

Université des Sciences et Technologies de Lille

Année 2009

N°d'ordre :

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE**

Discipline : Biologie-Santé

Par

Alexis Bavencoffe

**ETUDE DES MÉCANISMES DE MODULATION DU
CANAL CATIONIQUE TRPM8 : IMPLICATION DANS LA
PHYSIOPATHOLOGIE SENSORIELLE ET
PROSTATIQUE**

**Thèse dirigée par les Prof. Natalia Prevarskaya
et Roman Skryma**

Soutenu le 15 Décembre 2009

Jury :

Pr. Y. De Launoit	Président
Dr. E. Honoré	Rapporteur
Dr. E. Bourinet	Rapporteur
Pr. B. Mauroy	Examineur
Dr. J. Busserolles	Examineur
Pr. L. Morel	Examineur
Pr. R. Skryma	Examineur
Pr. N. Prevarskaya	Examineur

ETUDE DES MÉCANISMES DE MODULATION DU CANAL CATIONIQUE TRPM8 : IMPLICATION DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE SENSORIELLE ET PROSTATIQUE

Le canal TRPM8 a été mis en évidence en tant que récepteur au froid au sein des neurones sensoriels des ganglions rachidiens dorsaux (DRG) et trigéminaux. Il est activé par le froid (<28°C) ainsi que par des molécules au pouvoir réfrigérant telles que le menthol, l'iciline ou l'eucalyptol. En recherchant un nouveau marqueur de cancer de la prostate, Larisa Tsavaler *et coll.* ont détecté ce canal au niveau des cellules épithéliales prostatiques saines et cancéreuses. L'expression du gène *trpm8* est androgéno-dépendante et varie en fonction des stades de cancer. Si plusieurs travaux se sont attachés à déterminer ses modes d'activation, au début de cette thèse, aucune équipe ne s'était intéressée à rechercher des modulateurs physiologiques de ce canal, autres que le froid, aussi bien au niveau sensoriel que prostatique. Partant du constat que la thermosensation se voit altérée au cours de certaines situations physiologiques telles que le stress, les traitements hormonaux, l'âge et le sexe, nous avons étudié une possible régulation de ce récepteur au froid par les voies de signalisation empruntées par certains neuromodulateurs et hormones.

Nos résultats mettent en évidence trois nouvelles voies de régulation de TRPM8. Nous démontrons que les androgènes modulent l'activité du canal par une voie non génomique impliquant un récepteur aux androgènes membranaire couplé aux protéines Gi. Un autre type de récepteurs couplés à ces mêmes protéines Gi, les récepteurs alpha2A adrénergiques, stimulés par un de leurs agonistes utilisé en clinique, la clonidine, inhibent ce canal. Nous avons décortiqué la voie de signalisation empruntée par les androgènes et la clonidine. Nous montrons que ces deux stimulations recrutent les protéines Gi qui à leur tour inhibent la voie adénylate cyclase/cAMP/protéines kinase A. Nous observons enfin que la stimulation des récepteurs muscariniques par l'oxotrémorine aboutit à une chute de l'activité du canal par activation de la cPLA2 cytosolique et la production d'acide arachidonique.

Nos données se confirment dans deux modèles physiologiques, les cellules épithéliales prostatiques et les neurones sensoriels de ganglions rachidiens dorsaux. Ces travaux nous permettent d'avancer une possible explication des variabilités inter-individuelles ainsi que des différences due l'âge, au sexe ou face à des situations de stress vis-à-vis de la perception du froid. Enfin, nos résultats nous permettent également de proposer des pistes pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour des pathologies associant le canal TRPM8 telles que l'allodynie au froid et le cancer de la prostate.

STUDY OF THE MODULATORY MECHANISMS OF CATIONIC CHANNEL TRPM8 AND OF THEIR IMPLICATIONS IN SENSORY AND PROSTATE PATHOPHYSIOLOGIES.

