of siRNA against IK_{Ca1} **(Fig. 4B et 4C)** or BK_{Ca} channel **(Fig. 4D et 4E)**. Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative LNCaP **(C, E)** and PC-3 **(D, F)** cells are presented for each experiment. A quantification of the capacitative calcium entry

(CCE) in the presence and absence of the siRNA (IK_{Ca1} and BK_{Ca}) is presented for LNCaP (C and E) (mean \pm SE, n = 45 cells) and PC-3 (D and F) (mean \pm SE, n = 50 cells) cells. Periods of ET-1 application and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0Ca^{2+}) to 2mM (2Ca^{2+}) are marked by horizontal bars.

Figure 5. Involvement of the TRP calcium channels in ET-1-induced CCE. (A,B) RT-PCR analysis of TRPV6 and TRPC1 expression in androgen-sensitive (LNCaP), androgen-insensitive (PC-3), and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells. The amplified cDNA fragments with respective specific primers are 255-bp for TRPV6 and 595-bp for TRPC1. To study the involvement of calcium channels functions in passive calcium entry, CCE was induced in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells, as described above, in the absence (CTL) or presence of siRNA against TRPV6 **(Fig. 5C et 5D)** or TRPC1 channel **(Fig. 5E et 5F)**. Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures on a field of 25 to 40 cells and representative LNCaP (C, E) and PC-3 (D, F) cells are presented for each experiment. A quantification of the capacitative calcium entry (CCE) in the presence and absence of the siRNA (TRPV6 and TRPC1) is presented for LNCaP (C and E) (mean \pm SE, n = 45 cells) and PC-3 (D and F) (mean \pm SE, n = 50 cells) cells. Periods of ET-1 application and extracellular Ca^{2+} and ET-1 increase from 0 (0Ca^{2+}) to 2mM (2Ca^{2+}) are marked by horizontal bars.

Figure 6. Involvement of the Orai-1 calcium channels in ET-1-induced CCE. (A) RT-PCR analysis of Orai-1 expression in androgen-sensitive (LNCaP), androgen-insensitive (PC-3), and primary cultured human prostate cancer epithelial (PrEC) cells. The amplified cDNA fragments with respective specific primers are 406 bp for Orai-1. To study the involvement of calcium channels functions in passive calcium entry, CCE was induced in LNCaP **(B)** and PC-3 **(C)** prostate cancer cells, as described above, in the absence (CTL) or presence of siRNA against Orai-1 **(Fig. 5B et 5C)**. Each experiment was repeated at least 3 times in different cell cultures on a field of 35 cells and representative LNCaP **(B)** and PC-3 **(C)** cells are presented for each experiment. A quantification of the capacitative calcium entry (CCE) in the presence and absence of the siRNA (Orai-1) is presented for LNCaP **(B)** (mean \pm SE, n = 45 cells) and PC-3 **(C)** (mean \pm SE, n = 37 cells) cells. Periods of ET-1 application and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0Ca^{2+}) to 2mM (2Ca^{2+}) are marked by horizontal bars.

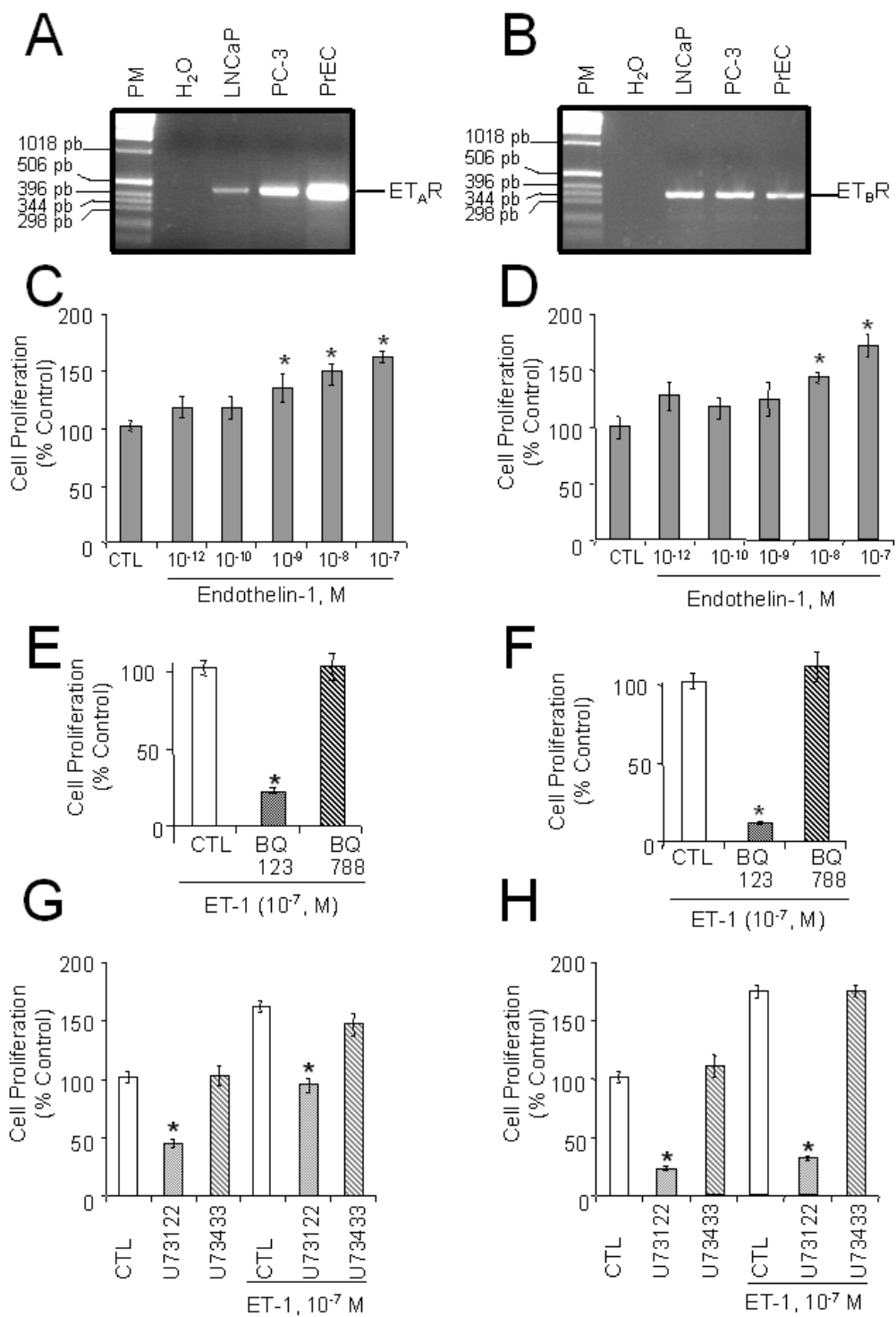


Figure 1. Lallet-Daher et al., 2008

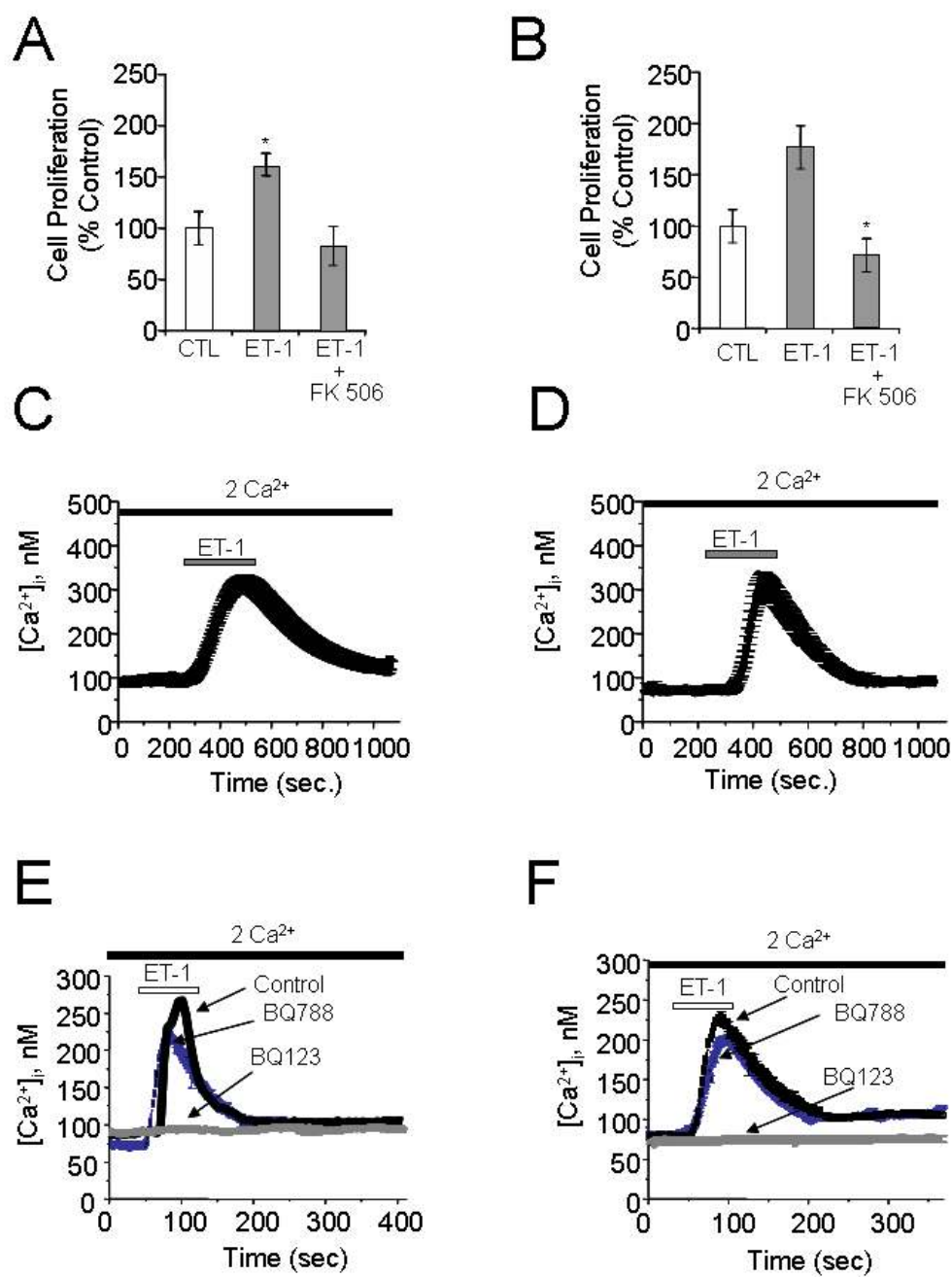


Figure 2. Lallet-Daher et al., 2008

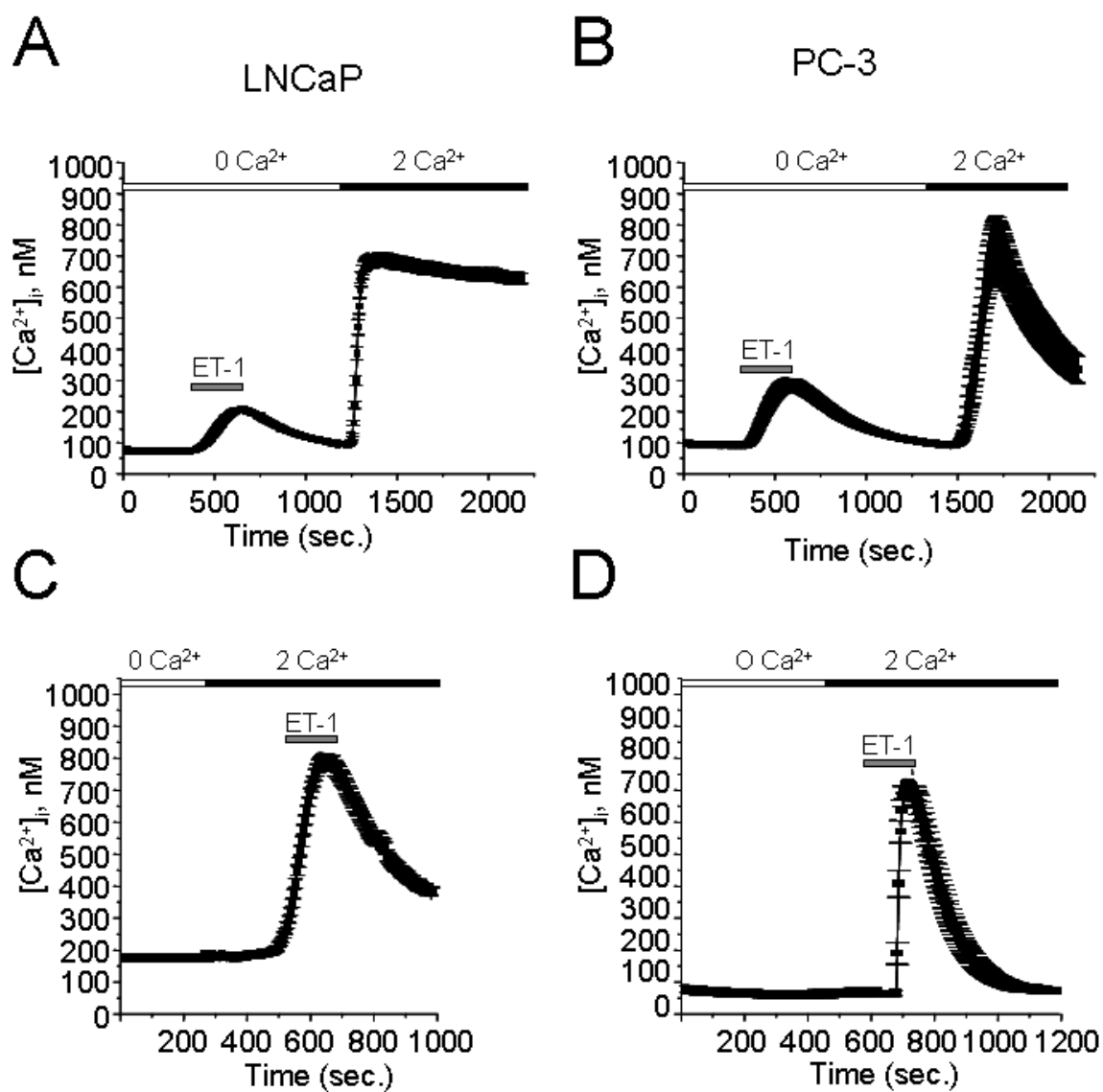


Figure 3. Lallet-Daher et al., 2008

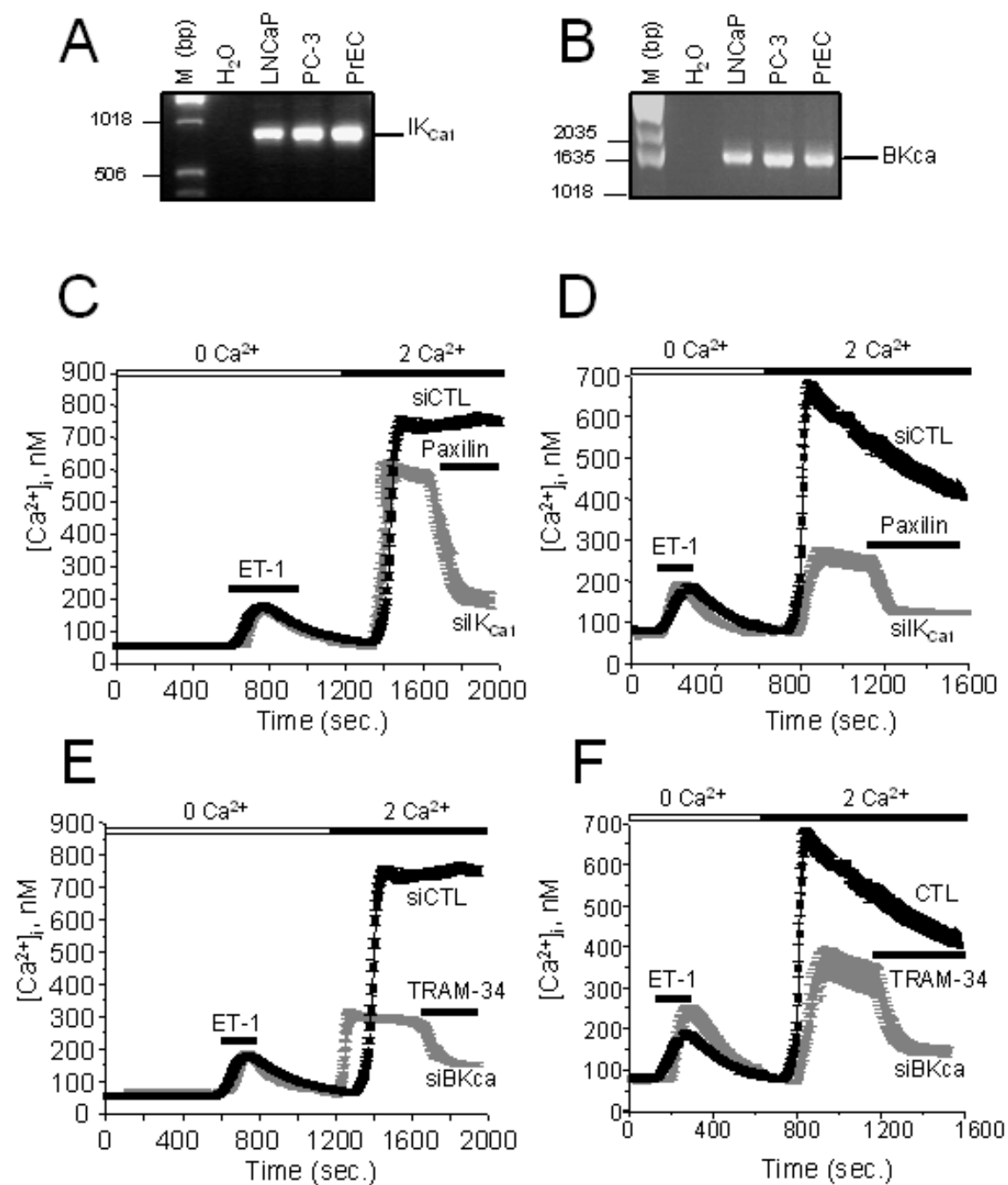


Figure 4. Lallet-Daher et al., 2008

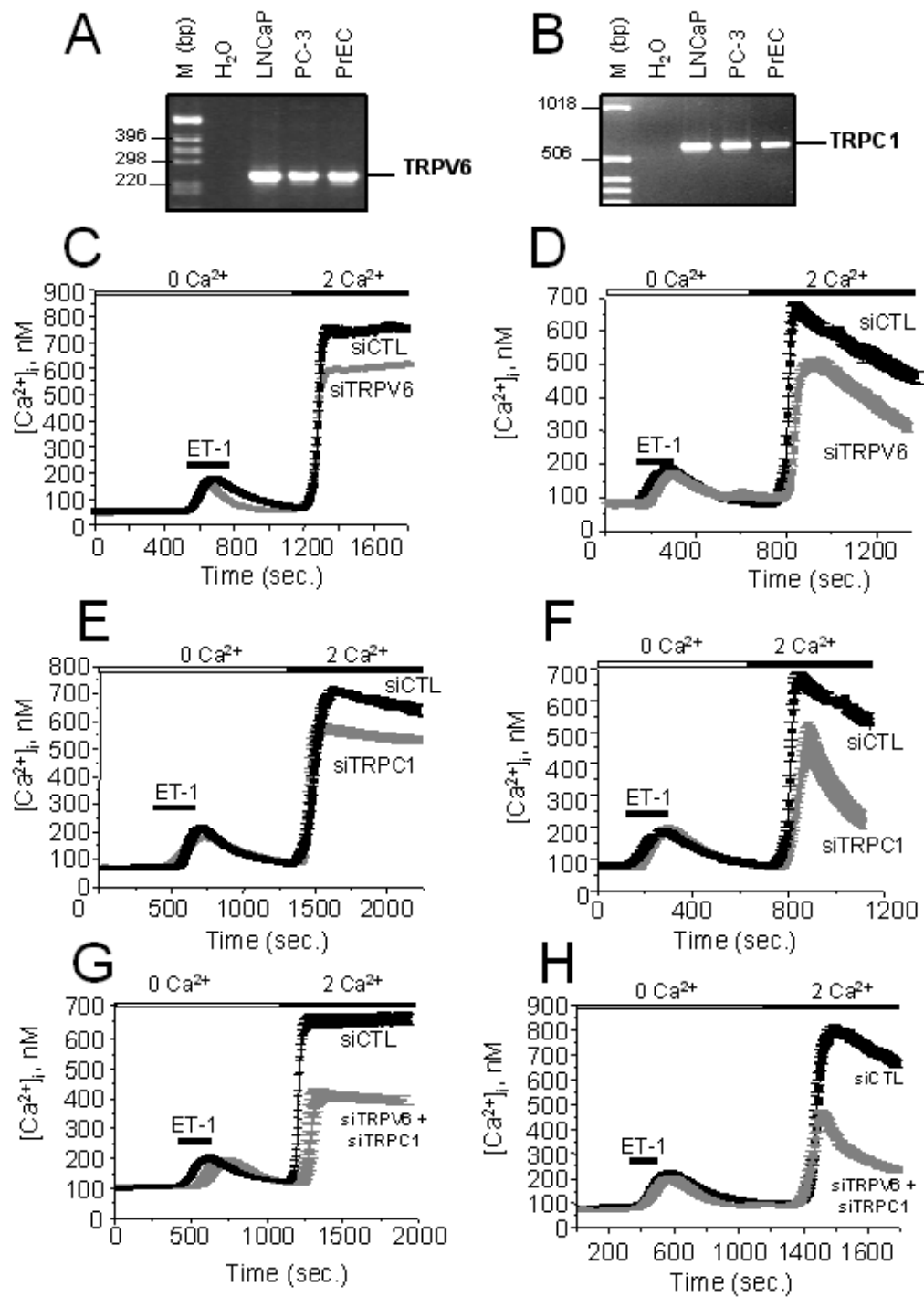


Figure 5. Lallet-Daher et al., 2008

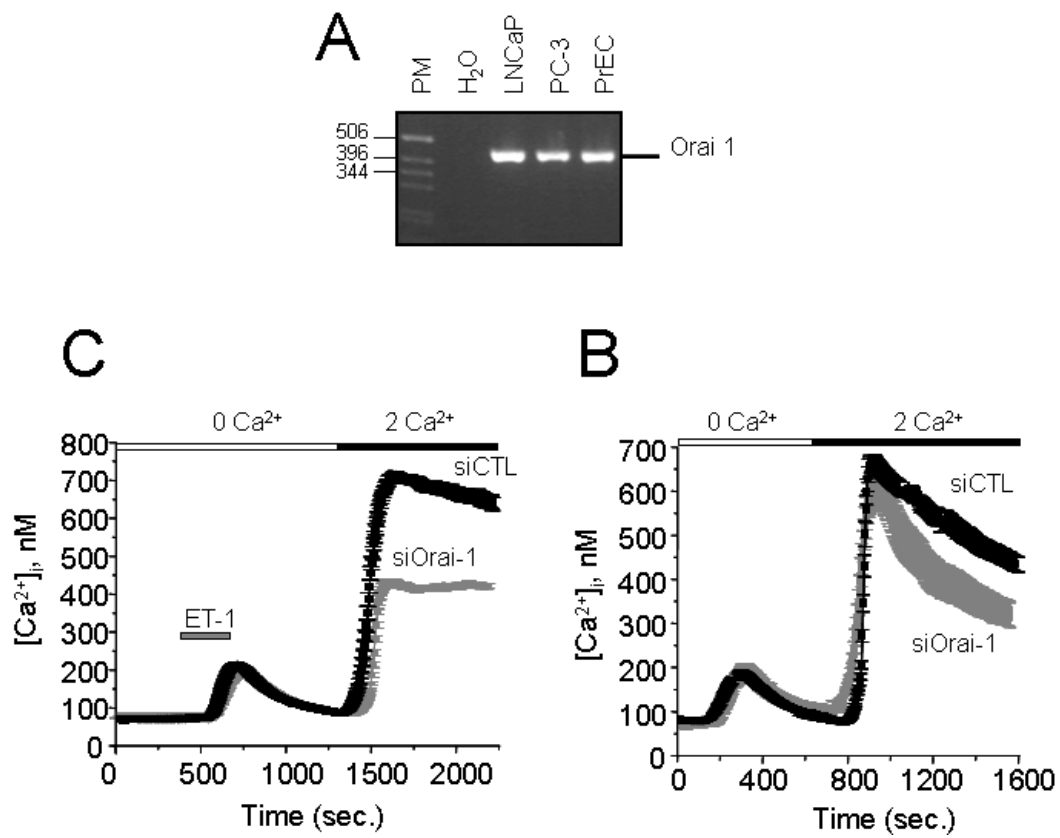


Figure 6. Lallet-Daher et al., 2008

DISCUSSION

Le cancer de la prostate est une maladie fréquente devenue un véritable problème de santé publique. En effet, cette pathologie présente la particularité de n'être sensible à aucune chimiothérapie connue actuellement. En outre, les traitements actuels ont une efficacité limitée dans le temps, et l'issue de la maladie est encore trop souvent mortelle faisant de cette maladie le second cancer le plus meurtrier chez l'homme.

Il est bien établi depuis longtemps que la croissance du tissu prostatique sain et pathologique de la prostate est dépendante des androgènes. Durant de nombreuses années, les androgènes ont été la seule cible des recherches contre le cancer de la prostate, et les traitements actuels ont d'ailleurs pour point commun d'empêcher l'action des androgènes sur cet organe. Cependant, cette théorie hormonale du développement du cancer de la prostate a ses limites. En effet, les traitements androgéniques actuels sont bénéfiques à une majorité de patients de façon temporaire car il est fréquent que ces patients développent par la suite une résistance aux traitements. Cette résistance est le résultat d'une part de l'évolution des cellules cancéreuses prostatiques vers l'androgéno-indépendance et d'autre part de l'augmentation de la différenciation neuroendocrine (Bonkhoff et al., 1994) qui, en général, est associée à un pronostic clinique défavorable (augmentation de l'agressivité et de l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques).

L'une des caractéristiques majeures de l'évolution du cancer de la prostate vers l'androgéno-indépendance se traduit par la capacité des cellules à survivre indépendamment du stroma grâce à l'intervention de facteurs non androgéniques. **L'étude des cibles et des mécanismes d'action de ces facteurs permettrait à terme de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques.** Or de nombreuses études ont montré que les conductances ioniques et le calcium intracellulaire sont des éléments importants des cascades d'événements conduisant à la stimulation de la prolifération ou au déclenchement de l'apoptose. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle des canaux ioniques, et plus particulièrement des canaux potassiques calcium-activés connus pour être surexprimés dans le cancer (Cherubini et al., 2000 ; Ghanshani et al., 2000), et du calcium dans la croissance des cellules prostatiques.

Cependant, ces différents travaux et bien d'autres n'ont pas encore permis de déterminer exactement l'implication réelle des canaux membranaires dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Le canal IK_{Ca1} et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques

La plupart des données sur le rôle des canaux ioniques dans la modulation et la prolifération de nombreux types cellulaires concernent les canaux potassiques. Précédemment, des études menées au sein de notre laboratoire ont montré l'implication des canaux potassiques dans la croissance et la prolifération des cellules LNCaP (Skryma et al., 1997 et 1999). De plus, il existe une corrélation entre l'augmentation de l'expression des canaux potassiques et la prolifération cellulaire. Il est donc très important d'examiner le rôle des canaux potassiques sur la croissance des cellules épithéliales prostatiques normales et malignes, ainsi que leur implication dans la croissance des cellules au cours de la cancérogenèse. Notre étude a porté sur l'expression, la fonctionnalité, et la participation du canal potassique IK_{Ca1} dans la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Des études récentes montrent l'implication de ces canaux potassiques calcium-dépendants (K_{Ca}) et plus particulièrement celui à conductance intermédiaire (IK_{Ca1}) dans la prolifération des différents systèmes cellulaires comme notamment les lymphocytes T humains (Jensen et al ; 1999 ; Fanger et al, 2001) et les cellules pancréatiques humaines (Jäger et al, 2004). Par ailleurs, il a été démontré que les canaux potassiques de type IK_{Ca1} sont surexprimés dans les cellules cancéreuses (Ghanshani et al., 2000).

Notre étude a porté sur l'expression, la fonctionnalité, et la participation du canal potassique IK_{Ca1} dans la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ces travaux ont été effectués pour la plupart au niveau des cellules cancéreuses prostatiques humaines androgène-dépendantes (LNCaP), androgène-indépendantes (PC-3). Puis, ces études ont été étendues aux cellules issues des cultures primaires effectuées à partir des prélèvements d'individus atteints d'un cancer de la prostate.

Nous avons montré que l'ARNm et la protéine de ce canal étaient exprimés dans les cellules cancéreuses prostatiques. Les études d'électrophysiologies de patch-clamp en configuration cellule entière ont montré la fonctionnalité de ce canal dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP, PC-3 et dans les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques issues d'une culture primaire. En effet, dans ces cellules, une augmentation du calcium intracellulaire conduit au développement du courant potassique de type IK_{Ca1} , un courant bloqué par l'inhibiteur de ce canal (Clotrimazole et TRAM-34). Par ailleurs, nous avons montré que ce canal modulait le potentiel de membrane dans les trois types cellulaires. En effet, lors de l'augmentation du calcium intracellulaire, nous avons observé une hyperpolarisation du potentiel de membrane de ces cellules. Cette hyperpolarisation étant

bloquée par le Clotrimazole ou TRAM-34, suggérant l'implication du canal potassique de type IK_{Ca1} dans cette hyperpolarisation calcium-dépendante. **Ces résultats montrent que le canal potassique de type IK_{Ca1} est exprimé et est fonctionnel dans les cellules cancéreuses prostatiques et qu'il intervient dans le maintien du potentiel de membrane.** Notre étude nous a également permis de mettre en évidence une **surexpression de ce canal au niveau des tissus cancéreux prostatiques** par rapport aux tissus non cancéreux (HBP). Ces travaux sont concordants avec des études précédemment réalisés montrant la surexpression de ce canal dans les cancers de l'endomètre (Wang et al., 2007) et dans ceux du pancréas humain (Jäger et al., 2004).

De plus, par l'utilisation des outils pharmacologiques (TRAM-34, Clotrimazole) et par l'élimination de l'expression du canal (utilisation des ARN interférents, siARN), nous avons montré une inhibition dose-dépendante de la prolifération dans les cellules LNCaP et PC-3, suggérant l'intervention de ce canal potassique dans la modulation de la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. L'étude des mécanismes par lesquels la fonctionnalité du canal IK_{Ca1} interviendrait dans la prolifération cellulaire a montré qu'en modulant le potentiel de membrane, ce canal intervient dans l'entrée capacitive de calcium (CCE). **Cette étude a permis de mettre en évidence l'un des mécanismes par lequel les canaux potassiques modulent la croissance cellulaire en contribuant au remplissage des stocks calciques intracellulaires.** De plus, en inhibant par des outils pharmacologiques (TRAM-34 et clotrimazole) la fonctionnalité du canal IK_{Ca1} nous avons montré une augmentation de l'expression de la protéine $p21^{Cip1}$ dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Or cette protéine intervient dans l'arrêt du cycle et la différenciation cellulaire. Nous avons également montré par des études de co-immunoprécipitations que le canal IK_{Ca1} et le canal calcique TRPV6 (anciennement nommé CaT1) sont associés formant ainsi un complexe moléculaire et fonctionnel permettant l'entrée de calcium favorisant la prolifération cellulaire.

Le canal IK_{Ca1} et le cycle cellulaire

Il est maintenant bien établi que les cellules sont dépolarisées en début de la phase G1 mais leurs potentiels de membrane s'hyperpolarisent au cours de la progression de la phase G1 vers la phase S. Il a été montré que l'inhibition des canaux K^+ conduit à une dépolarisation membranaire et un arrêt du cycle en phase G1 dans les cellules cancéreuses de sein (lignée cellulaire MCF-7) (Ouadid-Ahidouch et al., 2001 ; Wang S et al., 1998). Dans nos études de l'implication du canal IK_{Ca1} dans le cycle cellulaire, nous avons montré que lorsque l'on inhibe le canal IK_{Ca1} par les traitements pharmacologiques ou lorsque l'on supprime son

expression par l'utilisation des siARN spécifiques, on observe une diminution de 63% des cellules en phase S avec une accumulation de ces cellules cancéreuses prostatiques LNCaP en phase G1.

Inversement, l'activation des canaux K^+ stimulerait la progression des cellules dans le du cycle cellulaire, de la phase G0/G1 vers la phase S. La division des cellules eucaryotes est régulée par des complexes cycline-CDK (kinases dépendantes des cyclines) qui contrôlent la progression des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. L'accomplissement de chacune des étapes du cycle cellulaire et les transitions de l'une à l'autre sont assurés par l'activation séquentielle d'une famille de protéines : les CDK (cyclin-dependent kinase), chacune d'entre elles étant relativement spécifique à une phase du cycle. Comme leur nom l'indique, les CDK sont en partie activées par leur association aux sous-unités régulatrices, les cyclines, dont l'abondance varie au cours du cycle cellulaire. Ces différents complexes cyclines-CDK sont autant de points de contrôle qui jalonnent le cycle de façon à s'assurer du bon déroulement de la phase précédente avant d'engager la suivante. À ce titre, ils représentent l'aboutissement de voies de signalisation chargées de vérifier par exemple l'intégrité de l'ADN, la qualité de sa réplication (une réplication complète et une seule à chaque cycle) ou encore celle du fuseau mitotique, cela afin d'éviter que d'éventuelles anomalies ne soient propagées de façon définitive. La défaillance d'un ou plusieurs de ces circuits de contrôle est une caractéristique moléculaire fondamentale de toute cellule cancéreuse.

C'est l'inhibition de ces complexes cyclines-CDK par des inhibiteurs spécifiques (CDKI pour cyclines-CDK inhibitors) qui assure l'arrêt du cycle à chacun de ces points de contrôle, le temps nécessaire à la réparation des anomalies. **Nous avons démontré que l'inhibition du canal IK_{Ca1} induit un arrêt des cellules en phase G1 accompagné de l'accumulation de la protéine $p21^{Cip1}$ régulateur du cycle cellulaire.** Il est bien établi que l'augmentation de la protéine $p21^{Cip1}$ est impliquée dans la sortie du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire (Johnson and Walker, 1999; Sherr and Roberts, 1999).

Cependant, le mécanisme par lequel l'inhibition du canal IK_{Ca1} affecte l'accumulation d'inhibiteurs de la kinase cyclin – dépendants, $p21^{Cip1}$, n'est pas connu. Toutefois, la transcription de la protéine $p21^{Cip1}$ est régulée par plusieurs facteurs dont **p53** (Chinery et al., 1997; Datto et al., 1997). En effet, la protéine $p21^{Cip1}$ est bien connue pour être le relais de la voie p53 activée notamment par les lésions de l'ADN (Fernandez-Fernandez MR et al., 2008), mais $p21^{Cip1}$ peut également être lui-même activé indépendamment de la p53 pendant l'arrêt de croissance accompagnant la différenciation (Macleod et al., 1995).

En ce qui concerne la régulation de l'expression de $p21^{Cip1}$ par la « voie dépendante de p53 », elle fait intervenir les protéines S100 (S100B, S100A4, S100A2 et S100A1) dont leur activation est dépendante de la fixation du calcium intracellulaire. Il a été démontré que ces protéines (S100B et S100A4) modulent l'expression de $p21^{Cip1}$ de deux façons. D'une part, elles peuvent se fixer sur p53 l'empêchant de jouer son rôle d'activateur de la transcription du gène $p21^{Cip1}$. D'autre part, elles peuvent entraîner la dégradation de p53. Donc lorsque l'on bloque le canal IK_{Ca1} , on induit une diminution du calcium intracellulaire en ne favorisant pas son driving force par l'intermédiaire du canal calcique TRPV6. Par conséquent, les protéines S100 ne sont pas activées et ne peuvent empêcher l'action, soit par inactivation soit par dégradation, de la protéine p53 sur la protéine $p21^{Cip1}$. Par ailleurs, il a été démontré que les protéines S100B et S100A4 étaient surexprimées dans le cancer de la prostate (Salama et al., 2008). L'augmentation de la protéine S100B dans les fluides biologiques (sang, LCR) a deux causes principales : une surexpression génique ou une libération de cette protéine consécutive à une lyse cellulaire. En pratique, la protéine S100B peut-être un marqueur biologique de certaines pathologies tumorales.

En ce qui concerne la régulation de l'expression de $p21^{Cip1}$ par la « voie indépendante de p53 », une étude a montré que $p21^{Cip1}$ était un nouveau substrat de la voie Akt/PKB (protéine kinase B) (Datta SR et al., 1999 ; Alessi DR et al., 1998). Akt est une oncoprotéine dont on savait déjà qu'elle était activée par les phosphoinositides triphosphates produits par la PI3-kinase. Parmi les cibles déjà connues d'Akt on trouve Bad, la caspase 9 et la protéine Forkhead étaient impliquées dans la promotion de la survie cellulaire, alors que p21, p27 et GSK3beta/cycline D1 contrôlaient négativement le cycle cellulaire. En effet, Akt active la prolifération en inhibant (en la phosphorylant) la kinase GS3K chargée à son tour de phosphoryler la cycline D1 entraînant sa fuite du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation rapide (Diehl et al., 1998). Le travail de Zhou et al. (Zhou et al., 2001) a établi que $p21^{Cip1}$ est associée physiquement à Akt qui la phosphoryle au niveau de la thréonine 145 située dans le signal de localisation nucléaire et que la protéine $p21^{Cip1}$ phosphorylée quitte le compartiment nucléaire pour se retrouver dans le cytoplasme. Une étude récente (Teos et al., 2008) montre que le canal potassique IK_{Ca1} est impliqué dans la repolarisation du potentiel d'action et le maintien du potentiel de membrane au niveau des cardiomyocytes par la voie PI-3K/Akt. Il se pourrait que l'inhibition du canal IK_{Ca1} entraîne une diminution de l'activité de la voie PI-3K/Akt et par conséquent une augmentation de l'activité de $p21^{Cip1}$ n'étant plus inhibée par Akt. Or seule la protéine $p21^{Cip1}$ nucléaire peut exercer son effet négatif sur la croissance cellulaire. Akt occupe donc un rôle-clé dans le cycle cellulaire sur lequel elle exerce un

contrôle positif passant par deux voies de signalisation aux effets opposés : d'une part en inhibant l'effet régulateur négatif de la kinase GS3K sur la prolifération (Diehl JA et al., 1998), d'autre part en s'opposant à l'effet anti-prolifératif de p21^{Cip1} (Zhou BP et al., 2005). La phosphorylation de la thréonine 145 de p21^{Cip1} étant critique pour ce dernier effet, cela ouvre la voie à une intervention thérapeutique (El-Deiry, 2001). On peut imaginer par exemple d'interférer avec l'interaction physique entre Akt et p21^{Cip1}, ce qui permettrait à cette dernière de retourner dans le noyau pour y jouer son rôle modérateur de la prolifération, ou encore de stimuler l'activité de phosphatases qui pourraient contre-balancer l'effet d'Akt. Quel que soit l'avenir thérapeutique de ces travaux, on doit retenir qu'il s'agit d'un nouvel exemple de contrôle de l'expression d'un gène, ici p21^{Cip1}, par modulation de sa localisation subcellulaire, qui s'établit de plus en plus comme un mécanisme majeur de régulation.

Il a été également montré que l'expression de p21^{Cip1} était directement réprimée par l'oncogène c-myc par fixation sur le promoteur de ce gène. Lorsque la voie de signalisation wnt/wingless est active, c-myc est exprimée et inactive l'expression de p21^{Cip1} qui n'a alors aucun effet sur le cycle cellulaire. Lorsque la voie wnt/wingless est inhibée, la synthèse de p21^{Cip1} n'est plus réprimée et peut arrêter le cycle cellulaire provoquant alors la différenciation. Dans les cancers, la voie wnt/wingless échappe au contrôle physiologique, si bien que les cellules continuent à se diviser et à se comporter comme des cellules progénitrices malgré leur localisation à la surface de l'épithélium. Une étude a mis en évidence le lien entre le canal potassique calcium-dépendant BK_{Ca} et l'expression de c-myc dans les lymphocytes T (Hough et al., 1990). On pourrait imaginer que le canal IK_{Ca1} intervienne dans la voie wnt/wingless dans les cellules cancéreuses prostatiques en stimulant l'expression de c-myc. En bloquant IK_{Ca1}, on inhiberait c-myc et par conséquent on induirait une augmentation de p21^{Cip1} qui aurait pour conséquence l'arrêt du cycle cellulaire.

Toutefois, la présence de complexes fonctionnels associant entre eux des récepteurs et des canaux calciques ou des canaux ioniques de nature différente peut moduler la croissance cellulaire prostatique. Ainsi au cours de cette étude, nous avons identifié le canal calcique TRPV6 comme un élément majeur de cette entrée passive de calcium en réponse à l'hyperpolarisation membranaire associée à l'activation du canal IK_{Ca1}. Dans un travail récent, il a été démontré la contribution du canal TRPV6 endogène dans l'entrée de calcium (SOC « store-operated Ca²⁺ entry ») chez les cellules LNCaP (Van den Abeele et al., 2003). Dans ce travail, nous mettons en évidence son rôle dans l'entrée de calcium à une hyperpolarisation membranaire induite par l'activation du canal IK_{Ca1}. Nos données indiquent que lorsque l'on diminue ou supprime l'expression du canal calcique TRPV6 par l'utilisation

de siRNA spécifiques, le flux calcique en réponse à l'activation du canal IK_{Ca1} est inhibé. De plus, les expériences de co-immunoprécipitation indiquent qu'en plus d'une association fonctionnelle, il existerait une interaction physique entre les canaux IK_{Ca1} et TRPV6 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Toutefois le type d'association (directe ou indirecte) entre ces deux canaux reste à déterminer.

Nous avons démontré pour la première fois que le canal IK_{Ca1} joue un rôle majeur dans le processus prolifératif des cellules cancéreuses prostatiques humaines, probablement responsable en partie du potentiel cancéreux de ces cellules. Une augmentation d'expression de ce canal dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules non cancéreuses peut représenter un avantage en favorisant l'entrée de calcium dans la cellule cancéreuse *via* le canal calcique TRPV6, aussi connu pour être surexprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines (Peng et al., 2001).

La surexpression de TRPV6 dans le cancer de la prostate (Peng et al., 2001) et la surexpression d' IK_{Ca1} que nous venons de montrer, peuvent être un avantage pour les cellules tumorales. A la lumière de ces résultats, le canal potassique IK_{Ca1} , tout comme le canal TRPV6, pourrait être considéré comme cible potentielle dans l'établissement de future thérapie contre le cancer.

Le canal IK_{Ca1} et la surexpression dans le cancer

Dans cette étude, nous avons montré que le canal potassique IK_{Ca1} est surexprimé dans le cancer de la prostate humaine par comparaison aux taux d'expression de ce canal dans les tissus prostatiques non-cancéreux. Cette surexpression du canal IK_{Ca1} dans le cancer de la prostate peut survenir pour plusieurs raisons : (1) soit le nombre de gènes codant pour le canal IK_{Ca1} est augmenté (amplification génique), (2) soit son promoteur est hypométhylé, ou alors (3) les taux des facteurs de transcription régulant son expression varient (augmentation/diminution).

En ce qui concerne l'amplification génique, il s'agit d'un phénomène physiologique lors de la croissance embryonnaire (du moins dans les espèces inférieures), permettant l'adaptation de la synthèse protéique à la croissance de l'animal. De nombreuses études ont montré que la région chromosomique où se situe le gène codant pour le canal IK_{Ca1} (**19q13.2**) était amplifié dans différents cas de cancers tel que le cancer de l'ovaire où les régions 19q13.1 et 19q13.2 sont amplifiées signifiant que les gènes présents dans cette région peuvent contribuer à la

cancérogénèse (Thompson et al., 1996). La même région chromosomique de la localisation du gène *KCNN4* (codant le canal IK_{Ca1}) est amplifiée dans le cas de glioblastome (Beghini A et al., 2002).