TRPM8 is known as a cold receptor expressed in the subset of dorsal root ganglion (DRG) and trigeminal (TG) sensory neurons which are activated by cooling temperatures (<28°C) or by chemical imitators of cooling sensation such as menthol, icilin and eucalyptol. While screening for a new marker of prostate carcinoma, Larisa Tsavaler *et al.* detected TRPM8 channel expression in normal and cancer prostate epithelial cells. Expression of *trpm8* gene is androgeno-dependent and change during cancer development. Even though many studies investigated the role of TRPM8 as a cold receptor and described its activation mechanisms, at the beginning of this work no research team had published any information about TRPM8 physiological modulators other than cold, be it in prostate or sensory neurons. Since several works reported modifications of thermosensation during physiological situations such as stress, hormonal therapy, age and gender, we investigated a possible regulation of the cold receptor by neuromodulators, hormones and their signalization pathways.

Our results demonstrate three new regulatory mechanisms for TRPM8. We show that androgens modulate channel activity through a non-genomic pathway involving a plasma membrane receptor coupled to Gi proteins. Another Gi-coupled receptor, alpha2A adrenoreceptor, activated by one of its clinically used agonist, clonidine, inhibits this channel. We elucidated the intracellular signalization pathway underlying clonidine and androgens effect. We namely show that these two agonists stimulate their Gi-coupled receptors which in turn inhibit the adenylate cyclase/cAMP/protein kinase A pathway. We report that the stimulation of muscarinic receptors by oxotremorine leads to a decrease of TRPM8 channel activity through the activation of cytosolic cPLA2 and arachidinic acid production.

Our data are confirmed in two physiological models, epithelial prostate cells and dorsal root ganglia neurons. This work leads us to propose a possible explanation for variations which could be accounted for during stress, gender, as well as inter- and intra-individual disparity in thermosensation. Finally, our results could help establishing new therapeutic strategies for pathologies involving TRPM8 such as cold allodynia and prostate cancer.

*A ma famille,
A ma Mamie,
A ma Mounette,
A mon Petit Frère,
A mes amis,
Au groupe SV44,
A tous ceux que j'aime.*

*L'homme vraiment courageux est celui qui se couche à côté de son travail histoire de prouver
qu'il n'a pas peur de lui.*

Pierre Dac

*But I, being poor, have only my dreams,
I have spread my dreams under your feet,
Tread softly because you tread on my dreams.
He wishes for the Cloths of Heaven, William Butler Yeats*

Remerciements

Aux membres du jury :

Monsieur le Président du Jury : Prof. Yvan De Launoit :

Monsieur le Professeur, acceptez tous mes remerciements pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail et de présider le jury qui se réunit en ce jour important que j'ai espéré et attendu depuis mon inscription en première année de Faculté.

Messieurs les rapporteurs : Dr. Eric Honoré et Dr. Emmanuel Bourinet :

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de me faire l'honneur d'évaluer et de juger mon travail de thèse. Je vous suis d'autant plus reconnaissant que j'ai bien conscience du temps que vous avez consacré à la lecture critique et à l'analyse de ce travail. J'espère néanmoins avoir pu humblement vous faire découvrir un canal ionique des plus intrigant dont l'étude s'avère d'autant plus passionnante qu'elle se complique de découvertes en découvertes.

Mesdames et Messieurs les examinateurs : Pr. Brigitte Mauroy, Pr. Natalia Prevarskaya, Pr. Laurent Morel, Dr. Jérôme Busserolles et Pr. Roman Skryma :

Madame le Prof. Brigitte Mauroy, acceptez tous mes remerciements pour m'avoir permis d'être financé par le Groupement Hospitalier de l'Institut Catholique de Lille au cours de cette thèse. Je tiens également à vous remercier de me faire l'honneur de prendre part à mon jury de thèse et d'avoir accepté de juger mes travaux.

Monsieur le Prof. Laurent Morel, j'ai découvert le monde à la fois complexe et passionnant des effets non génomiques au cours de mes recherches sur le canal TRPM8. Je suis donc fort honoré de votre présence dans mon jury de thèse et d'avoir votre avis de spécialiste sur mes résultats.

Monsieur le Dr. Jérôme Busserolles, je tiens tout d'abord à vous remercier d'avoir donné à mes résultats mécanistiques sur la régulation non génomique de TRPM8 par les androgènes une portée physiologique passionnante. Vous ne pouvez imaginer le plaisir qu'à été pour moi de savoir que ce que j'ai découvert à mon poste de patch sur un modèle cellulaire de

surexpression avait réellement un impact *in vivo*. Je vous remercie également d'avoir accepté de juger mon travail et de participer à mon jury de thèse.