L'étude de l'ADN (des mammifères et autres vertébrés) montre qu'un nucléotide sur cent peut porter un groupement méthyle supplémentaire toujours attaché au carbone 5 d'une cytosine (résidu méthylcytosine). Chez les mammifères, pratiquement tous les résidus méthylcytosine font partie d'un dinucléotide 5'-CpG-3' situé dans des séquences qui ont tendance à se concentrer dans des zones riches en GC. Ces zones sont souvent localisées dans des régions du promoteur contrôlant l'expression des gènes. La plupart des données suggèrent que la méthylation de l'ADN sert à maintenir un gène à l'état inactif sans être elle-même un mécanisme d'inactivation. L'hypométhylation globale des cellules cancéreuses a été notée dès le milieu des années 1980 (Feinberg AP et al., 2004).

Quelques gènes hypométhylés ont été décrits : la famille MAGE (antigènes tumoraux des mélanomes) ou la cycline D2. L'hyper-méthylation d'ilots CpG au niveau des promoteurs reste le moyen d'inactivation de nombreux anti-oncogènes : Rb, les gènes BRCA1 (breast cancer 1), PTEN (« phosphatase and tensin homologue », gène suppresseur de tumeurs) et bien d'autres. Il se pourrait que dans le cas du cancer de la prostate, le gène codant pour le canal IK_{Ca1} soit hypométhylé, induisant une augmentation de son expression, ou que les facteurs de transcription régulant son expression soit eux-mêmes méthylés (hyperméthylation pour les facteurs de transcription répresseurs et hypométhylation pour les facteurs de transcription activateurs).

La troisième hypothèse expliquant l'augmentation du canal IK_{Ca1} serait que dans les cancers, le taux d'expression **des facteurs de transcription** potentiellement impliqués dans le niveau d'expression de ce canal subisse une modification. L'analyse du promoteur codant le canal IK_{Ca1} a permis de mettre en évidence un certain nombre de sites potentiels de fixation de nombreux facteurs de transcription dont certains sont dits « répresseurs » alors que d'autres sont dits « activateurs ». (Figure 41 et 42).

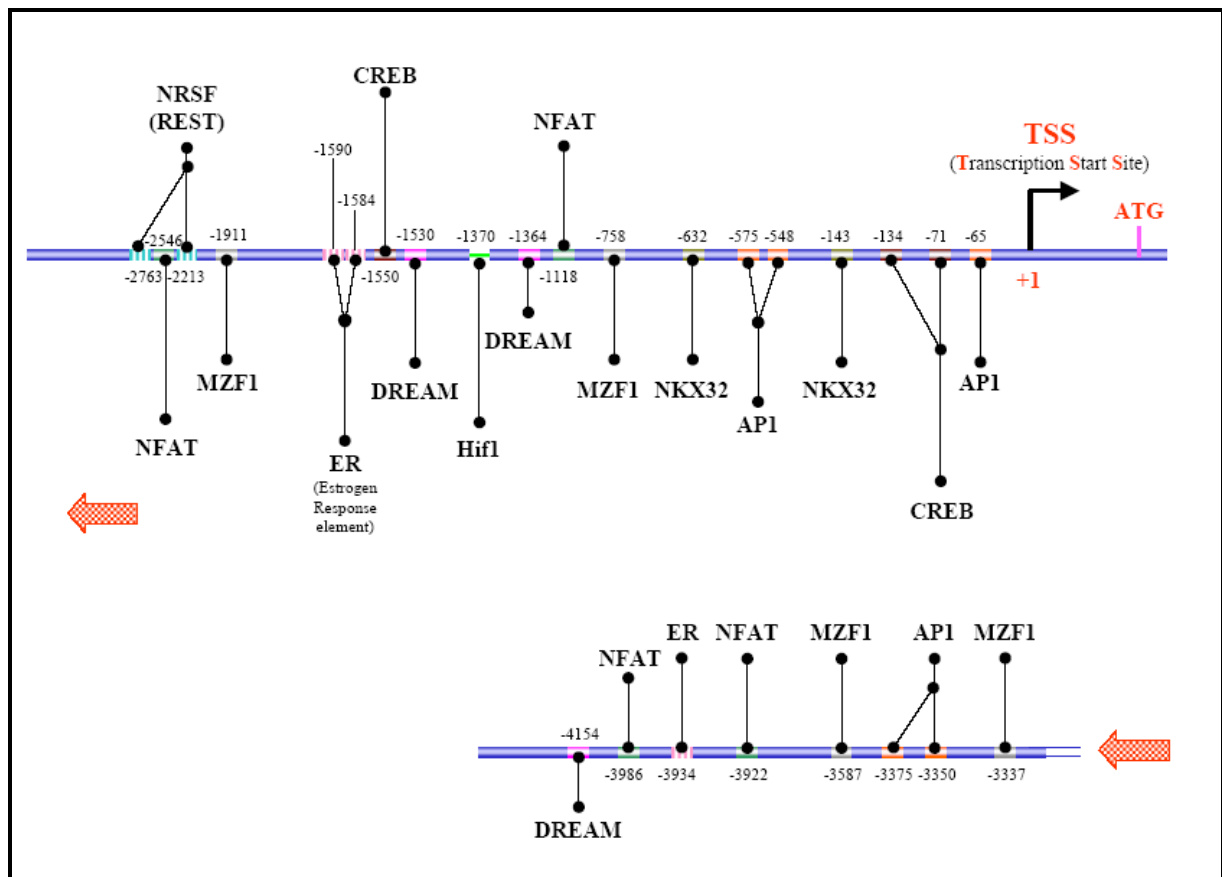


Figure 41: Séquences de fixation des différents facteurs de transcription au niveau de la séquence promotrice du gène codant pour le canal potassique calcium-activé IK_{Ca1} .

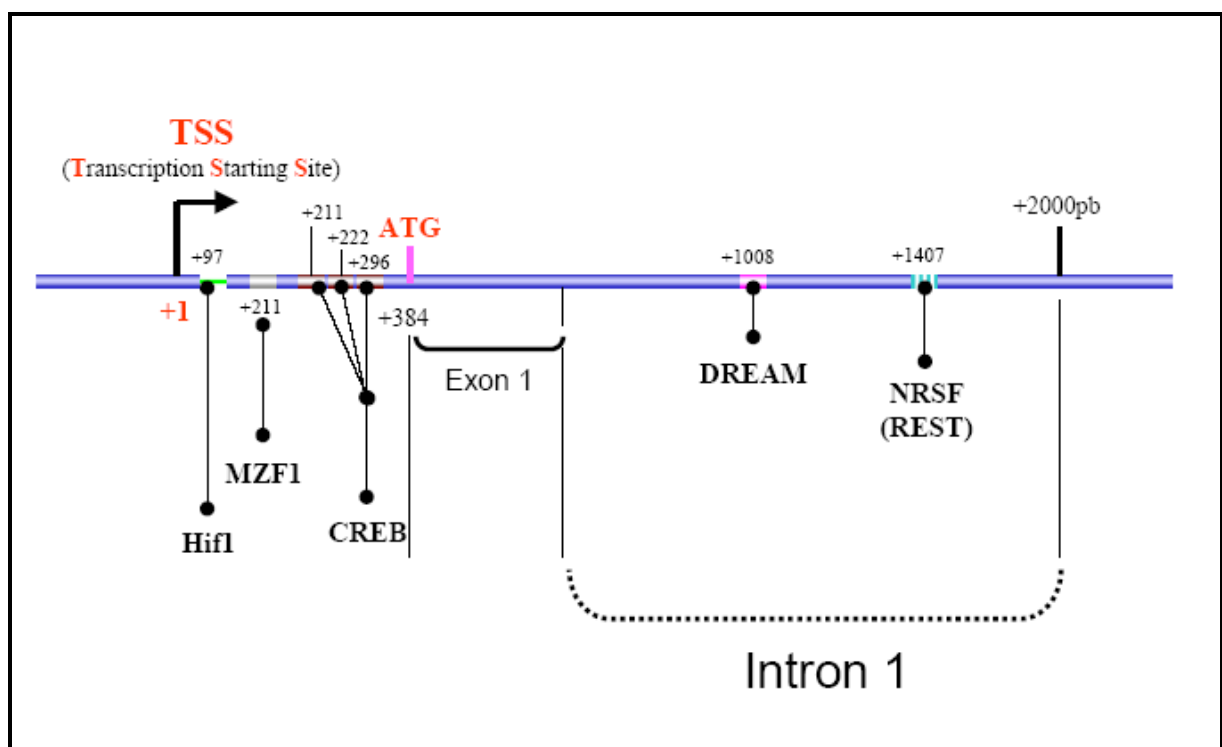


Figure 42: Séquences de fixations des différents facteurs de transcription au niveau l'intron n°1 du gène codant pour le canal potassique calcium-activé IK_{Ca1} .

- Les facteurs de transcription répresseur

Parmi les facteurs de transcription régulant l'expression du canal IK_{Ca1} , on trouve les facteurs qui répriment son expression. Parmi les facteurs de transcription réprimant l'expression de IK_{Ca1} , on trouve **REST** (RE-1 silencing transcription factor; ou NRSF) (Schoenherr and Anderson, 1995). Une étude récente a même défini REST comme étant un gène suppresseur de tumeur (Westbrook et al., 2005). Les gènes suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines inhibitrices de la division cellulaire ou régulant la différenciation post-mitotique et l'orientation irréversible vers la voie de l'apoptose. La mutation de ces gènes, liée cette fois à une perte de fonction, entraîne l'arrêt du contrôle du cycle cellulaire. Les cellules ayant un matériel génétique modifié auront ainsi la capacité d'échapper à la mort cellulaire programmée et se diviseront de façon anarchique et indépendante de l'organisme. Il a été démontré que la délétion du gène codant pour REST était associée à un grand nombre de tumeurs tel que le cancer du côlon. La séquence promotrice mais également le premier exon du canal IK_{Ca1} contiennent une séquence consensus permettant la fixation de REST (ou NRSF) et permettant ainsi la répression de son expression. Sachant que l'activation du canal IK_{Ca1} joue un rôle important dans prolifération cellulaire, logiquement il a été montré l'expression de REST diminue au cours de la prolifération cellulaire parallèlement à l'augmentation de l'expression et de la fonctionnalité du canal IK_{Ca1} (Cheong et al., 2005). Il se pourrait que le facteur de transcription REST soit inhibé dans le cas du cancer de la prostate ne pouvant pas jouer son rôle de répresseur du canal IK_{Ca1} . L'expression du canal IK_{Ca1} serait alors augmentée stimulant la prolifération cellulaire. On pourrait émettre l'hypothèse que l'expression de IK_{Ca1} soit dans des conditions physiologiques réprimée et lorsque la cellule se transforme en cellule cancéreuse, l'expression de répresseur comme REST diminue entraînant une augmentation du canal IK_{Ca1} . Toutefois, nous avons montré que l'inhibition complète du gène IK_{Ca1} , par l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique (TRAM-34) ou par l'emploi de siARN spécifique, induit la différenciation des cellules LNCaP. Le même résultat est obtenu lorsque l'on surexprime le facteur de transcription REST dans les cellules LNCaP démontrant que le canal IK_{Ca1} empêche la différenciation cellulaire. Or lorsque l'on surexprime en même temps le canal IK_{Ca1} et le facteur de transcription REST dans les cellules LNCaP, la différenciation observée lors de la surexpression de REST est inhibée. Ces résultats indiquent que REST régule l'expression d' IK_{Ca1} pour induire la différenciation neuroendocrine. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que lorsque IK_{Ca1} est fonctionnel, le taux de calcium est particulièrement élevé dans la cellule.

Dans la séquence promotrice du gène IK_{Ca1} , un site de fixation pour un autre répresseur a été mis en évidence: **MZF1** (myeloid zinc finger gene). Ce facteur de transcription régule l'expression de nombreux gènes tels que CD34 (Hromas et al., 1996a; Hromas et al., 1996b) et lorsque l'on surexprime MZF1 au niveau de cellules souches embryonnaires, on inhibe le développement hématopoïétique (Perrotti et al., 1995). Ce facteur est montré pour être réprimé dans le cancer de sein. Il est également impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire de certains types de cancers tels que les leucémies (Gaboli et al., 2001). L'expression du canal IK_{Ca1} pourrait également être régulée par le facteur de transcription MZF1.

Une autre famille de facteurs de transcription répresseurs dont le site de fixation existe dans le promoteur du gène d' IK_{Ca1} est celle des **Nkx**. Il a été démontré que ces facteurs de transcription réprimaient la transcription d'un certain nombre de gènes. Par ailleurs, il a été démontré que le taux d'expression d'un certain nombre de ces facteurs de transcription répresseurs est diminué dans le cancer (Lengner et al., 2005). Par ailleurs, une étude récente a montré que l'expression d'un canal potassique (HERG) intervenant dans la prolifération cellulaire, était modulé négativement par un facteur de transcription de la famille Nkx : le facteur répresseur NKx3.1 (Lin et al., 2007). **Il est possible que le taux d'expression des facteurs de cette famille soit diminué dans le cancer de la prostate humaine conduisant à une surexpression du canal IK_{Ca1} dans ces cancers. En effet, il a été démontré que le facteur de transcription Nkx3.1 est diminué dans le cancer de la prostate humaine (Lei Q et al., 2006).**

Il est bien établi que le calcium libre intracellulaire peut moduler l'expression génique en favorisant ou en inhibant l'action des facteurs de transcription activateurs ou inhibiteurs. En effet, un facteur de transcription répresseur et modulé par le calcium intracellulaire a été récemment caractérisé : le facteur de transcription **DREAM** (Downstream regulatory element antagonist modulator). Ce facteur de transcription reste fixé à l'ADN dans les conditions de faibles $[Ca^{2+}]_i$. Une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induit la séparation de ce facteur de l'ADN permettant ainsi la transcription. La séquence promotrice du gène codant pour IK_{Ca1} possède une séquence pour la fixation de DREAM appelé DRE. Celle-ci n'est efficace que si elle est placée en aval du site de démarrage, ce qui est le cas pour le canal IK_{Ca1} . Il se pourrait qu'en absence de calcium, DREAM réprime IK_{Ca1} . Lorsqu'il y a une augmentation de calcium intracellulaire, DREAM se détache de l'ADN et permet ainsi l'expression du canal IK_{Ca1} .

- Les facteurs de transcription activateurs

Parmi les facteurs de transcription régulant l'expression du canal IK_{Ca1} , on trouve les facteurs qui activent son expression. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la variation du taux intracellulaire de calcium peut moduler l'expression de nombreux gènes tel que le gène codant pour le canal IK_{Ca1} . En plus du facteur de transcription DREAM, les effets du calcium intracellulaire peuvent être médiés par 2 autres facteurs de transcription : les facteurs NFAT, et la protéine CREB en passant par l'activation de la CaMKII.

La famille des protéines **NFAT** (**n**uclear **f**actor of **a**ctivated **T** cell) est composée de cinq membres : NFAT_{c1}, NFAT_{c2}, NFAT_{c3}, NFAT_{c4} et NFAT₅. Ils sont régulés par une voie de signalisation intracellulaire dépendante du calcium sauf NFAT₅ qui est insensible au calcium. Une augmentation du calcium intracellulaire sera intégrée par la calmoduline, protéine ubiquitaire capable de s'associer aux ions calcium, qui activera la calcineurine (une sérine/thréonine phosphatase) capable de déphosphoryler les régions riches en sérines des facteurs NFAT permettant ainsi leur translocation nucléaire et l'activation de la transcription des gènes cibles. Il est bien établi que les membres de la famille NFAT contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Caetano et al., 2002). Une étude a montré que le facteur de transcription NFAT est surexprimé dans le cancer du pancréas augmentant la potentiel oncogénique des cellules cancéreuses par l'activation du proto-oncogène c-myc (Buchholz et al., 2006). Or il s'avère que le canal IK_{Ca1} , dont l'expression est régulée par NFAT, est surexprimé dans le cas de cancer du pancréas (Chou et al., 2008). Il est donc probable que le facteur NFAT soit impliqué dans la surexpression du canal potassique IK_{Ca1} dans ce cancer.

L'expression du canal IK_{Ca1} pourrait également être régulée par le facteur de transcription **CREB** (**c**AMP **r**esponse **e**lement-**b**inding). C'est une protéine ubiquitaire qui agit comme un facteur de transcription en interagissant directement avec l'ADN par sa fixation aux éléments de réponse, dits séquences CRE (pour cAMP response element), induisant la transcription de certains gènes. Le CRE est un élément de réponse crucial dans les cascades moléculaires impliquant l'AMPc. C'est une protéine essentielle de la régulation de l'expression des gènes. Plusieurs voies de signalisations cellulaires peuvent mener à l'activation de la protéine CREB. Le facteur commun étant l'AMPc qui via l'activation de la Protéine Kinase A (PKA) va mener à la phosphorylation de CREB, donc à son activation. Le facteur CREB va par la suite recruter des co-activateurs transcriptionnels qui de par leurs fonctions acétyltransférases vont faciliter sa fixation à l'ADN et induire la transcription de

gènes. Des études ont montré que le facteur de transcription CREB est surexprimé dans de nombreux cas de cancer tel que la leucémie (Pigazzi et al., 2007).

Parmi ces facteurs de transcription qui stimuleraient l'expression du canal IK_{Ca1} , on trouve le facteur de transcription **AP-1** (activating protein 1). Ce facteur de transcription est formé de deux protéines : c-jun et c-fos. Ces deux protéines sont des gènes de réponse rapide à la stimulation par les facteurs de croissance. Le produit des oncogènes nucléaires c-jun et c-fos sont connus pour lier l'ADN et moduler la transcription des gènes cibles. Ils peuvent rapidement entraîner une transformation cellulaire des fibroblastes lorsqu'ils sont surexprimés. Or une étude récente a montré que l'inhibition de c-jun bloque la croissance des cellules cancéreuses de sein (*in vitro* et *in vivo*) par un arrêt du cycle en phase G1 (Shen et al., 2008). D'autre part, une étude a mis en évidence la surexpression de c-jun dans la lignée cancéreuse de sein MCF-7 (Smith et al., 1999). Il a également été montré que c-fos avait un rôle crucial dans la prolifération des cellules cancéreuses de sein (MCF-7) (Lu et al., 2005) et qu'il s'associait avec le facteur de transcription NFAT formant un complexe stable (Macian et al., 2001). Ces résultats permettent de suggérer que le facteur de transcription AP-1 régule la transcription de gènes nécessaires à la croissance des cellules cancéreuses prostatiques.

Au niveau de la séquence promotrice du gène codant pour le canal IK_{Ca1} , il a été mis en évidence un site de réponse aux œstrogènes : **ER** (Estrogen Response element). Les œstrogènes jouent un rôle important dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. L'action des œstrogènes se fait *via* le récepteur des œstrogènes α ($RE\alpha$), un facteur de transcription qui complexé à l'oestradiol, est capable de moduler la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose ou la différenciation cellulaire. La présence de ce site de réponse aux œstrogènes dans le promoteur du gène codant pour IK_{Ca1} impliquerait une éventuelle régulation de son expression par les œstrogènes. Or de nombreuses études ont montré que l'exposition prolongée aux œstrogènes est un facteur qui favorise le développement de certaines tumeurs tel que le cancer de la prostate. Une étude récente a montré que le gène *Slo* (KCNMA1), codant pour le canal potassique calcium-activé BK_{Ca} , est augmenté par les œstrogènes par l'intermédiaire de leurs fixations sur le site ER (ER1 et ER2) présent au niveau de la séquence promotrice (Kundu et al., 2007). De même il a été mis en évidence que le 17β -estradiol augmente le courant potassique calcium-activé dans les cellules nerveuses (Nishimura et al., 2008). Or des études préliminaires ont mis en évidence que l'expression du canal IK_{Ca1} serait régulée par les stéroïdes dans les cellules LNCaP (**Figure 43**). En effet, lorsque les cellules sont incubées dans un milieu de culture dépourvu de stéroïdes, l'expression du canal IK_{Ca1} diminue (8h à

48h de traitement). Par la suite, lorsque l'on ajoute (au bout des 48h de traitement sans stéroïdes) de la dihydrotestostérone (DHT) ou du 17 β -estradiol (E₂) au milieu de culture pendant 24h, on observe une augmentation de l'expression du canal IK_{Ca1} suite au traitement avec l'E₂ et non avec la DHT. Ces résultats sont cohérents avec la présence du site de fixation ER et donc d'une régulation de ce canal par les stéroïdes (E₂). Suite à ces résultats préliminaires, il serait intéressant de confirmer cette régulation de l'expression du canal IK_{Ca1} par le 17 β -estradiol notamment par l'étude au niveau protéique (western blot).

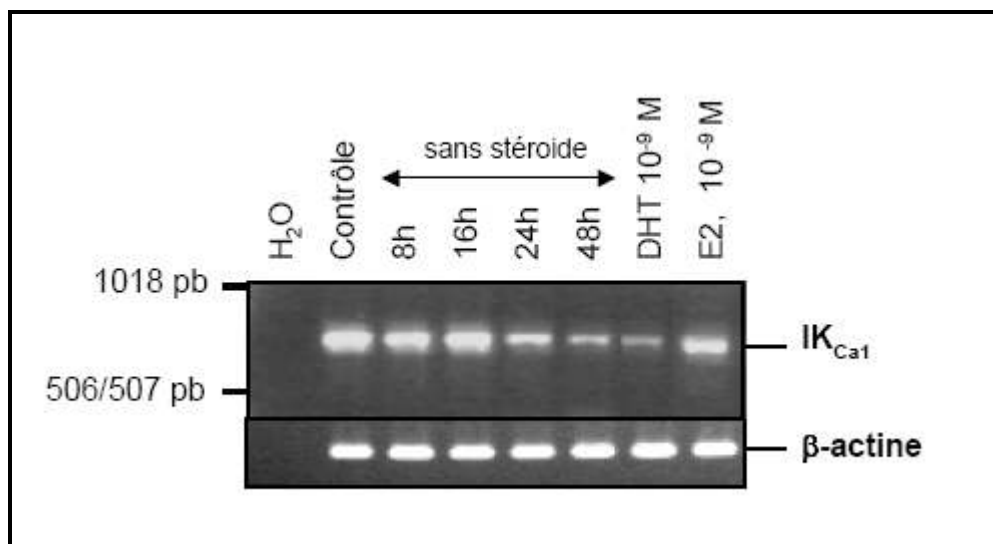


Figure 43: Variation de l'expression du canal potassique IK_{Ca1} sous l'influence des stéroïdes (œstradiol, E₂ et dihydrotestostérone, DHT).