Monsieur le Pr. Roman Skryma, merci de m'avoir tant appris à la fois sur l'électrophysiologie que sur la Recherche. A votre manière vous avez su être là dans des moments difficiles. J'ai aimé travailler avec vous et j'espère encore beaucoup apprendre de vous.

Madame le Pr. Natalia Prevarskaya, merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir pris comme étudiant. Depuis mon premier stage au sein du laboratoire en seconde année de DEUG, j'ai désiré travailler avec vous. Vous m'avez appris ce qu'était la Science et la Recherche. Je n'oublierai jamais nos discussions. Comme Roman, vous avez toujours su être là quand il le fallait. J'espère à l'avenir avoir encore le plaisir de travailler avec vous.

Aux membres du Laboratoire :

Je souhaite remercier tout particulièrement le Docteur Pascal Mariot et le Pr. Morad Roudbaraki pour m'avoir fait découvrir respectivement l'électrophysiologie et la biologie moléculaire. Mes différents stages sous leur tutorat m'ont donné goût à la Recherche et au travail en laboratoire. Merci à Matthieu F. et Benjamin pour leur bonne humeur et les bons moments que j'ai passé en leur compagnie. Je tiens à remercier Anne-Sophie pour son aide précieuse et son concours à mes travaux. Merci à Gabriel pour le clone HEK-293_{M8}, ses conseils et critiques qui m'ont permis d'avancer dans mon travail. Merci à Olivier et Matthieu V. pour avoir mis un peu de Rock dans cette thèse, musicien moi-même j'ai adoré découvrir de nouveaux groupes grâce à vous. Agathe, je pense que le gardien de nuit de Westminster se souviendra à jamais de notre visite. Hélène, merci pour toutes nos discussions depuis « la marche », je me souviendrai toujours de nos duels et de nos rires. Sandra et Leïla, les *Derouiche Sisters*, nous nous sommes rencontrés sur la fin mais j'en suis fort enchanté. Enfin deux personnes de bons goûts. Sandra, je ne serais trop te dire un énorme *Gambatene* ! pour la suite de ta thèse. Slava, merci pour ta gentillesse, pour les invitations à dîner, pour t'être préoccupé de moi en certaines occasions difficiles. Merci à toi Fabien pour ton flegme éternel, ta bonne humeur et tes conseils. Mirto, ma coauteur préférée, merci d'être la scientifique grecque la plus rayonnante que je connaisse, pour tes chansonnettes douces et mélodieuses et ton aide dans mes recherches.

Loïc, Sensei, je n'aurais pas assez de mots de vocabulaire pour traduire ma gratitude envers toi et le plaisir que j'ai eu à te côtoyer. Tu as toujours été là quand ça n'allait pas, tu m'as

aidé, remonté le moral, chambré, fait rire et tu m'as fait découvrir tant de choses en musique, cinéma et littérature. Tu m'as aussi beaucoup appris en électrophysiologie, tu as toujours eu un regard critique sur mes résultats et je t'en remercie car cela m'a grandement permis de m'améliorer. Tout ça pour te dire que même si en cette fin de thèse j'ai plus de genoux, je ne bluffe pas sur le plaisir renouvelé de ta compagnie. J'espère continuer à avoir le privilège de ton amitié et j'attends avec impatience ta visite lorsque je serais en post-doc.

A ceux avec qui j'ai collaboré :

Monsieur le Pr. Alexander Zholos, merci de m'avoir fait découvrir les techniques de canal unitaire. Le temps que j'ai passé avec vous au poste de patch m'a beaucoup appris. J'espère bientôt travailler de nouveau avec vous.

Mme le Dr. S. Deloof, Mr. Le Pr. J. Brocard, Mr le Dr. C. Biot et Mme le Dr. L. Pelinski, merci pour le temps que vous avez consacré à mes travaux de recherches. Certains développements de cette thèse sont le fruit de discussions et d'aides que vous m'avez apportées.

A ma famille :

Merci pour avoir toujours été là pour moi, pour votre aide et vos encouragements. Merci de m'avoir supporté dans mes périodes d'angoisse d'avant examen ou quand les manip n'allaient pas. Petit frère de moi, tu as fait exprès d'être Docteur avant moi, tu me le paieras. Tu es un croisement entre Jiminy Cricket et Garfield. Si des fois je trouve qu'il en est certain qu'on devrait laisser à la caisse des dépôts et consignations, je ne t'échangerai pour rien au monde.