D'autre part, l'utilisation d'anti-hormones, qui sont des inhibiteurs compétitifs de l'œstradiol, bloque la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques. Malheureusement les patients traités par ce type de molécules développent systématiquement une résistance aux thérapies anti-hormonales. Les facteurs de croissance, tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'IGF-I (Insulin Growth Factor), qui entraînent une activation du RE α de manière ligand indépendante, pourraient être responsable de l'apparition de ces phénomènes de résistance. L'étude des voies d'activation du RE α par ces facteurs de croissance est donc importante. Or des résultats préliminaires tendent à montrer que l'expression du canal IK_{Ca1} est également régulée par l'IGF (**Figure 45**).

L'analyse du promoteur du gène codant le canal IK_{Ca1} montre la présence d'un site de fixation pour le facteur de transcription **Hif1** (hypoxia-inducible factor 1) dont la séquence de fixation est appelé HRE (**H**ypoxia **R**esponse **E**lement). Le facteur de transcription Hif1 est une protéine hétérodimérique composée d'une sous-unité α dont l'expression est fortement

régulée, en particulier par l'oxygène, et d'une sous-unité β exprimée de façon constitutive. Dans une situation normale, l'Hif1- α se dégrade par hydroxylation et est détruite, tandis que dans une situation de manque d'oxygène comme c'est le cas de l'hypoxie, l'Hif1- α ne se dégrade pas, mais en s'associant à l'Hif1- β , elle donne lieu à l'Hif1 qui active la transcription de différents gènes. Parmi les 70 gènes cibles de Hif1 identifiés à ce jour, sont retrouvés des gènes impliqués dans l'angiogenèse (Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire (VEGF)), l'apoptose (NIP3, NIX), résistance aux drogues (MDR1), l'érythropoïèse (Erythropoïétine (EPO)), la prolifération, le tonus vasculaire (Endothéline 1), la motilité (TGF α), la survie cellulaire (IGF2, IGF-BP2, TGF α) et IK_{Ca1} dont nous avons précédemment montré son rôle dans la prolifération cellulaire. De récentes recherches ont mis en évidence la participation de Hif1 dans les tumeurs cancéreuses humaines. Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette surexpression de Hif1, tel que la création d'une région hypoxique intratumorale qui stabilise Hif1- α et induit le complexe Hif1 ou bien des mutations par gain de fonction qui activent certains facteurs de croissance induisant aussi la transcription de Hif1- α . On sait que dans un cancer la forte prolifération des cellules demande beaucoup d'énergie, et donc d'oxygène, pour progresser. Lorsqu'il y a diminution de l'oxygène intratumorale, la protéine Hif1 aide alors à la création de nouveaux vaisseaux sanguins pour l'apport d'oxygène. Par conséquent, il a été démontré que l'absence de la protéine Hif1 entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, du chimiotactisme, du réarrangement cellulaire et de l'angiogénèse au niveau de la tumeur. L'expression du canal IK_{Ca1} pourrait donc également être régulée par le facteur de transcription Hif1. Le canal IK_{Ca1}, *via* sa régulation par Hif1, pourrait jouer un rôle dans l'échappement tumoral en favorisant la prolifération cellulaire dans une condition d'hypoxie. Des études préliminaires nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression du canal IK_{Ca1} dans les cellules ayant subi un traitement à la déféroxamine (DFX), un chélateur d'oxygène (**Figure 44**). Or lorsque l'on ajoute à la DFX un inhibiteur du facteur de transcription SP1, la mithramycine, on n'observe pas de variation de l'expression du canal IK_{Ca1}. Mais lorsque l'on combine DFX avec la mithramycine, on observe une forte diminution du taux d'expression du canal IK_{Ca1} par rapport à un traitement uniquement avec DFX. Un travail a mis en évidence une interaction entre les facteurs de transcription Hif1 et SP1 (Elsner et al., 2002).

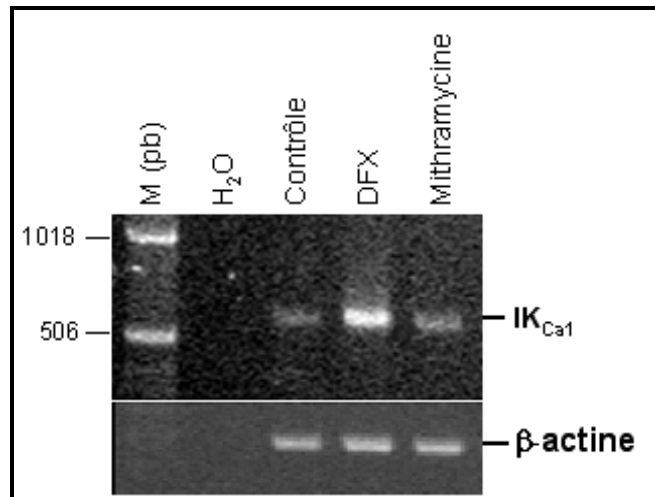


Figure 44 : Variation de l'expression du canal potassique IK_{Ca1} suite à l'induction de l'hypoxie (déférioxamine (DFX) un chélateur d'oxygène).

Toutefois, un autre type de régulation de la sous-unité Hif1- α , indépendant de l'oxygène, a été démontré. Certaines cellules en multiplication rapide, sous l'effet de facteurs de croissance, ont une expression accrue de Hif1- α malgré un environnement correctement pourvu en oxygène. Alors que l'hypoxie augmente l'expression de Hif1- α , donc les quantités de Hif1, dans tous les types cellulaires en diminuant la vitesse de dégradation de la sous-unité α , la stimulation de la croissance cellulaire par des facteurs trophiques permet d'accroître la quantité de protéine Hif1- α en augmentant la traduction de son ARNm. Une mutation entraînant une perte de fonction du suppresseur de tumeur PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome Ten) observée dans trois lignées différentes de glioblastomes conduit à une accumulation de la protéine Hif1- α en normoxie et à une augmentation des transcrits des gènes cibles de Hif1 (Zundel et al., 2000). Cette diminution d'expression de PTEN a également été montrée dans le cas du cancer de la prostate (McCall et al., 2008) où ce facteur de transcription est hyperméthylé. Récemment, un autre cas de figure a été décrit, indiquant que Hif1 pouvait s'accumuler en normoxie sans qu'il y ait mutation de suppresseur de tumeur ni stimulation particulière des cellules par des facteurs trophiques. Le gène *hif1 α* chez l'homme est constitué de 15 exons et est transcrit en un ARNm qui peut être épissé. Il n'est pas rare de trouver dans les cellules humaines, outre l'ARNm de pleine longueur (15 exons), des variants d'épissage, en particulier un variant ayant perdu l'exon 11 (Chun YS et al., 2003). La perte de cet exon entraîne la synthèse d'une protéine plus courte (HIF1 $\alpha^{\Delta 11}$) à laquelle manque une séquence d'une quarantaine d'acides aminés. Le reste de la protéine demeure inchangé, en particulier la partie transactivatrice C-terminale strictement conservée. L'absence de l'exon 11 permet à la protéine HIF1 $\alpha^{\Delta 11}$ d'échapper en normoxie à la

dégradation malgré l'hydroxylation des deux prolines, mais également de conserver une activité transcriptionnelle équivalente à celle de la protéine HIF1 α entière (Chun YS et al., 2003). De nombreuses études montrent clairement que cette protéine est surexprimée dans de nombreux cancers chez l'homme (Hui et al., 2002; Talks et al., 2000). Une corrélation significative entre la quantité de protéine Hif1- α et la mortalité des patients a été décrite dans les cancers du col de l'utérus, de l'utérus (endomètre), du cerveau (oligodendrogliomes), du sein, de la prostate et les cancers oropharyngés. Les nombreuses études réalisées à ce jour indiquent clairement que l'accumulation de Hif1- α dans les cellules tumorales est généralement favorable à la progression maligne. Il est donc possible que ce facteur le promoteur du gène du canal potassique IK_{Ca1}, possédant un site de fixation pour Hif1, joue un rôle dans cette tumorigenèse sans doute en favorisant la prolifération des cellules tumorales. De même, les facteurs trophiques ayant le pouvoir de stimuler l'expression de Hif1 α sont nombreux avec par exemple l'IGF1 (insuline-like growth factor 1) ou l'EGF (epidermal growth factor). Or sachant que la prolifération des cellules prostatiques est modulée par les facteurs de croissance comme l'IGF (Insulin-like Growth Factor) et l'EGF (Epidermal Growth Factor), il est possible que ces facteurs modulent également l'expression du canal IK_{Ca1} dans ces cellules cancéreuses. Il serait possible que ces facteurs de croissance augmentent l'expression du canal IK_{Ca1} dont le fonctionnement permettrait une augmentation de l'entrée de calcium favorisant le remplissage des réserves intracellulaires de calcium conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire. Les études préliminaires menées sur les cellules cancéreuses LNCaP ont montré que l'expression du canal IK_{Ca1} est stimulée par l'IGF alors que l'EGF ne présentait aucun effet inducteur sur l'expression de ce canal dans ces cellules (**Figure 45**). Il est probable donc que dans le cancer, le facteur de transcription Hif1 soit surexprimé activant le facteur de croissance IGF qui lui-même induirait l'expression du canal potassique IK_{Ca1}. Par la suite, nous souhaitons confirmer la modulation de l'expression du canal IK_{Ca1} par l'IGF et notamment explorer l'éventuelle implication dans ce mécanisme du facteur de transcription Hif1.

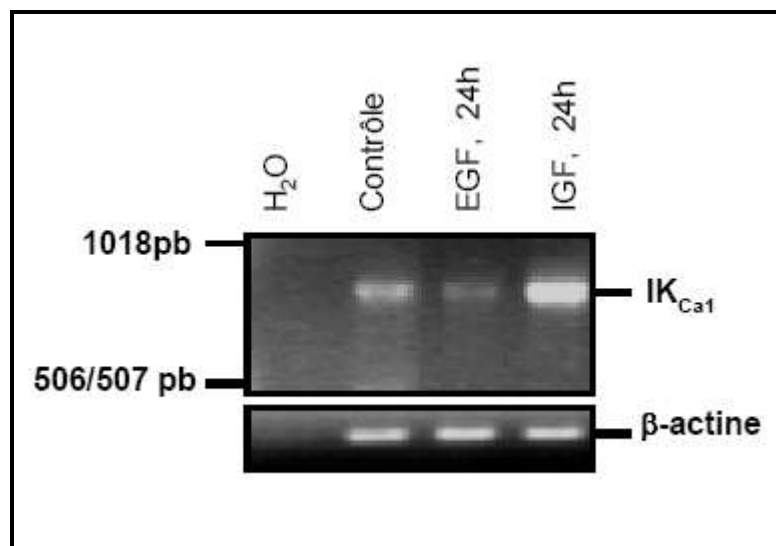


Figure 45 : Variation de l'expression du canal potassique IK_{Ca1} sous l'influence du facteur de croissance IGF (Insulin Growth Factor).

Le canal IK_{Ca1} et la différenciation neuroendocrine

Comme mentionné précédemment, mes derniers travaux ont permis d'observer une corrélation entre l'absence d'expression du canal potassique calcium-activé IK_{Ca1} et la différenciation neuroendocrine au niveau des cellules androgéno-dépendantes LNCaP (Lallet-Daher et al., en cours de soumission).

En effet, suite à l'addition du 1-EBIO (1-ethyl-2-benzimidazolinone, activateur du canal IK_{Ca1}) au milieu de culture des cellules LNCaP, nous avons constaté qu'au lieu de stimuler la prolifération, cet agent pharmacologique diminuait la prolifération et d'induisait un phénotype différencié chez les cellules LNCaP. Or une étude a montré que le 1-EBIO diminue la prolifération des kératinocytes (lignée HaCaT) accompagné d'une diminution de l'expression du canal potassique IK_{Ca1} dans ces cellules (Koegel et al., 2003). D'autres études menées chez les LNCaP nous ont permis d'affirmer que le 1-EBIO diminue fortement également l'expression du canal IK_{Ca1} dans les cellules LNCaP. Nous avons donc voulu savoir si l'inhibition du canal IK_{Ca1} était suffisante pour induire la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP. Actuellement, nous utilisons deux méthodes pour induire la différenciation neuroendocrine : l'incubation des cellules dans un milieu dépourvu de stéroïdes ou dans un milieu contenant de l'APMc (Adenosine (3',5'-cyclophosphate cAMP))/IBMx (1-Methyl-3-isobutylxanthine). Nous avons donc traité ces cellules avec le TRAM-34, inhibiteur pharmacologique du canal IK_{Ca1} , et avec des siARN spécifiques. Dans les deux cas, on observe une diminution de la prolifération accompagnée de l'apparition des

caractères (prolongements, corps cellulaire qui s'arrondissent) et des marqueurs (NSE et CgA) caractéristiques de la différenciation neuroendocrine.

Or nous avons mentionné précédemment que l'expression du canal IK_{Ca1} est régulée par de nombreux facteurs de transcription dont le facteur de transcription répresseur REST qui réprime son expression. Nous avons donc surexprimé REST dans les cellules LNCaP afin d'observer ses effets sur la différenciation neuroendocrine. Il s'avère que lorsque REST est surexprimé, on induit un phénotype différencié chez les cellules LNCaP n'ayant subi aucun traitement (ni déprivation de stéroïdes, ni présence d'AMPc/IBMX). Inversement, lorsque l'on inhibe l'expression de REST, par l'utilisation de ShREST, l'expression du canal IK_{Ca1} n'est plus réprimée et même l'utilisation d'AMPc/IBMX ne permet pas d'induire la différenciation neuroendocrine chez les cellules LNCaP. Nos précédents résultats avaient mis en évidence que l'inhibition du canal IK_{Ca1} induisait l'arrêt des cellules en phase G1 et l'accumulation de la protéine $p21^{Cip1}$ connue pour être impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation neuroendocrine. Or nous savons que dans les cellules cancéreuses prostatiques, le facteur de transcription CREB est surexprimé. Toutefois dans le cas de la différenciation neuroendocrine, CREB ne pourrait pas induire l'expression du canal IK_{Ca1} suite à l'augmentation de l'expression de REST contrairement à son action sur le gène codant le canal calcique $\alpha1-H$. Ce canal calcique $\alpha1-H$ possède dans son promoteur le site de fixation pour le facteur de transcription CREB. D'après ces données, au cours de la différenciation neuroendocrine, CREB serait augmenté induisant la transcription du canal calcique $\alpha1-H$. Son effet sur la transcription du canal IK_{Ca1} serait bloqué par l'effet répresseur de REST. Ces résultats suggèrent que le canal IK_{Ca1} joue un rôle primordial dans le processus de différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP.

Le canal IK_{Ca1} et la voie de transduction de l'endothéline-1 (ET-1) dans les cellules cancéreuses prostatiques

Nous avons précédemment montré l'implication du canal IK_{Ca1} dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC-3. Cet effet passe par la modulation de l'entrée de calcium par l'intermédiaire d'un couplage avec le canal calcique TRPV6. Dans le but démontrer cet effet, nous avons utilisé un composé non physiologique : la thapsigargine. Or nous avons souhaité étudier l'implication du canal IK_{Ca1} dans les effets d'un agoniste naturel connu pour stimuler la prolifération cellulaire mais aussi pour jouer un rôle dans la cancérogenèse. Nous avons testé de nombreux peptides tel que la spermine, la bradykinine et

l'endothéline. Seul l'endothéline a eu un effet sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC-3. **La surexpression du canal IK_{Ca1} pourrait intervenir dans les voies de transduction de l'ET-1.**

Les résultats de cette étude montrent l'expression au niveau ARNm des deux récepteurs de l'endothéline-1, le récepteur de type A ($ET_A R$) et de type B ($ET_B R$) au niveau des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendante (LNCaP) et androgéno-indépendante (PC-3). Ces travaux ont montré que le calcium intracellulaire joue un rôle important dans les effets mitogéniques de l'ET-1 sur les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et PC-3. L'activation de la voie calcium/phosphoinositol contribue à cet effet. Il a été montré que l'ET-1 possède une action mitogénique et pro-angiogénique. Ce peptide agit également comme un régulateur autocrine/paracrine de la croissance de nombreuses tumeurs (Grant et al., 2003 ; Nelson et al., 2003). L'implication de l'ET-1 dans la biologie du cancer de la prostate a été suggéré pour la première fois par l'équipe de Kondo et collaborateurs en 1994 (Kondo S et al., 1994). **Nelson et collaborateurs (Nelson JB et al., 1996) ont montré dans un premier temps que l'expression de l'ET-1 était corrélée avec la progression du cancer de la prostate et que dans un second temps, l'ET-1 stimulait la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques via le récepteur de type A ($ET_A R$).** La même équipe a démontré que le gène codant le récepteur de type B ($ET_B R$) serait méthylé avec la progression du cancer de la prostate entraînant une diminution d'expression de ce récepteur (Nelson JB et al., 1997) et il a été démontré que l' $ET_B R$ était préférentiellement impliqué dans le processus apoptotique alors que l' $ET_A R$ serait impliqué dans le processus prolifératif.

Les résultats de notre étude montrent que l'ET-1 induit une augmentation de la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines et ceci de façon dose dépendante (10^{-12} à 10^{-7} M) avec un effet maximum à une concentration de 10^{-7} M. De plus fortes concentrations induisent des stimulations insignifiantes qui peuvent s'expliquer par une diminution de l'expression des récepteurs à l'ET-1 après leurs stimulations par de fortes concentrations d'ET-1. Nos résultats montrent que la prolifération spontanée des cellules LNCaP et PC-3 est inhibée par l'emploi d'antagoniste du $ET_A R$, le BQ123, et non par l'antagoniste du $ET_B R$, le BQ788 suggérant que l'ET-1 agit sur la prolifération cellulaire des cellules LNCaP et PC-3 de façon autocrine et par l'intermédiaire du $ET_A R$. Ces résultats sont concordants avec des études antérieures qui montrent que majoritairement $ET_A R$ est impliqué dans les effets mitogéniques induits par l'ET-1 (Nelson et al., 2003). La fonction spécifique d' $ET_B R$ dans les cellules cancéreuses prostatiques reste peu étudiée. Des études ont montré que $ET_B R$ est inactif dans la majorité des cancers de la prostate (Nelson JB et al., 1997) et que son

expression diminue dans les cas de cancers avancés (Nelson JB et al., 1996). Si ce canal intervient préférentiellement dans l'apoptose, il est logique que son expression diminue dans les cas de cancers où l'apoptose est inhibé.

L'ET-1 et le ET_AR n'agissent pas seulement sur la prolifération cellulaire de façon directe mais agissent également de façon indirecte en synergie avec des facteurs de croissance connues pour jouer un rôle dans le progression du cancer tel que l'EGF et ses récepteurs (Rosano et al., 2007 ; Grant et al., 2007).

L'ET-1 est connue pour exercer son action par l'intermédiaire de ces deux récepteurs (ET_AR et ET_BR) exprimés dans de nombreuses tumeurs. L'effet de ces récepteurs est différent suivant les tumeurs. De nombreuses études ont montré que l'ET-1 a un effet mitogène médié par ET_AR dans les tumeurs épithéliales alors que dans les tumeurs non épithéliales, ce même effet est médié par ET_BR (Rosano et al., 2007 ; Bagnato et al., 2003).

Il a été démontré que le $[Ca^{2+}]_i$ est un second messager ubiquitaire qui médie l'action mitogénique de l'ET-1 dans de nombreuses cellules telles que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Komuro et al., 1988). Toutefois, peu d'études ont été menées afin de connaître le rôle de ce $[Ca^{2+}]_i$ dans les effets mitogéniques de l'ET-1 au niveau des cellules cancéreuses et plus particulièrement dans le cas du cancer de la prostate. De façon évidente, nous avons voulu connaître les effets de l'ET-1 sur le $[Ca^{2+}]_i$ et explorer son rôle dans les effets mitogéniques de l'ET-1 chez les cellules LNCaP et PC-3.

Il est parfaitement établi que l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ET-1/ET_AR est due à la fois à un flux entrant de calcium *via* les canaux calcique voltage dependants et également par une vidange des stocks calciques *via* la voie PLC/phosphoinositol. Pour déterminer le rôle du $[Ca^{2+}]_i$ dans la prolifération induite par l'ET-1 dans les cellules LNCaP et PC-3 et afin d'identifier la voie calcique responsable, nous avons utilisé des inhibiteurs de la voie PLC : U73122 et son analogue inactif U73344. L'augmentation de la prolifération cellulaire et du $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ET-1 (10^{-7} M) sont significativement réduits par l'utilisation de l'U73122, un inhibiteur spécifique de la PLC, par rapport à l'utilisation de l'U73344, un inhibiteur inactif de la PLC, qui n'induit aucune diminution de la prolifération cellulaire et de l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$. Ces résultats sont concordants avec l'importance du signal calcique dans le voie de signalisation de l'ET-1 chez les cellules musculaires lisses (Komuro et al., 1988), chez les cellules cancéreuses de l'ovaire (Bagnato et al., 1995) et les cellules cancéreuses pulmonaires (Zhang et al., 2008).

Des études préliminaires menées sur les effets à long terme de l'endothéline-1 (ET-1) nous ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'amplitude de l'entrée capacitive

induite par l'ET-1. Cette augmentation de l'amplitude de l'entrée capacitive de Ca^{2+} est accompagnée par une modification de l'intervention des canaux $\text{K}^+ \text{Ca}^{2+}$ -activés dans la CCE induite par l'ET-1. En effets, l'utilisation des siARN ciblant les canaux BK_{Ca} et IK_{Ca1} a montré que dans les cellules prétraitées à l'ET-1 (100nM), le canal IK_{Ca1} joue un rôle majeur dans la CCE induite par l'ET-1 alors que le canal BK_{Ca} ne participe plus dans cette réponse calcique à l'ET-1 dans les cellules LNCaP. En effet, nous avons montré que c'était essentiellement le canal potassique BK_{Ca} qui était impliqué dans la CCE induite par l'ET-1. Lorsque les cellules LNCaP sont traitées sur de longues périodes (72h) avec l'ET-1 (10^{-7} M), c'est le canal IK_{Ca1} qui intervient de façon majoritaire dans la CCE induite par l'ET-1 (Figure 46). On observe une augmentation de l'expression du canal IK_{Ca1} corrélée à une diminution du facteur de transcription REST. Or des études ont montré que le taux d'ET-1 augmente dans les cas de cancers. Il se pourrait donc que cette augmentation du taux d'ET-1 induise une augmentation de l'expression du canal IK_{Ca1} dans cancer de la prostate humaine.

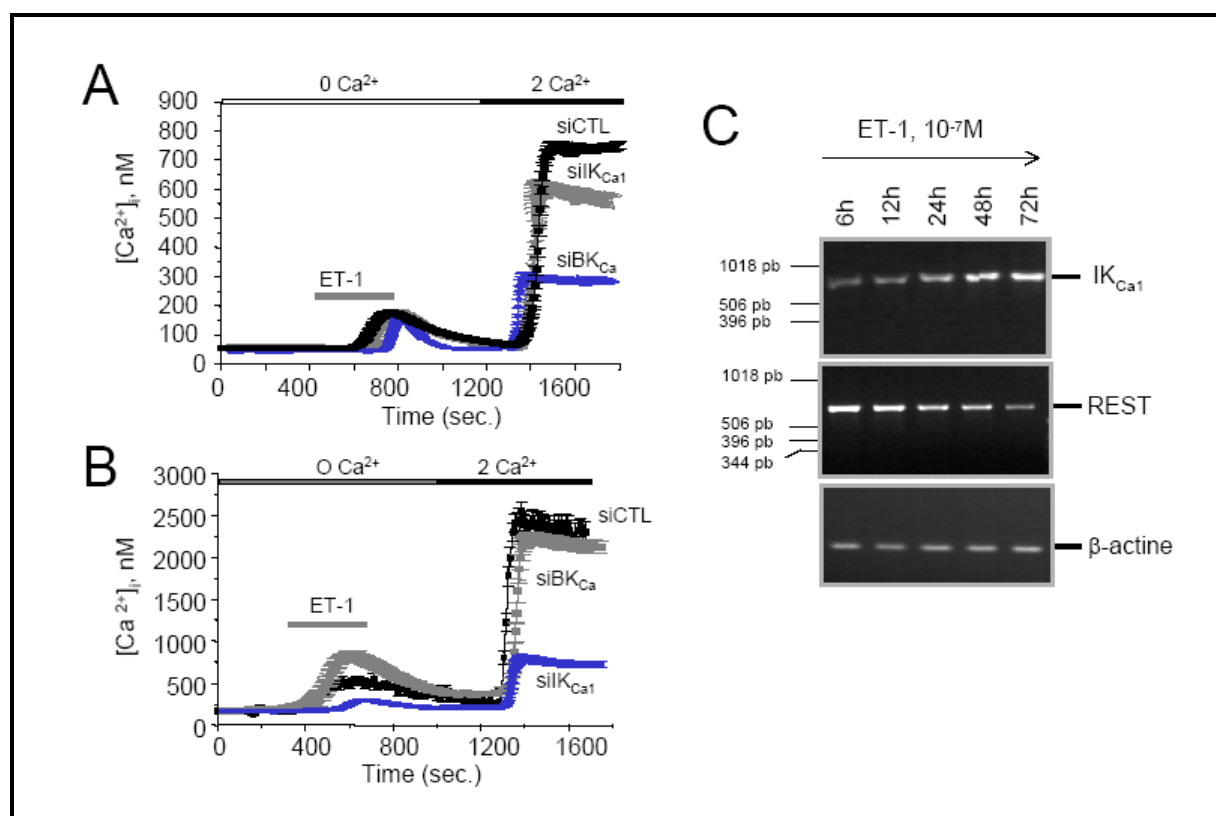


Figure 46: Modification du profil d'expression du canal potassique calcium-activé IK_{Ca1} sans (A) ou suite (B) à un traitement à long terme avec l'ET-1. (C) Le traitement des cellules LNCaP avec l'ET-1 (100nM) induit une augmentation de l'expression du canal IK_{Ca1} parallèlement à une diminution de l'expression du facteur de transcription REST.

Nous envisageons d'étudier la relation entre l'expression du canal IK_{Ca1} et les facteurs de transcription qui régule son expression. Par exemple, il serait intéressant de voir si le

facteur de transcription Hif1 n'est pas muté, le rendant actif même en absence d'hypoxie, ou si le facteur de transcription PTEN, qui réprime Hif1, ne serait pas inhibé induisant la surexpression du canal IK_{Ca1} dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Nous envisageons de poursuivre l'étude de la régulation de l'expression du canal IK_{Ca1} par les stéroïdes (17β -oestradiol) et par les facteurs de croissance (IGF) ainsi que l'implication du canal IK_{Ca1} dans les effets à long terme de l'endothéline-1 sur les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Nos résultats ont ainsi permis de mettre en évidence que dans le cas du cancer de la prostate, le canal IK_{Ca1} est surexprimé inversement au canal calcique $\alpha1$ -H et au facteur de transcription REST. Par contre, dans le cas de la différenciation neuroendocrine, le canal IK_{Ca1} est réprimé inversement au canal calcique $\alpha1$ -H et au facteur de transcription REST. Grâce à ces résultats il serait possible d'envisager à long terme, de cartographier les tumeurs cancéreuses par rapport à l'analyse de l'expression conjointe du canal IK_{Ca1} , $\alpha1$ -H et du facteur de transcription REST. Des études par immunofluorescence sur des coupes des tissus des patients atteints de cancer de la prostate humaine sont en cours afin de déterminer si l'expression du canal calcique de type T, du canal potassique IK_{Ca1} et du facteur de transcription REST peuvent constituer un complexe de marqueurs pour les cancers neuroendocrines de la prostate humaine en phase d'androgéno-indépendance.

En effet, les changements génétiques au cours du début et de la progression du cancer de la prostate échappent toujours aux scientifiques. Aujourd'hui, pour la première fois, les chercheurs ont identifié le profil spécifique de l'expression génétique des cellules souches du cancer de la prostate, comportant d'importantes implications pour les traitements futurs. Des résultats parus récemment ont révélé que 581 gènes sont différemment exprimés dans certaines cellules du cancer de la prostate, mettant en exergue plusieurs voies importantes quant à la biologie des cellules souches cancéreuses et offrant des cibles aux nouvelles approches chimio-préventives et chimiothérapeutiques (Birnie R et al., 2008).

CONCLUSION

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié l'expression, la fonctionnalité et implication dans la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate humaine des canaux potassiques calcium-activés (IK_{Ca1}). Nous avons également montré que l'activation du canal IK_{Ca1} favorise l'entrée de calcium *via* le canal TRPV6 (CaT1) impliqué dans le courant SOC dans les cellules LNCaP. De plus, par des études de co-immunoprécipitations, nous avons montré que canal IK_{Ca1} et le canal calcique TRPV6 sont associés formant ainsi un complexe moléculaire fonctionnel permettant l'entrée de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques afin de permettre la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. **Ces canaux ioniques pourraient donc constituer des cibles pharmacologiques dans le traitement du cancer de la prostate humaine.**

Dans le cadre de ces études, nous avons également montré que l'ARNm du canal IK_{Ca1} étaient surexprimés dans le cancer de la prostate comparé aux tissus prostatiques non-cancéreux. Au cours de cette thèse, en collaboration avec le service d'urologie de l'hôpital Saint Vincent de Paul, Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine (Professeur B. Maurois, Professeur P. Gosset), nous avons mené des études comparatives d'expression protéique du canal IK_{Ca1} sur des coupes des tissus des patients atteints de cancer ou d'une hyperplasie bénigne de la prostate humaine. **Ces études menées par immunofluorescence ont montré une expression préférentielle de la protéine IK_{Ca1} dans les tissus prostatiques atteints d'un cancer de la prostate humaine.** De plus, les études préliminaires ont montré une expression croissante de ce canal en fonction des grades de cancers de la prostate.

Au cours de ces travaux, en utilisant des méthodologies (agents pharmacologiques et siARN spécifique) permettant d'inhiber ou de supprimer le canal IK_{Ca1} , nous avons observé l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques accompagnée d'une augmentation de la protéine $p21^{Cip1}$ et de l'apparition du phénotype des cellules différenciées. Suite à cette observation, nous avons montré que la suppression (stratégie siARN) ou l'inhibition du canal (TRAM-34, clotrimazole) était accompagnées de l'expression des marqueurs des cellules neuroendocrines (Neurone specific enolase, NSE et Chromogranine A, CgA) et l'expression protéique et fonctionnel d'un canal calcique de type T. Nous avons également montré que l'induction de la différenciation par le traitement des cellules par de l'AMPc ou par incubation des cellules dans un milieu dépourvu des stéroïdes est accompagnée de la suppression de l'expression du canal potassique IK_{Ca1} . L'étude du mécanisme régissant ces remaniements d'expression des canaux ioniques dans la

différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques a montré que le facteur de transcription NRSF (*neuron-restrictive silencer factor*) (ou REST), connu pour son rôle de répresseur de la transcription du gène d' IK_{Ca1} , était impliqué et que son expression augmentait lors de la différenciation neuroendocrine. Par des études de surexpression ou suppression, nous avons clairement établi le lien entre l'induction de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses, l'expression de ce facteur de transcription, l'expression du canal calcique de type T et la suppression de l'expression du canal potassique de type IK_{Ca1} .

Ces études montrent clairement le rôle central joué par le canal IK_{Ca1} pour diriger les cellules dans le sens de la prolifération par sa présence et dans le sens de la différenciation neuroendocrine par son absence En effet, nous avons montré qu'une augmentation de l'expression de ce canal induit une augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques alors que son inhibition, par des inhibiteurs pharmacologiques (TRAM-34 et clotrimazole) et des siARN, induit la différenciation neuroendocrine dans les cellules LNCaP. Il semblerait donc que dans des conditions normales, ce canal soit faiblement exprimé. Au cours de l'apparition du cancer, on aurait une augmentation de l'expression de ce canal qui favoriserait la prolifération des cellules cancéreuses. Une inhibition de ce canal induirait un arrêt du cycle cellulaire et l'apparition de la différenciation neuroendocrine.

Finalement, nous avons mené des études de l'intervention du canal IK_{Ca1} , mais également du canal potassique calcium-dépendant BK_{Ca} et des canaux calciques de type TRP dans les voies de transduction des facteurs protéiques, tel que l'Endothéline 1 (ET-1), connues pour induire une prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. De nombreuses données suggèrent que la voie de l'ET-1 participe à la croissance et à la progression de tumeurs telles que le cancer de la prostate (Nelson et al., 1995, 1996, 1997, Wang et al., 2006) où ET-1 est surexprimé mais aussi qu'elle favoriserait la métastase osseuse comme décrit dans le cas du cancer du sein (Wulfig et al., 2003) et des métastases osseuses (Guisse et al., 2000. Yin et al., 2003). Actuellement, une nouvelle génération d'agents pharmacologiques (Atrasentan) ciblant les récepteurs à l'ET-1, $ET_A R$, sont en cours d'essais thérapeutiques et/ou de développement pour traiter les cancer en général et le cancer de la prostate (Harland et al., 1998 ; Jimeno et al., 2006). La connaissance des voies de transduction de l'ET-1 conduisant à la prolifération cellulaire et l'implication du canal potassique IK_{Ca1} dans les effets de l'ET-1

permettra d'envisager le développement des thérapies ciblant le canal IK_{Ca1} dans le but de traiter le cancer de la prostate au même titre que les antagonistes du récepteur à l'ET-1 actuellement en cours d'essais cliniques pour l'utilisation dans le traitement des cancers de la prostate humaine.

ANNEXE

Milieu de culture pour les bactéries

Milieu « TB » :

- Tryptone (pancreatic digest of casein): 12 g/L
- Yeast extract: 24 g/L
- Glycérol: 0,4 %
- K_2HPO_4 : 12,54 g/L
- KH_2PO_4 : 2.31 g/L

Milieu « LB »:

- Tryptone: 10 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 10 g/L

Agar:

- Tryptone: 10 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 5 g/L
- Agar: 15 g/L

S.O.C. medium:

- Tryptone: 20 g/L
- Yeast extract: 5 g/L
- NaCl: 0,5 g/L
- KCl: 0,18 g/L
- $MgCl_2$: 0,95 g/L
- Glucose: 20 mM

X-Gal:

- 25 mg/ml dans du DMF (Dimethyl Formamide).

IPTG:

- 100 mg/ml dans H_2O .

Solutions pour bactéries compétentes

Solution 1:

- 30 mM Acétate de Potassium (CH_3COOK)
- 100 mM Chlorure de Rubidium ($RbCl_2$)
- 10 mM de Chlorure de Calcium ($CaCl_2$)
- 50 mM de Chlorure de Magnésium ($MgCl_2$)
- 15% Glycérol
- Régler le pH à 5,8 avec de l'acide acétique avant l'ajout de glycérol.
- Filtrer la solution finale sous PSM avec des filtres de 0,22 μm .

Solution 2:

- 10 mM MOPS
- 75 mM de Chlorure de Calcium ($CaCl_2$)
- 10 mM de Chlorure de Rubidium ($RbCl_2$)
- 15% Glycérol
- Régler le pH à 6,5 avant l'ajout de glycérol.
- Filtrer la solution finale sous PSM avec des filtres de 0,22 μm .

Solutions pour extraction d'ARN

Solution D

- Thiocyanate de Guanidine : 4 M
- Acétate de Sodium : 25 mM
- N-lauroyl Sarcosine : 0,5 %
- Régler le pH à 7,0 avec solution Tris-base 1 M
- Avant l'emploi, ajouter le β -mercapto éthanol à 0,7 %

Acétate de sodium (3M) :

- Acide acétique : 50 ml à 5 M
- Acétate de sodium : 30 ml à 5 M

Solution de Phénol/Chloroform/AIA :

- Phénol : 83,33 %
- Chloroform : 16,33 %
- Isoamyl alcool : 0,33 %

Solutions pour extraction de protéines

Tampon RIPA:

- Triton X100 : 1 %
- Sodium Déoxycholate : 1 %
- Tampon Phosphate ($\text{PO}_4 \text{Na}_2/\text{K}$): 10 mM
- pH: 7,2

Tampon pour extraction de microsomes:

- HEPES, pH 7,0 : 10 mM
- KCl: 10 mM
- EGTA: 0,05 mM
- DTT : 0,05 mM

Solution de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) :

- SDS : 1 %
- NaOH : 0,2 M

Solutions pour immunofluorescence

Solution de PBS:

- NaCl : 8 g/L
- KCl : 0,2 g/L
- Na_2HPO_4 : 1,44 g/L
- KH_2PO_4 : 0,24 g/L
- pH: 7,4

Para Formaldéhyde (PFA) :

- Tampon Phosphate ($\text{PO}_4 \text{Na}_2/\text{K}$): 200 mM
- PFA: 10 %

Solution de saturation pour immunofluorescence:

- PBS
- Gélatine de poisson : 1,2 %

- Glycine : 0,2 M
- Tween 20 : 0,05 %

Solutions pour électrophorèse

Tampon TBE:

- Tris HCl : 108 g/L
- Acide Borique : 55 g/L
- EDTA : 9,3 g/L
- pH: 8,3

Tampon TAE:

- Tris HCl : 108 g/L
- Acide Acétique : 55 g/L
- EDTA : 9,3 g/L
- pH: 8,3

Solution « run-SDS » pour électrophorèse SDS-PAGE :

- Tris : 25 mM
- Glycine : 192 mM
- SDS : 0,1 %
- pH : 8,3 – 8,5

Solution de transfert :

- Tris : 48 mM
- Glycine : 39 mM
- SDS : 0,037 %
- Méthanol : 10 %

Tampons de charge et marqueurs de poids moléculaire

Tampon de charge pour protéine (Tampon de Laemmli) :

- Tris pH 6,8 : 62,5 mM
- SDS : 2 %
- Saccharose : 10 %
- Bleu de Bromophénol : 0,001 %
- DTT : 100 mM

Tampon de charge pour ADN :

- 50µl de bleu concentré (0,25% de Bleu de Bromophenol + 0,25% de xylène cyanate dans H₂O).
- 950µl d'un mix Tris-HCl 10mM finale (pH 8) + 40% glycérol.

Marqueur de poids moléculaire pour ADN/ARN :

- Tampon « bleu » de charge : 15 %
- Marqueur « 1 kb » : 10 %

Autres solutions

Tampon TE (Tris-EDTA):

- Tris HCl : 1,21 g/L
- EDTA : 0,37 g/L
- pH: 7,9

Bleu de Coomassie:

- Bleu de Coomassie R250 : 0,02%
- Isopropanol : 25%
- Acide acétique : 10%

HBSS :

- NaCl : 140 mM
- KCl : 5 mM
- CaCl₂ : 2 mM
- MgCl₂: 2
- Na₂HPO₄ : 0.3 mM
- KH₂PO₄ : 0.4 mM
- NaHCO₃ : 4mM
- Glucose: 5 mM
- HEPES: 10 mM (pH 7.3, osmolality 330mosmol/l)

PUBLICATIONS

1. **H. Lallet-Daher**, M. Roudbaraki, A. Bavencoffe, P. Mariot, F. Gackière, G. Bidaux, R. Urbain, P. Gosset, P. Delcourt, L. Fleurisse, C. Slomianny, E. Dewailly, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma and N. Prevarskaya (2008). Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate human prostate cancer cells proliferation *via* a close control of calcium entry *Oncogene* (accepté pour publication)

2. **H. Lallet-Daher**, F. Gackière, P. Mariot, R. Urbain, P. Gosset, P. Delcourt, L. Fleurisse, C. Slomianny, E. Dewailly, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma, N. Prevarskaya and M. Roudbaraki (2008). Intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels (IK_{Ca1}) regulate the neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells: Involvement of REST transcription factor *Cell Death and Differentiation* (En cours de soumission).

3. **H. Lallet-Daher**, P. Delcourt, B. Mauroy, JL Bonnal, R. Skryma, N. Prevarskaya and M. Roudbaraki (2008). Involvement of Ca^{2+} -activated K^+ channels in Endothelin-1-induced human prostate cancer cells proliferation. *Cell Calcium* (En cours de soumission).

4. M. Roudbaraki, **H. Lallet-Daher**, G. Bidaux, P. Mariot, R. Urbain, C. Slomianny, E. Dewailly, B. Mauroy, JL Bonnal, P. Gosset, F. Carpentier, P. Delcourt, R. Skryma and N. Prevarskaya (2008). Overexpression of hEAG1 potassium channel as a marker of the human prostate cancer. *Journal of Clinical Investigation* (En cours de soumission).

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, G.W., Butler, M.H., Bendahhou, S., Dalakas, M.C., Ptacek, L.J. and Goldstein, S.A. (2001) MiRP2 forms potassium channels in skeletal muscle with Kv3.4 and is associated with periodic paralysis. *Cell*, **104**, 217-231.
- Abbott, G.W., Sesti, F., Splawski, I., Buck, M.E., Lehmann, M.H., Timothy, K.W., Keating, M.T. and Goldstein, S.A. (1999) MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*, **97**, 175-187.
- Abdul, M. and Hoosein, N. (2002a) Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett*, **186**, 99-105.
- Abdul, M. and Hoosein, N. (2002b) Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep*, **9**, 961-964.
- Abrahamsson, P.A. (1999a) Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer*, **6**, 503-519.
- Abrahamsson, P.A. (1999b) Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate*, **39**, 135-148.
- Abrahamsson, P.A., Dizeyi, N., Alm, P., di Sant'Agnese, P.A., Deftos, L.J. and Aumuller, G. (2000) Calcitonin and calcitonin gene-related peptide in the human prostate gland. *Prostate*, **44**, 181-186.
- Abrahamsson, P.A., Wadstrom, L.B., Alumets, J., Falkmer, S. and Grimelius, L. (1986) Peptide-hormone- and serotonin-immunoreactive cells in normal and hyperplastic prostate glands. *Pathol Res Pract*, **181**, 675-683.
- Akerstrom, G., Hellman, P., Hessman, O., Segersten, U. and Westin, G. (2005) Parathyroid glands in calcium regulation and human disease. *Ann N Y Acad Sci*, **1040**, 53-58.
- Ambudkar, I.S., Ong, H.L., Liu, X., Bandyopadhyay, B.C. and Cheng, K.T. (2007) TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium*, **42**, 213-223.
- Ammon, J., Karstens, J.H. and Rathert, P. (1977) [TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma (author's transl)]. *Urologe A*, **16**, 73-82.
- An, W.F., Bowlby, M.R., Betty, M., Cao, J., Ling, H.P., Mendoza, G., Hinson, J.W., Mattsson, K.I., Strassle, B.W., Trimmer, J.S. and Rhodes, K.J. (2000) Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*, **403**, 553-556.
- Angelova, E., Beuvon, F., Leonard, N., Chaverot, N., Varlet, P., Couraud, P.O., Dumas-Duport, C. and Cazaubon, S. (2005) Functional endothelin ET B receptors are selectively expressed in human oligodendrogliomas. *Brain Res Mol Brain Res*, **137**, 77-88.
- Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M. and Demaurex, N. (2002) Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Biol Chem*, **277**, 46696-46705.
- Aumuller, G., Leonhardt, M., Janssen, M., Konrad, L., Bjartell, A. and Abrahamsson, P.A. (1999) Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology*, **53**, 1041-1048.
- Aumuller, G., Leonhardt, M., Renneberg, H., von Rahden, B., Bjartell, A. and Abrahamsson, P.A. (2001) Semiquantitative morphology of human prostatic development and regional distribution of prostatic neuroendocrine cells. *Prostate*, **46**, 108-115.
- Babaian, R.J., Miyashita, H., Evans, R.B. and Ramirez, E.I. (1992) The distribution of prostate specific antigen in men without clinical or pathological evidence of prostate cancer: relationship to gland volume and age. *J Urol*, **147**, 837-840.
- Bach, G. (2001) Mucopolidosis type IV. *Mol Genet Metab*, **73**, 197-203.
- Bading, H., Hardingham, G.E., Johnson, C.M. and Chawla, S. (1997) Gene regulation by nuclear and cytoplasmic calcium signals. *Biochem Biophys Res Commun*, **236**, 541-543.