A mes amis :

Cette thèse est aussi en l'honneur du groupe de DEUG SV44 : Greg, Jacques-Edouard, Julie, Delphine, Dorothée, Julie, Christelle, Arnaud. Les années de fac avec vous ont été les meilleures années. Vous me manquez tous même si je ne suis pas prolix pour donner de mes nouvelles. Vous comptez tous énormément pour moi.

A mes amis qui ont façonné ma vie : Stéphane et Gaëllou.

A mon poste de Patch-clamp :

Je n'aurais jamais pu faire tout ce travail sans toi. Tu m'as accompagné pendant mon DEA et toute ma thèse. Je t'ai adoré, je t'ai détesté, je t'ai réparé avec l'aide de Roman. Tu me réserves toujours de nouvelles surprises quand je t'allume. Si certains doutent des phénomènes étranges et paranormaux, tu m'as, en plusieurs occasions, prouvé que tu es vivant. Si tu fais peur à certains, tu acceptes que je te dompte. Tu me manqueras lorsque je serais en post-doc.

Enfin merci à Madeleine Paulmier pour sa géniale invention qui m'a permis de tenir tout au long de la rédaction de ce manuscrit.

Sommaire

Glossaire	16
Introduction	20
I. Les canaux ioniques	20
I. A. Historique	20
I. B. Définition et rôle des canaux ioniques	22
I. C. Diversité, propriétés structurales et classification des canaux ioniques	22
I. C. 1. Diversité	22
I. C. 2. Une famille remarquable : la superfamille des canaux TRP	25
I. C. 2. a) Historique	26
I. C. 2. b) Classification des canaux TRP	26
I. C. 2. c) Structure générale des canaux TRP	28
I. C. 3. Principales propriétés et structures des canaux ioniques	30
I. C. 3. a) La sélectivité	30
I. C. 3. b) le gating	33
I. C. 4. Classification des canaux ioniques en fonction du stimulus d'activation	35
I. C. 4. a) ROC	35
I. C. 4. b) VOC	35
I. C. 4. c) SMOC	36
I. C. 4. d) SOC	36
I. C. 4. e) Chanzymes	39
I. C. 4. f) Les mécanorécepteurs MOC	40
I. C. 4. g) Les thermorécepteurs TOC	42
I. C. 4. h) Les canaux polymodaux	44
II. Canalopathies	45
II. A. Définition	45
II. B. Classification	45
II. C. Principaux types de canalopathies	47
II. C. 1. Les canalopathies génétiques	47
II. C. 2. Les canalopathies acquises	47
II. C. 3. Les canalopathies transcriptionnelles	49
II. C. 4. Les canalopathies dues à un défaut d'adressage (« trafficking »)	50
II. C. 5. Les canalopathies dues aux isoformes des canaux ioniques par épissage alternatif (« splice variants »)	51
II. C. 6. Les canalopathies dues aux protéines partenaires et voies régulatrices intracellulaires	51
III Implication des canaux TRP dans la physiopathologie	53
III. A. Rôle des canaux TRP dans la physiologie des sens	53
III. A. 1. La vue	53
III. A. 2. L'oreille interne et l'ouïe	54
III. A. 3. Le goût	55
III. A. 3. a) TRPM5 et les saveurs amères, sucrées et « unami »	55
III. A. 3. b) La détection des saveurs acides et salées	56
III. A. 3. c) La perception gustative des lipides alimentaires	56
III. A. 3. d) Perception de l'assaisonnement	58

III. A. 4. L'olfaction	58
III. A. 5. Les TRP et la perception cutanée	59
III. B. TRPpathies	61
III. B. 1. TRPML1 et la mucopolysaccharidose de type IV	61
III. B. 2. TRPM6 et l'hypomagnésémie avec hypocalcémie secondaire	62
III. B. 3. TRPP2 et la ADPKD	62
III. B. 4. TRPC6 et la sclérose glomérulaire segmentaire focale	63
III. B. 5. TRP et cancers	63
III. B. 5. a) TRPM1 et le mélanome	63
III. B. 5. b) TRPV6, TRPM8 et cancer : cas de la surexpression de gènes	64
IV. TRPM8	66
IV. A. Découverte et structure	66
IV. B. Modes d'activation	67
IV. B. 1. La température	67
IV. B. 2. Les agonistes	69
IV. B. 2. a) Activation par l'iciline et régulation par le calcium extracellulaire	70
IV. B. 2. b) Activation par le menthol	71
IV. B. 3. Les antagonistes	71
IV. B. 4. Régulation de TRPM8 par le pH	72
IV. B. 5. Régulation de TRPM8 par le PIP2	72
IV. B. 6. Régulation de TRPM8 par la PKC	73
IV. B. 7. Régulation de TRPM8 par la iPLA2 et ses produits de dégradation	73
IV. B. 8. Désensibilisation de TRPM8 par l'iciline	75
IV. C. Distribution tissulaire de TRPM8 et implications dans la physiopathologie ..	78
IV. C. 1. Profil d'expression de TRPM8	78
IV. C. 2. TRPM8 au niveau sensoriel	78
IV. C. 2. a) Localisation	78
IV. C. 2. a) i. Au niveau trigéminal	79
IV. C. 2. a) ii. Au niveau des DRG	80
IV. C. 2. b) Souris KO TRPM8 : preuve de l'implication du canal dans la sensation de froid	81
IV. C. 2. c) Rôle de TRPM8 dans la nociception	82
IV. C. 2. c) i. implication de TRPM8 dans l'allodynie au froid	82
IV. C. 2. c) ii. TRPM8 : allodynie ou analgésie ?	83
IV. C. 3. TRPM8 et la prostate	85
IV. C. 3. a) La prostate : définition et localisation	85
IV. C. 3. b) Le cancer de la prostate	86
IV. C. 3. c) Les androgènes	86
IV. C. 3. c) i. Biosynthèse	87
IV. C. 3. c) ii. Transport des androgènes dans le compartiment plasmatique	89
IV. C. 3. c) iii. Métabolisme de la testostérone	89
IV. C. 3. c) iv. Catabolisme des androgènes	89
IV. C. 3. d) Les besoins cliniques	90
IV. C. 3. d) i. Recherche de nouveaux traitements	90
IV. C. 3. d) ii. Recherche de nouveaux marqueurs diagnostiques	90
IV. C. 3. e) Découverte d'un nouveau marqueur diagnostique	90
IV. C. 3. f) Localisation subcellulaire de TRPM8 en fonction des stades de cancer	91

IV. C. 3. g) Implication de TRPM8 dans la survie cellulaire	93
<u>Problématique</u>	95
<u>Matériels et méthodes</u>	97
I. La culture cellulaire	97
I. 1. Les lignées cellulaires	97
I. 1. a) La lignée HEK-293M8	97
I. 1. b) Les neurones sensoriels.....	99
I. 1. c) La lignée PC-3 (Prostate Carcinoma)	99
I. 1. d) La lignée LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate)	99
I. 2. Les conditions de culture.....	99
I. 3. L'induction de l'expression de TRPM8 dans les cellules HEK-293M8.....	100
II. Transfections réalisées	100
II. 1. La transfection transitoire : nucléofection	100
II. 2. L'établissement d'une lignée stable HEK-293 _{M8}	101
III. Les études fonctionnelles	101
III. 1. Le patch-clamp	101
III. 1. a) Définition.....	101
III. 1. b) Principe	101
III. 1. c) Les configurations de patch-clamp.....	102
III. 1. d) L'appareillage	105
III. 1. e) Les solutions utilisées	107
III. 1. f) Protocoles de stimulation et caractéristiques du courant TRPM8	108
III. 2. Les expériences in vivo	110
III. 2. a) les animaux.....	110
III. 2. b) Test de préférence de plaques (cold avoidance)	111
III. 2. c) Test d'immersion de la queue	111
<u>Résultats</u>	113
I. Article 1 : Testosterone is a key regulator of TRPM8-mediated cold perception ...	113
II. Article 2 : TRPM8 regulation by alpha2A adrenoceptors	153
III. Article 3 : Régulation du canal TRPM8 par les récepteurs muscariniques	178
IV. Article 4 : Régulation complexe du canal cationique TRPM8 au sein des cellules épithéliales prostatiques : implication de ce canal ainsi que de sa régulation androgénique non génomique dans la migration cellulaire.....	187
<u>Discussion</u>	198
I. Régulation non génomique de TRPM8 par les androgènes.....	198
I. 1. Adéquation de notre effet avec les critères définissant un effet non génomique : ..	201
I. 1. a) Les critères	201