- Bagnato, A. and Rosano, L. (2007) Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer progression: a crucial role for the endothelin axis. *Cells Tissues Organs*, **185**, 85-94.
- Bagnato, A., Rosano, L., Spinella, F., Di Castro, V., Tecce, R. and Natali, P.G. (2004) Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer Res*, **64**, 1436-1443.
- Bagnato, A. and Spinella, F. (2003) Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, **14**, 44-50.
- Bagnato, A., Spinella, F. and Rosano, L. (2005) Emerging role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr Relat Cancer*, **12**, 761-772.
- Baltogiannis, D., Giannakopoulos, X., Charalabopoulos, K. and Sofikitis, N. (2004) Monotherapy in advanced prostate cancer: an overview. *Exp Oncol*, **26**, 185-191.
- Bandell, M., Story, G.M., Hwang, S.W., Viswanath, V., Eid, S.R., Petrus, M.J., Earley, T.J. and Patapoutian, A. (2004) Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, **41**, 849-857.
- Basrai, D., Kraft, R., Bollensdorff, C., Liebmann, L., Benndorf, K. and Patt, S. (2002) BK channel blockers inhibit potassium-induced proliferation of human astrocytoma cells. *Neuroreport*, **13**, 403-407.
- Battistini, B., Chailler, P., D'Orleans-Juste, P., Briere, N. and Sirois, P. (1993) Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, **14**, 385-399.
- Benham, C.D., Gunthorpe, M.J. and Davis, J.B. (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium*, **33**, 479-487.
- Berridge, M.J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M.J. (1995) Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, **17**, 491-500.
- Berridge, M.J. (1996) Microdomains and elemental events in calcium signalling. *Cell Calcium*, **20**, 95-96.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Lipp, P. (1998) Calcium--a life and death signal. *Nature*, Vol. 395, pp. 645-648.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. and Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 517-529.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000a) Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science*, **287**, 1604-1605.
- Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D. (2000b) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 11-21.
- Binggeli, R. and Weinstein, R.C. (1986) Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *J Theor Biol*, **123**, 377-401.
- Birnbaumer, L., Yildirim, E., Abramowitz, J. and Yildirim, E. (2003) A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium*, **33**, 419-432.
- Blaschko, H., Comline, R.S., Schneider, F.H., Silver, M. and Smith, A.D. (1967) Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*, **215**, 58-59.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T.C., Mihatsch, M.J., Kunzelmann, K. and Bubendorf, L. (2007) KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene*, **26**, 2525-2534.
- Bodding, M., Fecher-Trost, C. and Flockerzi, V. (2003) Store-operated Ca²⁺ current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **278**, 50872-50879.
- Bodding, M., Wissenbach, U. and Flockerzi, V. (2002) The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca²⁺ sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem*, **277**, 36656-36664.

- Bogoyevitch, M.A., Glennon, P.E., Andersson, M.B., Lazou, A., Marshall, C.J. and Sugden, P.H. (1993a) Acidic fibroblast growth factor or endothelin-1 stimulate the MAP kinase cascade in cardiac myocytes. *Biochem Soc Trans*, **21**, 358S.
- Bogoyevitch, M.A., Glennon, P.E. and Sugden, P.H. (1993b) Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett*, **317**, 271-275.
- Boldrini, L., Gisfredi, S., Ursino, S., Faviana, P., Lucchi, M., Melfi, F., Mussi, A., Basolo, F. and Fontanini, G. (2005) Expression of endothelin-1 is related to poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Eur J Cancer*, **41**, 2828-2835.
- Bonkhoff, H., Stein, U. and Remberger, K. (1994) Multidirectional differentiation in the normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate: simultaneous demonstration of cell-specific epithelial markers. *Hum Pathol*, **25**, 42-46.
- Bras-Silva, C. and Leite-Moreira, A.F. (2008) Myocardial effects of endothelin-1. *Rev Port Cardiol*, **27**, 925-951.
- Bruggemann, A., Stuhmer, W. and Pardo, L.A. (1997) Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 537-542.
- Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., Gress, T.M. and Ellenrieder, V. (2006) Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *Embo J*, **25**, 3714-3724.
- Cabrera, T.M., Levy, A.D., Li, Q., Van de Kar, L.D. and Battaglia, G. (1994) Cocaine-induced deficits in ACTH and corticosterone responses in female rat progeny. *Brain Res Bull*, **34**, 93-97.
- Caetano, M.S., Vieira-de-Abreu, A., Teixeira, L.K., Werneck, M.B., Barcinski, M.A. and Viola, J.P. (2002) NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *Faseb J*, **16**, 1940-1942.
- Carrion, A.M., Link, W.A., Ledo, F., Mellstrom, B. and Naranjo, J.R. (1999) DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*, **398**, 80-84.
- Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeit, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I. and Julius, D. (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*, **288**, 306-313.
- Chang, C.P., Dworetzky, S.I., Wang, J. and Goldstein, M.E. (1997) Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res Mol Brain Res*, **45**, 33-40.
- Chemin, J., Monteil, A., Bourinet, E., Nargeot, J. and Lory, P. (2001) Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophys J*, **80**, 1238-1250.
- Cheong, A., Bingham, A.J., Li, J., Kumar, B., Sukumar, P., Munsch, C., Buckley, N.J., Neylon, C.B., Porter, K.E., Beech, D.J. and Wood, I.C. (2005) Downregulated REST transcription factor is a switch enabling critical potassium channel expression and cell proliferation. *Mol Cell*, **20**, 45-52.
- Cherubini, A., Taddei, G.L., Crociani, O., Paglierani, M., Buccoliero, A.M., Fontana, L., Noci, I., Borri, P., Borrani, E., Giachi, M., Becchetti, A., Rosati, B., Wanke, E., Olivotto, M. and Arcangeli, A. (2000) HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. *Br J Cancer*, **83**, 1722-1729.

- Chiao, J.W., Moonga, B.S., Yang, Y.M., Kancherla, R., Mittelman, A., Wu-Wong, J.R. and Ahmed, T. (2000) Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer*, **83**, 360-365.
- Chinery, R., Brockman, J.A., Peeler, M.O., Shyr, Y., Beauchamp, R.D. and Coffey, R.J. (1997) Antioxidants enhance the cytotoxicity of chemotherapeutic agents in colorectal cancer: a p53-independent induction of p21WAF1/CIP1 via C/EBPbeta. *Nat Med*, **3**, 1233-1241.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Chou, C.C., Lunn, C.A. and Murgolo, N.J. (2008) KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert Rev Mol Diagn*, **8**, 179-187.
- Chua, B.H., Krebs, C.J., Chua, C.C. and Diglio, C.A. (1992) Endothelin stimulates protein synthesis in smooth muscle cells. *Am J Physiol*, **262**, E412-416.
- Clapham, D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell*, **80**, 259-268.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W. and Strubing, C. (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, **2**, 387-396.
- Clapham, D.E. and Sneyd, J. (1995) Intracellular calcium waves. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **30**, 1-24.
- Clines, G.A., Mohammad, K.S., Bao, Y., Stephens, O.W., Suva, L.J., Shaughnessy, J.D., Jr., Fox, J.W., Chirgwin, J.M. and Guise, T.A. (2007) Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol*, **21**, 486-498.
- Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E. and Rudy, B. (1999) Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 233-285.
- Cohen, R.J., Gleason, G. and Haffjee, Z. (1991) Neuro-endocrine cells--a new prognostic parameter in prostate cancer. *Br J Urol*, **68**, 258-262.
- Cohen, R.J., Gleason, G., Taylor, L.F., Grundle, H.A. and Naude, J.H. (1993) The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *J Urol*, **150**, 365-368.
- Coiret, G., Matifat, F., Hague, F. and Ouadid-Ahidouch, H. (2005) 17-beta-estradiol activates maxi-K channels through a non-genomic pathway in human breast cancer cells. *FEBS Lett*, **579**, 2995-3000.
- Colombel, M., Gil Diez, S., Radvanyi, F., Buttyan, R., Thiery, J.P. and Chopin, D. (1996) Apoptosis in prostate cancer. Molecular basis to study hormone refractory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, **784**, 63-69.
- Cox, N.R., Morrison, N.E., Sartin, J.L., Buonomo, F.C., Steele, B. and Baker, H.J. (1999) Alterations in the growth hormone/insulin-like growth factor I pathways in feline GM1 gangliosidosis. *Endocrinology*, **140**, 5698-5704.
- Curtin, J.F. and Cotter, T.G. (2003) Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal*, **15**, 983-992.
- Cussenot, O., Villette, J.M., Cochand-Priollet, B. and Berthon, P. (1998) Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl*, **8**, 43-51.
- Cutz, E. (1982) Neuroendocrine cells of the lung. An overview of morphologic characteristics and development. *Exp Lung Res*, **3**, 185-208.
- Datto, M.B., Hu, P.P., Kowalik, T.F., Yingling, J. and Wang, X.F. (1997) The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol*, **17**, 2030-2037.
- Davis, N.S., DiSant'Agnese, P.A., Ewing, J.F. and Mooney, R.A. (1989) The neuroendocrine prostate: characterization and quantitation of calcitonin in the human gland. *J Urol*, **142**, 884-888.

- Day, M.L., Winston, N., McConnell, J.L., Cook, D. and Johnson, M.H. (2001) tiK^+ to K^+ : an embryonic clock? *Reprod Fertil Dev*, **13**, 69-79.
- Deal, K.K., England, S.K. and Tamkun, M.M. (1996) Molecular physiology of cardiac potassium channels. *Physiol Rev*, **76**, 49-67.
- DeLellis, R.A. (2001) The neuroendocrine system and its tumors: an overview. *Am J Clin Pathol*, **115 Suppl**, S5-16.
- den Dekker, E., Hoenderop, J.G., Nilius, B. and Bindels, R.J. (2003) The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium*, **33**, 497-507.
- di Sant'Agnese, P.A. and Cockett, A.T. (1996) Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer*, **78**, 357-361.
- Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L. and Latorre, R. (1998) Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium-sensitive potassium (hSlo) channel. *J Biol Chem*, **273**, 32430-32436.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, **12**, 3499-3511.
- Dolly, J.O. and Parcej, D.N. (1996) Molecular properties of voltage-gated K^+ channels. *J Bioenerg Biomembr*, **28**, 231-253.
- Dolmetsch, R.E. and Lewis, R.S. (1994) Signaling between intracellular Ca^{2+} stores and depletion-activated Ca^{2+} channels generates $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in T lymphocytes. *J Gen Physiol*, **103**, 365-388.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K. and Lewis, R.S. (1998) Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature*, **392**, 933-936.
- Dubois, J.M. and Rouzair-Dubois, B. (2004) The influence of cell volume changes on tumour cell proliferation. *Eur Biophys J*, **33**, 227-232.
- Duncan, R.L., Akanbi, K.A. and Farach-Carson, M.C. (1998) Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin Nephrol*, **18**, 178-190.
- Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Lum-Ragan, J.T., McKay, M.C., Post-Munson, D.J., Trojnecki, J.T., Chang, C.P. and Gribkoff, V.K. (1996) Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci*, **16**, 4543-4550.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.
- Eder, P., Poteser, M. and Groschner, K. (2007) TRPC3: a multifunctional, pore-forming signalling molecule. *Handb Exp Pharmacol*, 77-92.
- El-Deiry, W.S. (2001) Akt takes centre stage in cell-cycle deregulation. *Nat Cell Biol*, **3**, E71-73.
- Elso, C.M., Lu, X., Culiati, C.T., Rutledge, J.C., Cacheiro, N.L., Generoso, W.M. and Stubbs, L.J. (2004) Heightened susceptibility to chronic gastritis, hyperplasia and metaplasia in Kcnq1 mutant mice. *Hum Mol Genet*, **13**, 2813-2821.
- Fang, D. and Setaluri, V. (2000) Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 53-61.
- Farias, L.M., Ocana, D.B., Diaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L.M., Lara, G., Villanueva, L.A., Vargas, C., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Duenas-Gonzalez, A., Perez-Cardenas, E., Pardo, L.A., Morales, A., Taja-Chayeb, L.,

- Escamilla, J., Sanchez-Pena, C. and Camacho, J. (2004) Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res*, **64**, 6996-7001.
- Fauconner, J., Lanner, J.T., Sultan, A., Zhang, S.J., Katz, A., Bruton, J.D. and Westerblad, H. (2007) Insulin potentiates TRPC3-mediated cation currents in normal but not in insulin-resistant mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, **73**, 376-385.
- Feldman, B.J. and Feldman, D. (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 34-45.
- Feldman, S.A. and Eiden, L.E. (2003) The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. *Endocr Pathol*, **14**, 3-23.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M. and Rao, A. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, **441**, 179-185.
- Fetissov, F., Arbeille, B., Buchet, C., Rigal, J. and Lansac, J. (1987) [Malignant mixed mesodermal tumor with endocrine cells of the corpus uteri]. *Ann Pathol*, **7**, 311-314.
- Fioretti, B., Castigli, E., Micheli, M.R., Bova, R., Sciacaluga, M., Harper, A., Franciolini, F. and Catacuzzeno, L. (2006) Expression and modulation of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in glioblastoma GL-15 cells. *Cell Physiol Biochem*, **18**, 47-56.
- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V. and Bonkhoff, H. (2003) Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene*, **22**, 7858-7861.
- Fluchter, S.H., Weiser, R. and Gamper, C. (2007) The role of hormonal treatment in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res*, **175**, 211-237.
- Fong, C.J., Sherwood, E.R., Braun, E.J., Berg, L.A., Lee, C. and Kozlowski, J.M. (1992) Regulation of prostatic carcinoma cell proliferation and secretory activity by extracellular matrix and stromal secretions. *Prostate*, **21**, 121-131.
- Freschi, M., Colombo, R., Naspro, R. and Rigatti, P. (2004) Primary and pure neuroendocrine tumor of the prostate. *Eur Urol*, **45**, 166-169; discussion 169-170.
- Fuessel, S., Sickert, D., Meye, A., Klenk, U., Schmidt, U., Schmitz, M., Rost, A.K., Weigle, B., Kiessling, A. and Wirth, M.P. (2003) Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int J Oncol*, **23**, 221-228.
- Gaboli, M., Kotsi, P.A., Gurrieri, C., Cattoretti, G., Ronchetti, S., Cordon-Cardo, C., Broxmeyer, H.E., Hromas, R. and Pandolfi, P.P. (2001) Mzf1 controls cell proliferation and tumorigenesis. *Genes Dev*, **15**, 1625-1630.
- Garabedian, E.M., Humphrey, P.A. and Gordon, J.I. (1998) A transgenic mouse model of metastatic prostate cancer originating from neuroendocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15382-15387.
- Garcia-Sainz, J.A., Vazquez-Prado, J. and Villalobos-Molina, R. (1999) Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res*, **30**, 449-458.
- Gardos, G. (1958) The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, **30**, 653-654.
- Genazzani, A.A. and Galione, A. (1997) A Ca²⁺ release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. *Trends Pharmacol Sci*, **18**, 108-110.
- Ghanshani, S., Wulff, H., Miller, M.J., Rohm, H., Neben, A., Gutman, G.A., Cahalan, M.D. and Chandy, K.G. (2000) Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem*, **275**, 37137-37149.

- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X. and O'Rourke, S.T. (2006) Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther*, **110**, 103-116.
- Gill, D.L., Waldron, R.T., Rys-Sikora, K.E., Ufret-Vincenty, C.A., Graber, M.N., Favre, C.J. and Alfonso, A. (1996) Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep*, **16**, 139-157.
- Gleason, D.F. and Mellinger, G.T. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*, **111**, 58-64.
- Grant, K., Loizidou, M. and Taylor, I. (2003) Endothelin-1: a multifunctional molecule in cancer. *Br J Cancer*, **88**, 163-166.
- Grimm, C., Kraft, R., Sauerbruch, S., Schultz, G. and Harteneck, C. (2003) Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem*, **278**, 21493-21501.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
- Guilbert, A., Dhennin-Duthille, I., Hiani, Y.E., Haren, N., Khorsi, H., Sevestre, H., Ahidouch, A. and Ouadid-Ahidouch, H. (2008) Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells. *BMC Cancer*, **8**, 125.
- Gunthorpe, M.J., Benham, C.D., Randall, A. and Davis, J.B. (2002) The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci*, **23**, 183-191.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F.J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, **391**, 85-100.
- Heer, R., Collins, A.T., Robson, C.N., Shenton, B.K. and Leung, H.Y. (2006) KGF suppresses $\alpha 2 \beta 1$ integrin function and promotes differentiation of the transient amplifying population in human prostatic epithelium. *J Cell Sci*, **119**, 1416-1424.
- Henshall, S.M., Afar, D.E., Hiller, J., Horvath, L.G., Quinn, D.I., Rasiah, K.K., Gish, K., Willhite, D., Kench, J.G., Gardiner-Garden, M., Stricker, P.D., Scher, H.I., Grygiel, J.J., Agus, D.B., Mack, D.H. and Sutherland, R.L. (2003) Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res*, **63**, 4196-4203.
- Herrero, M., Rodriguez, A. and Cejas, H. (2002) [Prostatic neuroendocrine cells]. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*, **59**, 91-96.
- Hoenderop, J.G., Vennekens, R., Muller, D., Prenen, J., Droogmans, G., Bindels, R.J. and Nilius, B. (2001) Function and expression of the epithelial Ca^{2+} channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol*, **537**, 747-761.
- Hofer, A.M., Curci, S., Machen, T.E. and Schulz, I. (1996) ATP regulates calcium leak from agonist-sensitive internal calcium stores. *Faseb J*, **10**, 302-308.
- Hofmann, T., Chubakov, V., Gudermann, T. and Montell, C. (2003) TRPM5 is a voltage-modulated and Ca^{2+} -activated monovalent selective cation channel. *Curr Biol*, **13**, 1153-1158.
- Homma, M.K., Homma, Y., Namba, M. and Yuasa, Y. (1994) Enhanced phosphoinositide metabolism in colorectal carcinoma cells derived from familial adenomatous polyposis patients. *J Cell Biochem*, **55**, 477-485.
- Hook, V. and Metz-Boutigue, M.H. (2002) Protein trafficking to chromaffin granules and proteolytic processing within regulated secretory vesicles of neuroendocrine chromaffin cells. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 397-405.

- Hough, C.J., Halperin, J.I., Mazorow, D.L., Yeandle, S.L. and Millar, D.B. (1990) Beta-endorphin modulates T-cell intracellular calcium flux and c-myc expression via a potassium channel. *J Neuroimmunol*, **27**, 163-171.
- Hromas, R., Boswell, S., Shen, R.N., Burgess, G., Davidson, A., Cornetta, K., Sutton, J. and Robertson, K. (1996a) Forced over-expression of the myeloid zinc finger gene MZF-1 inhibits apoptosis and promotes oncogenesis in interleukin-3-dependent FDCEP.1 cells. *Leukemia*, **10**, 1049-1050.
- Hromas, R., Davis, B., Rauscher, F.J., 3rd, Klemsz, M., Tenen, D., Hoffman, S., Xu, D. and Morris, J.F. (1996b) Hematopoietic transcriptional regulation by the myeloid zinc finger gene, MZF-1. *Curr Top Microbiol Immunol*, **211**, 159-164.
- Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S. and Worley, P.F. (2006) STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol*, **8**, 1003-1010.
- Huang, Y. and Rane, S.G. (1994) Potassium channel induction by the Ras/Raf signal transduction cascade. *J Biol Chem*, **269**, 31183-31189.
- Hughes, F.M., Jr., Bortner, C.D., Purdy, G.D. and Cidlowski, J.A. (1997) Intracellular K⁺ suppresses the activation of apoptosis in lymphocytes. *J Biol Chem*, **272**, 30567-30576.
- Hui, E.P., Chan, A.T., Pezzella, F., Turley, H., To, K.F., Poon, T.C., Zee, B., Mo, F., Teo, P.M., Huang, D.P., Gatter, K.C., Johnson, P.J. and Harris, A.L. (2002) Coexpression of hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α , carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res*, **8**, 2595-2604.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. and Bryan, J. (1995) Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, **270**, 1166-1170.
- Inoue, R., Jensen, L.J., Shi, J., Morita, H., Nishida, M., Honda, A. and Ito, Y. (2006) Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease. *Circ Res*, **99**, 119-131.
- Isaacs, J.T. (1999) The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol Clin North Am*, **26**, 263-273.
- Jaggard, J.H., Porter, V.A., Lederer, W.J. and Nelson, M.T. (2000) Calcium sparks in smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**, C235-256.
- James, A.F. (2007) Negative inotropic effects of endothelin-1 in mouse cardiomyocytes: evidence of a role for Na⁺-Ca²⁺ exchange. *Br J Pharmacol*, **152**, 417-419.
- Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1997) Voltage-gated and inwardly rectifying potassium channels. *J Physiol*, **505** (Pt 2), 267-282.
- Jensen, B.S., Odum, N., Jorgensen, N.K., Christophersen, P. and Olesen, S.P. (1999) Inhibition of T cell proliferation by selective block of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10917-10921.
- Jimeno, A. and Carducci, M. (2006) Atrasentan: a rationally designed targeted therapy for cancer. *Drugs Today (Barc)*, **42**, 299-312.
- Johnson, D.G. and Walker, C.L. (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **39**, 295-312.
- Jordt, S.E., Bautista, D.M., Chuang, H.H., McKemy, D.D., Zygmunt, P.M., Hogestatt, E.D., Meng, I.D. and Julius, D. (2004) Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, **427**, 260-265.
- Karlsson, E. (2001) The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Curr Mol Med*, **1**, 727-732.