I. 1. b) Concernant les trois premiers critères.....	202
I. 1. c) Le quatrième critère : existe-t-il un récepteur aux androgènes membranaires ?	202
I. 2. Identification du récepteur membranaire aux androgènes	205
I. 2. a). Cas de figure « A II a »	205
I. 2. b) Cas de figure « A II b »	206
I. 3. Origine de la spécificité androgénique	207
I. 4. Voie de signalisation intracellulaire des androgènes	209
I. 5. Rôle de cette régulation non génomique au niveau sensoriel.....	209
II. Régulation du canal TRPM8 par les récepteurs alpha2A adrénergiques	212
II. 1. Inhibition du canal TRPM8 par les récepteurs alpha2A adrénergiques couplés aux protéines Gi et voie de transduction associée	213
II. 2. Rôle de la régulation alpha2A adrénergique de TRPM8 au niveau sensoriel : l'allodynie au froid.....	215
II. 3. La voie de transduction intracellulaire Gi/AC/cAMP/PKA : une nouvelle voie de régulation physiologique de TRPM8.....	216
III. Régulation du canal TRPM8 par les récepteurs muscariniques	217
III. 1. Inhibition de l'activité de TRPM8 par un agoniste muscarinique : l'oxotrémorine-M	217
III. 1. a) Détermination de la ou des voie(s) de transduction mise(s) en jeu	217
III. 1. b) Mécanismes d'activation possibles de la cPLA2	218
III. 1. c) Qu'en est-il des lysophospholipides ? De la iPLA2 ?	220
III. 2. Implication des récepteurs muscariniques dans la nociception.....	221
IV. Régulation complexe de TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques ...	223
IV. 1. Régulation génomique et non génomique de TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques	223
IV. 1. a) Quel est récepteur non génomique aux androgènes dans les cellules prostatiques ?.....	223
IV. 1. b) Rôle du canal TRPM8 au niveau prostatique.....	224
IV. 1. b) i. TRPM8 et l'homéostasie calcique	224
IV. 1. b) ii. Double localisation de TRPM8.....	224
IV. 1. c) Rôle de la double régulation de TRPM8, génomique et non génomique, dans les cellules épithéliales prostatiques.....	225
IV. 1. c) i. Rôle de la voie génomique de régulation de TRPM8.....	227
IV. 1. c) ii. Rôle de la voie non génomique de régulation de l'activité de TRPM8	227
IV. 1. d) Rôle de TRPM8 et de sa régulation non génomique dans la migration des cellules prostatiques	228
IV. 2. Rôle de la modulation de l'activité de TRPM8 par la voie alpha2A adrénergique dans les cellules prostatiques	229
IV. 3. Rôle de la modulation de l'activité de TRPM8 par la voie muscarinique dans les cellules prostatiques	229
IV. 4. TRPM8 est-il alors bon ou mauvais pour la prostate ?.....	230

<u>Perspectives</u>	231
I. Recherche du récepteur aux androgènes membranaire impliqué dans l'inhibition non génomique de TRPM8	231
II. Origine du dimorphisme sexuel vis-à-vis de la sensibilité au froid	231
III. Rôle des voies de régulation PKA dépendante sur l'activité d'autres canaux TRP sensibles à cette kinase intracellulaire	232
IV. Implication des voies de régulation non génomique, alpha2A adrénergique et muscarinique dans la douleur	233
<i>IV. 1. L'hyperalgésie au chaud</i>	233
<i>IV. 2. L'allodynie au froid et le modèle de lésions/constrictions de nerfs sensitifs (CCI)</i>	233
V. Perspectives pour la physiopathologie prostatique	234
<u>Conclusion générale</u>	237
Schéma récapitulatif final	238
<u>Publications</u>	240
<u>Bibliographie</u>	241

Glossaire

2-APB:	2-aminoethoxydiphenyl borate
4 α -PDD:	4 α -phorbol 12,13-didecanoate
AACOCF3	arachidonyl trifluoromethyl k�tone
AC :	Adénylate Cyclase
Ach :	Acétylcholine
ADP:	Adénosine diphosphate
ADPKD:	<i>Autosomal dominant polycystic kidney disease</i>
AND / DNA:	Acide DésoxyriboNucléique
ARNm:	Acide ribonucléique messenger
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP:	Adénosine triphosphate
BCTC:	<i>N</i> -(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1(2 <i>H</i>)-carboxamide
Ca ²⁺ :	Calcium
cADPR:	ADP ribose cyclique
cAMP :	Cyclic adenosine monophosphate
CCI:	Chronic/Constrictive nerve Injury
CGRP :	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CIF:	Calcium influx factor
CMR-1:	<i>Cold Menthol Receptor - 1</i>
cPLA2:	Phospholipases A2 calcium-dépendante
DAG:	Diacylglyc�rol
DHEA :	D�hydro�piandrost�rone
DHPR :	Récepteurs aux dihydropyridines
DHT:	Dihydrotestostérone
DRG:	<i>Dorsal Root Ganglia</i> (ganglion rachidien dorsal)
EC ₅₀ :	Effective Concentration
ECC :	Entrée Capacitative de Calcium
EDTA:	EthyleneDiamineTetraacetic Acid
ENac :	<i>Epithelial Sodium channel</i>
ERG:	Electror�tinogramme

GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine
GPCR:	<i>G Protein Coupled Receptor</i>
GTP:	Guanine triphosphate
HEK-293:	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
HEPES:	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethanesulfonic acid])
HERG:	<i>Human ether-a-gogo related gene</i>
hK2 :	<i>Human kallikrein 2</i>
HSH:	Hypomagnésie avec hypocalcémie secondaire
IBMX:	Isobutylmethylxanthine
IP3:	Inositol triphosphate
iPLA2:	Phospholipases A2 calcium-indépendante
ipRGC:	<i>Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells</i>
I-RTX:	5'-iodoresiniferatoxin
K ⁺ :	Potassium
KO :	<i>Knock out</i>
LDL:	Low-density lipoprotein
LH :	<i>Luteinizing Hormone</i>
LNCaP:	<i>Lymph Node Carcinoma of the Prostate</i>
LPC:	Lysophosphatidylcholine
LPI:	Lysophosphatidylinositol
MAPK :	Mitogenic Activated Proteins Kinase
mGluR:	Récepteurs au glutamate membranaire
MIC :	<i>Magnesium-Inhibited Cation channels</i>
MOC:	<i>Mechanical-operated channel</i>
MR :	Récepteur muscarinique
Msc :	MécanoSensitif à Large Conductance
Na ⁺ :	Sodium
NAD:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NGF:	<i>Nerve Growth Factor</i>
NUDIX :	<i>Nucleotide Diphosphate linked to X</i>
ORAI :	ou CRACM: calcium release-activated calcium channel protein
Oxo-M	oxotrémorine méthiodide
PA:	Potentiel d'Action

PAP:	<i>Prostate acid phosphatase</i>
PBR:	<i>Peripheral benzodiazepine receptor</i>
PC-3:	<i>Prostate carcinoma</i>
PDK1 / PDK2:	<i>Polycystic Kidney Disease</i>
PI3Kinase :	Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PIP2:	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates
PKA :	Protéine kinase A
PKC:	Protéine Kinase C
PLC:	Phospholipase C
PM :	Plasma Membrane / Plasmalemma
PSA:	<i>Prostate-specific antigen</i>
PSMA:	<i>Prostate-specific membrane antigen</i>
PTX	toxine pertussique
Q10:	Coefficient de Van't Hoff
RA / AR:	Récepteur aux androgens / Androgen receptor
RE:	Réticulum Endoplasmique
ROC:	<i>Receptor-operated channel</i>
RT-PCR :	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
SCN5A:	<i>Sodium channel voltage-gated type V alpha subunit</i>
SERCA :	Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase
SiARN :	Small interfering ARN
SMOC:	<i>Second messenger-operated channel</i>
SOC:	<i>Store-operated channel</i>
SOCE:	<i>Store-Operated Calcium Entry</i>
stAR :	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
STIM:	STromal Interacting Molecule
T1R/T2R:	<i>Taste Receptor 1 et 2</i>
TG :	Thapsigargine
TOC:	<i>Temperature-operated channel</i>
TRAAK:	<i>TWIK1-related arachidonic acid sensitive. K⁺ channel</i>
TREK:	<i>TWIK-related two-pore domain potassium channel</i>
TRP:	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRPA1:	<i>Transient Receptor Potential ANKTMI</i>
TRPC:	<i>Transient Receptor Potential Canonical</i>