- Kefford, R., Beith, J.M., Van Hazel, G.A., Millward, M., Trotter, J.M., Wyld, D.K., Kusic, R., Shreeniwas, R., Morganti, A., Ballmer, A., Segal, E., Nayler, O. and Clozel, M. (2007) A phase II study of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist, as monotherapy in patients with stage IV metastatic melanoma. *Invest New Drugs*, **25**, 247-252.
- Kerr, J.F. and Searle, J. (1972) A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol*, **107**, 41-44.
- Khanna, R., Chang, M.C., Joiner, W.J., Kaczmarek, L.K. and Schlichter, L.C. (1999) hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem*, **274**, 14838-14849.
- Kiselyov, K., Shin, D.M., Kim, J.Y., Yuan, J.P. and Muallem, S. (2007) TRPC channels: interacting proteins. *Handb Exp Pharmacol*, 559-574.
- Koegel, H., Kaesler, S., Burgstahler, R., Werner, S. and Alzheimer, C. (2003) Unexpected down-regulation of the hIK1 Ca²⁺-activated K⁺ channel by its opener 1-ethyl-2-benzimidazolinone in HaCaT keratinocytes. Inverse effects on cell growth and proliferation. *J Biol Chem*, **278**, 3323-3330.
- Kotecha, S.A. and Schlichter, L.C. (1999) A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. *J Neurosci*, **19**, 10680-10693.
- Krause, J.D., Foster, C.D. and Reinhart, P.H. (1996) *Xenopus laevis* oocytes contain endogenous large conductance Ca²⁺(+)-activated K⁺ channels. *Neuropharmacology*, **35**, 1017-1022.
- Krijnen, J.L., Janssen, P.J., Ruizeveld de Winter, J.A., van Krimpen, H., Schroder, F.H. and van der Kwast, T.H. (1993) Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry*, **100**, 393-398.
- Krsek, M. (2003) [Somatostatin, somatostatin analogs and their clinical use]. *Cas Lek Cesk*, **142**, 134-138; discussion 139.
- Kundu, P., Alioua, A., Stefani, E. and Toro, L. (2007) Regulation of mouse Slo gene expression: multiple promoters, transcription start sites, and genomic action of estrogen. *J Biol Chem*, **282**, 27478-27492.
- Kunz, L., Thalhammer, A., Berg, F.D., Berg, U., Duffy, D.M., Stouffer, R.L., Dissen, G.A., Ojeda, S.R. and Mayerhofer, A. (2002) Ca²⁺-activated, large conductance K⁺ channel in the ovary: identification, characterization, and functional involvement in steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 5566-5574.
- Kunzelmann, K. (2005) Ion channels and cancer. *J Membr Biol*, **205**, 159-173.
- Lalani, E.N., Stubbs, A. and Stamp, G.W. (1997) Prostate cancer; the interface between pathology and basic scientific research. *Semin Cancer Biol*, **8**, 53-59.
- Lambers, T.T., Weidema, A.F., Nilius, B., Hoenderop, J.G. and Bindels, R.J. (2004) Regulation of the mouse epithelial Ca²⁺(+) channel TRPV6 by the Ca²⁺(+)-sensor calmodulin. *J Biol Chem*, **279**, 28855-28861.
- Larsson, L.I. (1980) On the possible existence of multiple endocrine, paracrine and neurocrine messengers in secretory cell systems. *Invest Cell Pathol*, **3**, 73-85.
- Launay, P., Fleig, A., Perraud, A.L., Scharenberg, A.M., Penner, R. and Kinet, J.P. (2002) TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell*, **109**, 397-407.
- Lazdunski, M. (1994) ATP-sensitive potassium channels: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*, **24 Suppl 4**, S1-5.
- Lechleiter, J.D. and Clapham, D.E. (1992) Spiral waves and intracellular calcium signalling. *J Physiol Paris*, **86**, 123-128.
- Lee, A.G. (2006) Ion channels: a paddle in oil. *Nature*, **444**, 697.

- Lee, H.C. (2000) NAADP: An emerging calcium signaling molecule. *J Membr Biol*, **173**, 1-8.
- Lee, H.C. and Aarhus, R. (2000) Functional visualization of the separate but interacting calcium stores sensitive to NAADP and cyclic ADP-ribose. *J Cell Sci*, **113 Pt 24**, 4413-4420.
- Lee, J.G., Zheng, R., McCafferty-Cepero, J.M., Burnstein, K.L., Nanus, D.M. and Shen, R. (2008) Endothelin-1 enhances the expression of the androgen receptor via activation of the c-myc pathway in prostate cancer cells. *Mol Carcinog*.
- Lee, N., Chen, J., Sun, L., Wu, S., Gray, K.R., Rich, A., Huang, M., Lin, J.H., Feder, J.N., Janovitz, E.B., Levesque, P.C. and Blonar, M.A. (2003) Expression and characterization of human transient receptor potential melastatin 3 (hTRPM3). *J Biol Chem*, **278**, 20890-20897.
- Lee, S.O., Lou, W., Qureshi, K.M., Mehraein-Ghomi, F., Trump, D.L. and Gao, A.C. (2004) RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate*, **60**, 303-309.
- Legrand, G., Humez, S., Slomianny, C., Dewailly, E., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2001) Ca²⁺ pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca²⁺-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem*, **276**, 47608-47614.
- Lehen'kyi, V., Beck, B., Polakowska, R., Charveron, M., Bordat, P., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2007) TRPV6 is a Ca²⁺ entry channel essential for Ca²⁺-induced differentiation of human keratinocytes. *J Biol Chem*, **282**, 22582-22591.
- Lemonnier, L., Trebak, M., Lievreumont, J.P., Bird, G.S. and Putney, J.W., Jr. (2006) Protection of TRPC7 cation channels from calcium inhibition by closely associated SERCA pumps. *Faseb J*, **20**, 503-505.
- Lemonnier, L., Vitko, Y., Shuba, Y.M., Vanden Abeele, F., Prevarskaya, N. and Skryma, R. (2002) Direct modulation of volume-regulated anion channels by Ca(2+) chelating agents. *FEBS Lett*, **521**, 152-156.
- Lengner, C.J., Hassan, M.Q., Serra, R.W., Lepper, C., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B. and Stein, G.S. (2005) Nkx3.2-mediated repression of Runx2 promotes chondrogenic differentiation. *J Biol Chem*, **280**, 15872-15879.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G. and Barhanin, J. (1996) TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *Embo J*, **15**, 1004-1011.
- Lewis, R.S. (2001) Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*, **19**, 497-521.
- Lin, H., Xiao, J., Luo, X., Wang, H., Gao, H., Yang, B. and Wang, Z. (2007) Overexpression HERG K(+) channel gene mediates cell-growth signals on activation of oncoproteins SP1 and NF-kappaB and inactivation of tumor suppressor Nkx3.1. *J Cell Physiol*, **212**, 137-147.
- Liou, J., Kim, M.L., Heo, W.D., Jones, J.T., Myers, J.W., Ferrell, J.E., Jr. and Meyer, T. (2005) STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, **15**, 1235-1241.
- Lu, C., Shen, Q., DuPre, E., Kim, H., Hilsenbeck, S. and Brown, P.H. (2005) cFos is critical for MCF-7 breast cancer cell growth. *Oncogene*, **24**, 6516-6524.
- Macian, F., Lopez-Rodriguez, C. and Rao, A. (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*, **20**, 2476-2489.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B. and Jacks, T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev*, **9**, 935-944.

- Maltsev, V.A., Wolff, B., Hess, J. and Werner, G. (1994) Calcium signalling in individual T-cells measured by confocal microscopy. *Immunol Lett*, **42**, 41-47.
- Mann, T. (1974) Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J Reprod Fertil*, **37**, 179-188.
- Marengo, S.R. and Chung, L.W. (1994) An orthotopic model for the study of growth factors in the ventral prostate of the rat: effects of epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor. *J Androl*, **15**, 277-286.
- Martin, S.C. and Shuttleworth, T.J. (1994) Ca^{2+} influx drives agonist-activated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in an exocrine cell. *FEBS Lett*, **352**, 32-36.
- Mazzuca, M. and Lesage, F. (2007) [Potassium channels, genetic and acquired diseases]. *Rev Med Interne*, **28**, 576-579.
- McCall, P., Witton, C.J., Grimsley, S., Nielsen, K.V. and Edwards, J. (2008) Is PTEN loss associated with clinical outcome measures in human prostate cancer? *Br J Cancer*, **99**, 1296-1301.
- McNeal, J.E. (1981) The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, **2**, 35-49.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M. and Toro, L. (1997) Large conductance voltage- and calcium-dependent K^+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14066-14071.
- Mengubas, K., Jabbar, S.A., Nye, K.E., Wilkes, S., Hoffbrand, A.V. and Wickremasinghe, R.G. (1994) Inactivation of calcium ion-regulating inositol polyphosphate second messengers is impaired in subpopulations of human leukemia cells. *Leukemia*, **8**, 1718-1725.
- Mercer, J.C., Dehaven, W.I., Smyth, J.T., Wedel, B., Boyles, R.R., Bird, G.S. and Putney, J.W., Jr. (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.
- Meyer, R. and Heinemann, S.H. (1998) Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. *J Physiol*, **508 (Pt 1)**, 49-56.
- Miller, A.J., Du, J., Rowan, S., Hershey, C.L., Widlund, H.R. and Fisher, D.E. (2004) Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res*, **64**, 509-516.
- Minke, B. and Selinger, Z. (1996) The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in Drosophila. *Curr Opin Neurobiol*, **6**, 459-466.
- Mistry, D.K. and Garland, C.J. (1998) Characteristics of single, large-conductance calcium-dependent potassium channels (BKCa) from smooth muscle cells isolated from the rabbit mesenteric artery. *J Membr Biol*, **164**, 125-138.
- Mogami, H., Tepikin, A.V. and Petersen, O.H. (1998) Termination of cytosolic Ca^{2+} signals: Ca^{2+} reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca^{2+} concentration in the store lumen. *Embo J*, **17**, 435-442.
- Montano, X. and Djamgoz, M.B. (2004) Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer. *FEBS Lett*, **571**, 1-8.
- Montell, C. (2001) Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, **2001**, RE1.
- Montell, C. (2003) Thermosensation: hot findings make TRPNs very cool. *Curr Biol*, **13**, R476-478.
- Morales Martinez, M.E. and Pedron, N. (1999) [beta-Endorphins and the male reproductive system]. *Ginecol Obstet Mex*, **67**, 183-187.

- Mosca, A., Berruti, A., Russo, L., Torta, M. and Dogliotti, L. (2005) The neuroendocrine phenotype in prostate cancer: basic and clinical aspects. *J Endocrinol Invest*, **28**, 141-145.
- Munaron, L., Antoniotti, S. and Lovisolo, D. (2004a) Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J Cell Mol Med*, **8**, 161-168.
- Munaron, L., Antoniotti, S., Pla, A.F. and Lovisolo, D. (2004b) Blocking Ca²⁺ entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem*, **11**, 1533-1543.
- Murphy, B.C., Pienta, K.J. and Coffey, D.S. (1992) Effects of extracellular matrix components and dihydrotestosterone on the structure and function of human prostate cancer cells. *Prostate*, **20**, 29-41.
- Nagakawa, O., Ogasawara, M., Murata, J., Fuse, H. and Saiki, I. (2001) Effect of prostatic neuropeptides on migration of prostate cancer cell lines. *Int J Urol*, **8**, 65-70.
- Nagaya, N. and Papazian, D.M. (1997) Potassium channel alpha and beta subunits assemble in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **272**, 3022-3027.
- Nakada, S.Y., di Sant'Agnese, P.A., Moynes, R.A., Hiipakka, R.A., Liao, S., Cockett, A.T. and Abrahamsson, P.A. (1993) The androgen receptor status of neuroendocrine cells in human benign and malignant prostatic tissue. *Cancer Res*, **53**, 1967-1970.
- Namazi, S., Rouhani Fard, S.A. and Abedtash, H. (2008) Role of endothelin-1 in tamoxifen resistance: Mechanism for a new possible treatment strategy in breast cancer. *Med Hypotheses*, **70**, 109-111.
- Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B. and Nisen, P. (2003a) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer*, **3**, 110-116.
- Nelson, J.B., Hedican, S.P., George, D.J., Reddi, A.H., Piantadosi, S., Eisenberger, M.A. and Simons, J.W. (1995a) Identification of endothelin-1 in the pathophysiology of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Nat Med*, **1**, 944-949.
- Nelson, J.B., Nabulsi, A.A., Vogelzang, N.J., Breul, J., Zonnenberg, B.A., Daliani, D.D., Schulman, C.C. and Carducci, M.A. (2003b) Suppression of prostate cancer induced bone remodeling by the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *J Urol*, **169**, 1143-1149.
- Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J. and Lederer, W.J. (1995b) Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, **270**, 633-637.
- Niemeyer, B.A., Bergs, C., Wissenbach, U., Flockerzi, V. and Trost, C. (2001a) Competitive regulation of Ca^T-like-mediated Ca²⁺ entry by protein kinase C and calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3600-3605.
- Niemeyer, B.A., Mery, L., Zawar, C., Suckow, A., Monje, F., Pardo, L.A., Stuhmer, W., Flockerzi, V. and Hoth, M. (2001b) Ion channels in health and disease. 83rd Boehringer Ingelheim Fonds International Titisee Conference. *EMBO Rep*, **2**, 568-573.
- Nishimura, I., Ui-Tei, K., Saigo, K., Ishii, H., Sakuma, Y. and Kato, M. (2008) 17beta-estradiol at physiological concentrations augments Ca(2+) -activated K⁺ currents via estrogen receptor beta in the gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line GT1-7. *Endocrinology*, **149**, 774-782.
- Nishizuka, Y. (1992) Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci Res*, **15**, 3-5.
- O'Grady, S.M. and Lee, S.Y. (2005) Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 1578-1594.
- Opferman, J.T. and Korsmeyer, S.J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, **4**, 410-415.

- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G. and Latorre, R. (2002) New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci*, **17**, 156-161.
- Ouadid-Ahidouch, H., Le Bourhis, X., Roudbaraki, M., Toillon, R.A., Delcourt, P. and Prevarskaya, N. (2001) Changes in the K⁺ current-density of MCF-7 cells during progression through the cell cycle: possible involvement of a h-ether.a-gogo K⁺ channel. *Receptors Channels*, **7**, 345-356.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Ahidouch, A., Delcourt, P. and Prevarskaya, N. (2004a) Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **316**, 244-251.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N. and Prevarskaya, N. (2004b) Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C125-134.
- Pardo, L.A. (2004) Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology (Bethesda)*, **19**, 285-292.
- Pardo, L.A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S. and Stuhmer, W. (1999) Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *Embo J*, **18**, 5540-5547.
- Parekh, A.B. and Penner, R. (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*, **77**, 901-930.
- Parihar, A.S., Coghlan, M.J., Gopalakrishnan, M. and Shieh, C.C. (2003a) Effects of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur J Pharmacol*, **471**, 157-164.
- Parihar, A.S., Groebe, D.R., Scott, V.E., Feng, J., Zhang, X.F., Warrior, U., Gopalakrishnan, M. and Shieh, C.C. (2003b) Functional analysis of large conductance Ca²⁺-activated K(+) channels: ion flux studies by atomic absorption spectrometry. *Assay Drug Dev Technol*, **1**, 647-654.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J.P. (2006) Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol*, **8**, 771-773.
- Pekonen, F., Nyman, T., Ammala, M. and Rutanen, E.M. (1995) Decreased expression of messenger RNAs encoding endothelin receptors and neutral endopeptidase 24.11 in endometrial cancer. *Br J Cancer*, **71**, 59-63.
- Peng, J.B., Brown, E.M. and Hediger, M.A. (2003) Epithelial Ca²⁺ entry channels: transcellular Ca²⁺ transport and beyond. *J Physiol*, **551**, 729-740.
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Tsukaguchi, H., Brown, E.M. and Hediger, M.A. (1999) Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem*, **274**, 22739-22746.
- Peng, J.B., Zhuang, L., Berger, U.V., Adam, R.M., Williams, B.J., Brown, E.M., Hediger, M.A. and Freeman, M.R. (2001) CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 729-734.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M. and Dworniczak, B. (2002) The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice. *Curr Biol*, **12**, 938-943.
- Perraud, A.L., Fleig, A., Dunn, C.A., Bagley, L.A., Launay, P., Schmitz, C., Stokes, A.J., Zhu, Q., Bessman, M.J., Penner, R., Kinet, J.P. and Scharenberg, A.M. (2001) ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature*, **411**, 595-599.

- Perraud, A.L., Knowles, H.M. and Schmitz, C. (2004) Novel aspects of signaling and ion-homeostasis regulation in immunocytes; The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Mol Immunol*, **41**, 657-673.
- Perrotti, D., Melotti, P., Skorski, T., Casella, I., Peschle, C. and Calabretta, B. (1995) Overexpression of the zinc finger protein MZF1 inhibits hematopoietic development from embryonic stem cells: correlation with negative regulation of CD34 and c-myc promoter activity. *Mol Cell Biol*, **15**, 6075-6087.
- Petersen, O.H., Gallacher, D.V., Wakui, M., Yule, D.I., Petersen, C.C. and Toescu, E.C. (1991) Receptor-activated cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in pancreatic acinar cells: generation and spreading of Ca^{2+} signals. *Cell Calcium*, **12**, 135-144.
- Pflug, B.R., Zheng, H., Udan, M.S., D'Antonio, J.M., Marshall, F.F., Brooks, J.D. and Nelson, J.B. (2007) Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. *Cancer Lett*, **246**, 139-148.
- Pigazzi, M., Ricotti, E., Germano, G., Faggian, D., Arico, M. and Basso, G. (2007) cAMP response element binding protein (CREB) overexpression CREB has been described as critical for leukemia progression. *Haematologica*, **92**, 1435-1437.
- Pongs, O., Leicher, T., Berger, M., Roeper, J., Bähring, R., Wray, D., Giese, K.P., Silva, A.J. and Storm, J.F. (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K^{+} channel beta subunits. *Ann N Y Acad Sci*, **868**, 344-355.
- Porter, V.A., Bonev, A.D., Knot, H.J., Heppner, T.J., Stevenson, A.S., Kleppisch, T., Lederer, W.J. and Nelson, M.T. (1998) Frequency modulation of Ca^{2+} sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol*, **274**, C1346-1355.
- Prawitt, D., Enklaar, T., Klemm, G., Gartner, B., Spangenberg, C., Winterpacht, A., Higgins, M., Pelletier, J. and Zabel, B. (2000) Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet*, **9**, 203-216.
- Prawitt, D., Monteilh-Zoller, M.K., Brixel, L., Spangenberg, C., Zabel, B., Fleig, A. and Penner, R. (2003) TRPM5 is a transient Ca^{2+} -activated cation channel responding to rapid changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15166-15171.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Vacher, P., Daniel, N., Bignon, C., Djiane, J. and Dufy, B. (1994) Early effects of PRL on ion conductances in CHO cells expressing PRL receptor. *Am J Physiol*, **267**, C554-562.
- Prevarskaya, N.B., Skryma, R.N., Vacher, P., Daniel, N., Djiane, J. and Dufy, B. (1995) Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem*, **270**, 24292-24299.
- Prewett, M., Rockwell, P., Rockwell, R.F., Giorgio, N.A., Mendelsohn, J., Scher, H.I. and Goldstein, N.I. (1996) The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol*, **19**, 419-427.
- Putney, J.W., Jr. (1999) "Kissin' cousins": intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell*, **99**, 5-8.
- Putney, J.W., Jr. and McKay, R.R. (1999) Capacitative calcium entry channels. *Bioessays*, **21**, 38-46.
- Rauh, A., Windischhofer, W., Kovacevic, A., DeVaney, T., Huber, E., Semlitsch, M., Leis, H.J., Sattler, W. and Malle, E. (2008) Endothelin (ET)-1 and ET-3 promote expression of c-fos and c-jun in human choriocarcinoma via ET(B) receptor-mediated G(i)- and G(q)-pathways and MAP kinase activation. *Br J Pharmacol*, **154**, 13-24.

- Reinhart, P.H. and Levitan, I.B. (1995) Kinase and phosphatase activities intimately associated with a reconstituted calcium-dependent potassium channel. *J Neurosci*, **15**, 4572-4579.
- Rettig, J., Wunder, F., Stocker, M., Lichtinghagen, R., Mastiaux, F., Beckh, S., Kues, W., Pedarzani, P., Schroter, K.H., Ruppersberg, J.P. and et al. (1992) Characterization of a Shaw-related potassium channel family in rat brain. *Embo J*, **11**, 2473-2486.
- Roderick, H.L., Berridge, M.J. and Bootman, M.D. (2003) Calcium-induced calcium release. *Curr Biol*, **13**, R425.
- Rodriguez-Covarrubias, F., Larre, S., De La Taille, A., Abbou, C.C. and Salomon, L. (2008) The outcome of patients with pathological Gleason score ≥ 8 prostate cancer after radical prostatectomy. *BJU Int*, **101**, 305-307.
- Rooney, T.A., Sass, E.J. and Thomas, A.P. (1989) Characterization of cytosolic calcium oscillations induced by phenylephrine and vasopressin in single fura-2-loaded hepatocytes. *J Biol Chem*, **264**, 17131-17141.
- Rosano, L., Spinella, F., Di Castro, V., Nicotra, M.R., Albini, A., Natali, P.G. and Bagnato, A. (2003) Endothelin receptor blockade inhibits molecular effectors of Kaposi's sarcoma cell invasion and tumor growth in vivo. *Am J Pathol*, **163**, 753-762.
- Rouzaire-Dubois, B. and Dubois, J.M. (1998) K⁺ channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *J Physiol*, **510** (Pt 1), 93-102.
- Rozengurt, E. (1992) Growth factors and cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, **4**, 161-165.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. and Vandenabeele, P. (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, **23**, 2861-2874.
- Saito, M., Sato, R., Munoz, N.M., Herrnreiter, A., Oyaizu, M., Kasugai, H., Narahashi, T. and Leff, A.R. (1997) Association of granular exocytosis with Ca(2+)-activated K⁺ channels in human eosinophils. *Am J Physiol*, **273**, L16-21.
- Salama, I., Malone, P.S., Mihaimeed, F. and Jones, J.L. (2008) A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol*, **34**, 357-364.
- Saleh, S.N., Albert, A.P., Peppiatt, C.M. and Large, W.A. (2006) Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes. *J Physiol*, **577**, 479-495.
- Sanguinetti, M.C. and Zou, A. (1997) Molecular physiology of cardiac delayed rectifier K⁺ channels. *Heart Vessels*, **Suppl 12**, 170-172.
- Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. and Fesik, S.W. (1997) Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science*, **275**, 983-986.
- Schinzl, A., Kaufmann, T. and Borner, C. (2004) Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]. *Biochim Biophys Acta*, **1644**, 95-105.
- Schmechel, D., Marangos, P.J. and Brightman, M. (1978) Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*, **276**, 834-836.
- Schmidt, K., Eulitz, D., Veh, R.W., Kettenmann, H. and Kirchhoff, F. (1999) Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels of the shaker family (Kv1) in oligodendrocyte progenitors. *Brain Res*, **843**, 145-160.
- Schoenherr, C.J. and Anderson, D.J. (1995) The neuron-restrictive silencer factor (NRSF): a coordinate repressor of multiple neuron-specific genes. *Science*, **267**, 1360-1363.

- Schreiber, M. and Salkoff, L. (1997) A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, **73**, 1355-1363.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Rubie, C., Hordt, M., Towbin, J.A., Borggreffe, M., Assmann, G., Qu, X., Somberg, J.C., Breithardt, G., Oberti, C. and Funke, H. (1997) KCNE1 mutations cause jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat Genet*, **17**, 267-268.
- Schwartzman, R.A. and Cidlowski, J.A. (1993) Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, **14**, 133-151.
- Sesti, F. and Goldstein, S.A. (1998) Single-channel characteristics of wild-type IKs channels and channels formed with two minK mutants that cause long QT syndrome. *J Gen Physiol*, **112**, 651-663.
- Sesti, F., Tai, K.K. and Goldstein, S.A. (2000) MinK endows the I(Ks) potassium channel pore with sensitivity to internal tetraethylammonium. *Biophys J*, **79**, 1369-1378.
- Shah, G.V., Rayford, W., Noble, M.J., Austenfeld, M., Weigel, J., Vamos, S. and Mebust, W.K. (1994) Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic Ca²⁺ transients. *Endocrinology*, **134**, 596-602.
- Shen, M.R., Droogmans, G., Eggermont, J., Voets, T., Ellory, J.C. and Nilius, B. (2000) Differential expression of volume-regulated anion channels during cell cycle progression of human cervical cancer cells. *J Physiol*, **529 Pt 2**, 385-394.
- Shen, N.V. and Pfaffinger, P.J. (1995) Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of voltage-gated K⁺ channel subunit proteins. *Neuron*, **14**, 625-633.
- Shen, Q., Uray, I.P., Li, Y., Krisko, T.I., Strecker, T.E., Kim, H.T. and Brown, P.H. (2008) The AP-1 transcription factor regulates breast cancer cell growth via cyclins and E2F factors. *Oncogene*, **27**, 366-377.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, **13**, 1501-1512.
- Shi, G., Nakahira, K., Hammond, S., Rhodes, K.J., Schechter, L.E. and Trimmer, J.S. (1996) Beta subunits promote K⁺ channel surface expression through effects early in biosynthesis. *Neuron*, **16**, 843-852.
- Shuttleworth, T.J. (2004) Receptor-activated calcium entry channels--who does what, and when? *Sci STKE*, **2004**, pe40.
- Simonson, M.S. and Herman, W.H. (1993) Protein kinase C and protein tyrosine kinase activity contribute to mitogenic signaling by endothelin-1. Cross-talk between G protein-coupled receptors and pp60c-src. *J Biol Chem*, **268**, 9347-9357.
- Singh, B.B., Lockwich, T.P., Bandyopadhyay, B.C., Liu, X., Bollimuntha, S., Brazer, S.C., Combs, C., Das, S., Leenders, A.G., Sheng, Z.H., Knepper, M.A., Ambudkar, S.V. and Ambudkar, I.S. (2004) VAMP2-dependent exocytosis regulates plasma membrane insertion of TRPC3 channels and contributes to agonist-stimulated Ca²⁺ influx. *Mol Cell*, **15**, 635-646.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X.L., Coppenolle, F.V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B. and Prevarskaya, N. (2000) Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol*, **527 Pt 1**, 71-83.
- Smith, L.M., Wise, S.C., Hendricks, D.T., Sabichi, A.L., Bos, T., Reddy, P., Brown, P.H. and Birrer, M.J. (1999) cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype. *Oncogene*, **18**, 6063-6070.
- Sneyd, J., Girard, S. and Clapham, D. (1993) Calcium wave propagation by calcium-induced calcium release: an unusual excitable system. *Bull Math Biol*, **55**, 315-344.

- Soboloff, J., Spassova, M.A., Hewavitharana, T., He, L.P., Xu, W., Johnstone, L.S., Dziadek, M.A. and Gill, D.L. (2006) STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca^{2+} Entry. *Curr Biol*, **16**, 1465-1470.
- Soga, N., Onishi, T., Arima, K. and Sugimura, Y. (2007) Prostate-specific antigen half-life and pretreatment prostate-specific antigen: crucial predictors for prostate-specific antigen trend in delayed-combined androgen blockade therapy. *Int J Urol*, **14**, 192-196; discussion 197.
- Spielberg, H., June, C.H., Blair, O.C., Nystrom-Rosander, C., Cereb, N. and Deeg, H.J. (1991) UV irradiation of lymphocytes triggers an increase in intracellular Ca^{2+} and prevents lectin-stimulated Ca^{2+} mobilization: evidence for UV- and nifedipine-sensitive Ca^{2+} channels. *Exp Hematol*, **19**, 742-748.
- Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S. and Redwine, E. (1987) Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, **317**, 909-916.
- Stattin, P., Rinaldi, S., Biessy, C., Stenman, U.H., Hallmans, G. and Kaaks, R. (2004) High levels of circulating insulin-like growth factor-I increase prostate cancer risk: a prospective study in a population-based nonscreened cohort. *J Clin Oncol*, **22**, 3104-3112.
- Stephan, C., Jung, K., Diamandis, E.P., Rittenhouse, H.G., Lein, M. and Loening, S.A. (2002) Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer. *Urology*, **59**, 2-8.
- Stewart, A.G., Grigoriadis, G. and Harris, T. (1994) Mitogenic actions of endothelin-1 and epidermal growth factor in cultured airway smooth muscle. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **21**, 277-285.
- Stewart, L.V. and Weigel, N.L. (2004) Vitamin D and prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*, **229**, 277-284.
- Storm, J.F. (1987) Intracellular injection of a Ca^{2+} chelator inhibits spike repolarization in hippocampal neurons. *Brain Res*, **435**, 387-392.
- Story, G.M., Peier, A.M., Reeve, A.J., Eid, S.R., Mosbacher, J., Hricik, T.R., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Andersson, D.A., Hwang, S.W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. and Patapoutian, A. (2003) ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, **112**, 819-829.
- Strasser, A. (2005) The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **5**, 189-200.
- Suh, J. and Rabson, A.B. (2004) NF-kappaB activation in human prostate cancer: important mediator or epiphenomenon? *J Cell Biochem*, **91**, 100-117.
- Suzuki, T. and Takimoto, K. (2004) Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. *Int J Oncol*, **25**, 153-159.
- Szabo, I., Adams, C. and Gulbins, E. (2004) Ion channels and membrane rafts in apoptosis. *Pflugers Arch*, **448**, 304-312.
- Tajima, N., Schonherr, K., Niedling, S., Kaatz, M., Kanno, H., Schonherr, R. and Heinemann, S.H. (2006) Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein. *J Physiol*, **571**, 349-359.
- Takekoshi, K., Nakai, T. and Matsui, Y. (1999) [Chromogranin A, chromogranin B, chromogranin C]. *Nippon Rinsho*, **57 Suppl**, 234-237.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. and Harris, A.L. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*, **157**, 411-421.

- Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H.G. and Toro, L. (1997) Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J Physiol*, **502** (Pt 3), 545-557.
- Tarle, M., Frkovic-Grazio, S., Kraljic, I. and Kovacic, K. (1994) A more objective staging of advanced prostate cancer--routine recognition of malignant endocrine structures: the assessment of serum TPS, PSA, and NSE values. *Prostate*, **24**, 143-148.
- Teos, L.Y., Zhao, A., Alvin, Z., Laurence, G.G., Li, C. and Haddad, G.E. (2008) Basal and IGF-1-dependent regulation of potassium channels by MAP kinases and PI-3 kinase during eccentric cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2006) Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res*, **66**, 2038-2047.
- Thebault, S., Roudbaraki, M., Sydorenko, V., Shuba, Y., Lemonnier, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003) Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest*, **111**, 1691-1701.
- Thompson, F.H., Nelson, M.A., Trent, J.M., Guan, X.Y., Liu, Y., Yang, J.M., Emerson, J., Adair, L., Wymer, J., Balfour, C., Massey, K., Weinstein, R., Alberts, D.S. and Taetle, R. (1996) Amplification of 19q13.1-q13.2 sequences in ovarian cancer. G-band, FISH, and molecular studies. *Cancer Genet Cytogenet*, **87**, 55-62.
- Thorpe, J.F., Jain, S., Marczylo, T.H., Gescher, A.J., Steward, W.P. and Mellon, J.K. (2007) A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl*, **89**, 207-211.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S. and Laus, R. (2001a) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*, **61**, 3760-3769.
- Tsavalier, L., Shapero, M.H., Morkowski, S. and Laus, R. (2001b) Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res*, **61**, 3760-3769.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J. (1982) Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol*, **94**, 325-334.
- Untergasser, G., Rumpold, H., Plas, E., Witkowski, M. and Berger, P. (2001) Seminal plasma factors induce in vitro PRL secretion in smooth muscle cells of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**, 5577-5584.
- Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M.I., Mann, G.E., Vergara, C. and Latorre, R. (1999) Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science*, **285**, 1929-1931.
- Van Coppenolle, F., Skryma, R., Ouadid-Ahidouch, H., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Humez, S., Crepin, A., Gourdou, I., Djiane, J., Bonnal, J.L., Mauroy, B. and Prevarskaya, N. (2004a) Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem J*, **377**, 569-578.
- Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E. and Prevarskaya, N. (2004b) Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci*, **117**, 4135-4142.

- van Leenders, G.J., Gage, W.R., Hicks, J.L., van Balken, B., Aalders, T.W., Schalken, J.A. and De Marzo, A.M. (2003) Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol*, **162**, 1529-1537.
- Vanden Abeele, F., Shuba, Y., Roudbaraki, M., Lemonnier, L., Vanoverberghe, K., Mariot, P., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003) Store-operated Ca^{2+} channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium*, **33**, 357-373.
- Vanoverberghe, K., Mariot, P., Vanden Abeele, F., Delcourt, P., Parys, J.B. and Prevarskaya, N. (2003) Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium*, **34**, 75-85.
- Varvarigou, A., Bouziotis, P., Zikos, C., Scopinaro, F. and De Vincentis, G. (2004) Gastrin-releasing peptide (GRP) analogues for cancer imaging. *Cancer Biother Radiopharm*, **19**, 219-229.
- Vazquez, G., Wedel, B.J., Aziz, O., Trebak, M. and Putney, J.W., Jr. (2004) The mammalian TRPC cation channels. *Biochim Biophys Acta*, **1742**, 21-36.
- Veldhuisen, B., Spruit, L., Dauwerse, H.G., Breuning, M.H. and Peters, D.J. (1999) Genes homologous to the autosomal dominant polycystic kidney disease genes (PKD1 and PKD2). *Eur J Hum Genet*, **7**, 860-872.
- Vennekens, R., Hoenderop, J.G., Prenen, J., Stuijver, M., Willems, P.H., Droogmans, G., Nilius, B. and Bindels, R.J. (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial $\text{Ca}(2+)$ channel. *J Biol Chem*, **275**, 3963-3969.
- Vias, M., Burt, G., Culig, Z., Veerakumarasivam, A., Neal, D.E. and Mills, I.G. (2007) A role for neurotensin in bicalutamide resistant prostate cancer cells. *Prostate*, **67**, 190-202.
- Walker, D., Bichet, D., Campbell, K.P. and De Waard, M. (1998) A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ subunit. *J Biol Chem*, **273**, 2361-2367.
- Wallner, M., Meera, P. and Toro, L. (1996) Determinant for beta-subunit regulation in high-conductance voltage-activated and $\text{Ca}(2+)$ -sensitive K^{+} channels: an additional transmembrane region at the N terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14922-14927.
- Wang, H., Zhang, Y., Cao, L., Han, H., Wang, J., Yang, B., Nattel, S. and Wang, Z. (2002) HERG K^{+} channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res*, **62**, 4843-4848.
- Wang, S. and El-Deiry, W.S. (2004) Cytochrome c: a crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis. *Cancer Biol Ther*, **3**, 44-46.
- Wang, Y.F., Jia, H., Walker, A.M. and Cukierman, S. (1992) K^{+} -current mediation of prolactin-induced proliferation of malignant (Nb2) lymphocytes. *J Cell Physiol*, **152**, 185-189.
- Wang, Z.H., Feng, Y.J., Su, M. and Yi, X.F. (2007) [Intermediate-conductance- Ca^{2+} -activated K^{+} channels are overexpressed in endometrial cancer and involved in regulating proliferation of endometrial cancer cells]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, **42**, 111-115.
- Warmke, J., Drysdale, R. and Ganetzky, B. (1991) A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. *Science*, **252**, 1560-1562.
- Warmke, J.W. and Ganetzky, B. (1994) A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3438-3442.
- Watanabe, H., Davis, J.B., Smart, D., Jerman, J.C., Smith, G.D., Hayes, P., Vriens, J., Cairns, W., Wissenbach, U., Prenen, J., Flockerzi, V., Droogmans, G., Benham, C.D. and

- Nilius, B. (2002a) Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*, **277**, 13569-13577.
- Watanabe, H., Vriens, J., Suh, S.H., Benham, C.D., Droogmans, G. and Nilius, B. (2002b) Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**, 47044-47051.
- Wei, A., Solaro, C., Lingle, C. and Salkoff, L. (1994) Calcium sensitivity of BK-type KCa channels determined by a separable domain. *Neuron*, **13**, 671-681.
- Wei, A.D., Butler, A. and Salkoff, L. (2005) KCNQ-like potassium channels in *Caenorhabditis elegans*. Conserved properties and modulation. *J Biol Chem*, **280**, 21337-21345.
- Werlen, G., Jacinto, E., Xia, Y. and Karin, M. (1998) Calcineurin preferentially synergizes with PKC-theta to activate JNK and IL-2 promoter in T lymphocytes. *Embo J*, **17**, 3101-3111.
- Westbrook, T.F., Martin, E.S., Schlabach, M.R., Leng, Y., Liang, A.C., Feng, B., Zhao, J.J., Roberts, T.M., Mandel, G., Hannon, G.J., Depinho, R.A., Chin, L. and Elledge, S.J. (2005) A genetic screen for candidate tumor suppressors identifies REST. *Cell*, **121**, 837-848.
- Whitacre, D.C., Chauhan, S., Davis, T., Gordon, D., Cress, A.E. and Miesfeld, R.L. (2002) Androgen induction of in vitro prostate cell differentiation. *Cell Growth Differ*, **13**, 1-11.
- Wissenbach, U., Niemeyer, B., Himmerkus, N., Fixemer, T., Bonkhoff, H. and Flockerzi, V. (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 1359-1363.
- Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Fixemer, T., Schneidewind, A., Trost, C., Cavalie, A., Reus, K., Meese, E., Bonkhoff, H. and Flockerzi, V. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem*, **276**, 19461-19468.
- Wu, G., Iwamura, M., di Sant'Agnese, P.A., Deftos, L.J., Cockett, A.T. and Gershagen, S. (1998) Characterization of the cell-specific expression of parathyroid hormone-related protein in normal and neoplastic prostate tissue. *Urology*, **51**, 110-120.
- Wulff, H., Gutman, G.A., Cahalan, M.D. and Chandy, K.G. (2001) Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem*, **276**, 32040-32045.
- Xu, J., Yu, W., Jan, Y.N., Jan, L.Y. and Li, M. (1995) Assembly of voltage-gated potassium channels. Conserved hydrophilic motifs determine subfamily-specific interactions between the alpha-subunits. *J Biol Chem*, **270**, 24761-24768.
- Xu, X.Z., Chien, F., Butler, A., Salkoff, L. and Montell, C. (2000) TRPgamma, a drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron*, **26**, 647-657.
- Yang, K.T., Chang, W.L., Yang, P.C., Chien, C.L., Lai, M.S., Su, M.J. and Wu, M.L. (2006) Activation of the transient receptor potential M2 channel and poly(ADP-ribose) polymerase is involved in oxidative stress-induced cardiomyocyte death. *Cell Death Differ*, **13**, 1815-1826.
- Yin, J.J., Mohammad, K.S., Kakonen, S.M., Harris, S., Wu-Wong, J.R., Wessale, J.L., Padley, R.J., Garrett, I.R., Chirgwin, J.M. and Guise, T.A. (2003) A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10954-10959.
- Yu, S.P. and Choi, D.W. (2000) Ions, cell volume, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9360-9362.

- Yule, D.I. and Gallacher, D.V. (1988) Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS Lett*, **239**, 358-362.
- Zhang, L. and Barritt, G.J. (2004) Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca^{2+} channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res*, **64**, 8365-8373.
- Zhang, L. and Barritt, G.J. (2006) TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer*, **13**, 27-38.
- Zhang, W., Chu, X., Tong, Q., Cheung, J.Y., Conrad, K., Masker, K. and Miller, B.A. (2003a) A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death. *J Biol Chem*, **278**, 16222-16229.
- Zhang, W., Hirschler-Laszkiewicz, I., Tong, Q., Conrad, K., Sun, S.C., Penn, L., Barber, D.L., Stahl, R., Carey, D.J., Cheung, J.Y. and Miller, B.A. (2006) TRPM2 is an ion channel that modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol Cell Physiol*, **290**, C1146-1159.
- Zhang, X., Solaro, C.R. and Lingle, C.J. (2001) Allosteric regulation of BK channel gating by Ca^{2+} and Mg^{2+} through a nonselective, low affinity divalent cation site. *J Gen Physiol*, **118**, 607-636.
- Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S. and Ryba, N.J. (2003b) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, **112**, 293-301.
- Zhiqi, S., Soltani, M.H., Bhat, K.M., Sangha, N., Fang, D., Hunter, J.J. and Setaluri, V. (2004) Human melastatin 1 (TRPM1) is regulated by MITF and produces multiple polypeptide isoforms in melanocytes and melanoma. *Melanoma Res*, **14**, 509-516.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. and Hung, M.C. (2001) Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol*, **3**, 245-252.
- Zhou, J.R., Yu, L., Zerbini, L.F., Libermann, T.A. and Blackburn, G.L. (2004) Progression to androgen-independent LNCaP human prostate tumors: cellular and molecular alterations. *Int J Cancer*, **110**, 800-806.
- Zhu, M.X. (2005) Multiple roles of calmodulin and other Ca^{2+} -binding proteins in the functional regulation of TRP channels. *Pflugers Arch*, **451**, 105-115.
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D. and Giaccia, A.J. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, **14**, 391-396.

RESUME

Implication du canal potassique calcium-dépendant IK_{Ca1} dans la cancérogenèse de la prostate humaine

Des études récentes montrent que l'homéostasie calcique intracellulaire, ainsi que l'expression et l'activité de canaux ioniques jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire aussi bien dans un contexte physiologique que dans certains cancers. Cependant, aucune approche proposant les canaux ioniques comme cible thérapeutique n'est actuellement envisagée dans le cadre des traitements des cancers de la prostate.

Dans ce travail nous avons mis en évidence l'expression, la fonctionnalité et l'implication des canaux potassiques calcium-activés (IK_{Ca1}) dans la prolifération des lignées cellulaires cancéreuses de la prostate humaine.

Ces études ont également montré que l'activation du canal IK_{Ca1} favorise l'entrée de calcium via un canal calcique de la famille des TRP, le canal TRPV6, impliqué dans l'entrée passive de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques. De plus, par des études de co-immunoprécipitations, nous avons montré que le canal IK_{Ca1} et le canal calcique TRPV6 sont associés formant ainsi un complexe moléculaire fonctionnel permettant l'entrée de calcium et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Par ailleurs, une suppression du canal IK_{Ca1} induit la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ceci suggère un rôle essentiel joué par le canal IK_{Ca1} pour favoriser la croissance ou induire la différenciation cellulaire. Nos études ont également mis en évidence une surexpression de l'ARNm et de la protéine d' IK_{Ca1} dans les tissus prostatiques atteints d'un cancer de la prostate humaine. Ces données permettraient de proposer ces canaux ioniques comme marqueurs de cancer et/ou comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des cancers de la prostate humaine.

SUMMARY

Implication of calcium-activated potassium channel IK_{Ca1} in human prostate cancer

Recent studies show that the intracellular calcium homeostasis, as well as expression and the activity of ionic channels play an essential role in the control of cell proliferation as well in a physiological context as in certain cancers. However, no approaches offering ionic channels as therapeutic target is nowadays envisaged as part of the treatments of the cancers of the prostate.

In the present work, we showed the expression, functionality and involvement of calcium-activated potassium channels (IK_{Ca1}) in the proliferation of the human prostate cancer cells. These studies also showed that the activation of the IK_{Ca1} channel favours the calcium entry via a member of the TRP family of calcium channels, TRPV6, in the prostate cancer cells. Besides, by studies of co-immunoprecipitations, we showed that the IK_{Ca1} potassium channel and the TRPV6 calcium channel form a functional molecular complex allowing the calcium entry and the proliferation of the prostate cancer cells.

Moreover, a down-regulation of the IK_{Ca1} channel leads to the neuroendocrine differentiation of the human prostate cancer cells. This suggests an essential role played by the IK_{Ca1} channel to favour growth or lead to cell differentiation. Our immunohistofluorescence studies also showed an overexpression of IK_{Ca1} mRNA and protein in human prostate cancer compared to non-tumor tissues. These data would allow to propose these ion channels as markers and/or as potential therapeutic targets in the treatment of the human prostate cancers.