TRPL:	Canal TRP-like
TRPM:	<i>Transient Receptor Potential Melastatin</i>
TRPML:	<i>Transient Receptor Potential Mucolipin</i>
TRPN:	<i>Transient Receptor Potential NOMPC</i>
TRPP:	<i>Transient Receptor Potential Polycystin</i>
TRPV:	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid</i>
VOC:	<i>Voltage-operated channel</i>
WS-12 :	2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (4-methoxy-phenyl)- amide
α 2A-AR :	alpha2a adrénorécepteur
β -AR :	béta adrénorécepteur

I. Les canaux ioniques

I. A. Historique

Si le concept de canaux ioniques paraît être évident pour la communauté scientifique actuelle, il en était tout autrement il y a encore un demi siècle. L'historique de cette notion démarre et reste lié à l'évolution de celles de potentiels d'action et de membrane.

L'histoire des canaux ioniques commence dès 1902 lorsque Julius Bernstein (1839 – 1917), se basant sur les travaux antérieurs de Luigi Galvani (1737 – 1798), Alessandro Volta (1745 – 1827) et Emil Heinrich du Bois-Reymond (1818 – 1896), émet l'hypothèse du potentiel de membrane. En effet, sa théorie propose que la membrane d'une fibre musculaire au repos ou d'un nerf est polarisée. Il décrit la face extracellulaire de la membrane plasmique comme chargée positivement alors que la face interne le serait négativement. Le potentiel d'action ne serait alors pas un phénomène d'origine chimique (comme le pensaient ses prédécesseurs) mais une dépolarisation propagée le long de la membrane des cellules excitables.

Julius Bernstein, profitant des récentes avancées de Walther Nernst (1864 – 1941), décrivait la membrane des cellules au repos comme étant perméable sélectivement aux ions potassium. Le potentiel de membrane serait alors, au repos, créé par la diffusion passive de ces ions potassiques au travers de la membrane et égal au potentiel d'équilibre du potassium ou potentiel de Nernst. Même si aujourd'hui nous savons que la régulation du potentiel de membrane ainsi que la génération d'un potentiel d'action ne sont pas uniquement dus aux ions potassium, Julius Bernstein, dès le début du 20^{ème} siècle, posait les premières pierres de la diffusion passive des ions au travers des membranes biologiques selon leur gradient électrochimique par les canaux ioniques.

Pour que la notion de canaux ioniques fasse son apparition, il faudra attendre une cinquantaine d'années, une avancée technique majeure dans l'électrophysiologie ainsi que les travaux des deux chercheurs britanniques, Sir Andrew Fielding Huxley (1917 –) et Sir Alan Lloyd Hodgkin (1914 – 1998). Ces deux scientifiques ont été récompensés en 1963 par le prix Nobel de Médecine et de Physiologie, pour leurs études sur l'axone géant de calmar au moyen de la technique de voltage imposé. Ces travaux font suite à ceux de l'américain Kenneth Cole (1900 – 1984) qui, dans les années 1940, mis au point cette technique qui permis à Hodgkin et Huxley de démontrer que la génération d'un potentiel d'action était due à une modification de perméabilité de la membrane aux ions sodium et potassium. Ils retirèrent de leurs expériences que ces modifications de perméabilité (en des termes actuels, de conductance) étaient dépendantes du voltage et postulèrent l'existence de canaux ioniques. Ces structures, selon

leurs observations expérimentales, permettraient le passage d'ions à haut débit en suivant leur gradient de concentration. Chacun de ces canaux seraient sélectifs d'un ion donné et capables de détecter les variations du potentiel de membrane (voltage-dépendant).

Même si la notion de canaux ioniques reste à ce moment là une spéculation, les travaux d'Alan L. Hodgkin et d'Andrew F. Huxley ont permis d'accélérer grandement l'évolution de l'électrophysiologie.

La technique de voltage imposé présentait cependant des limites. Effet d'une part, elle ne permettait de mesurer que le courant global, c'est-à-dire transitant par les milliers de canaux de la membrane plasmique. D'autre part, cette technique utilisait deux électrodes métalliques insérées dans l'axone géant de calmar ou deux microélectrodes au travers de la membrane plasmique des cellules animales ou végétales les plus grosses. Dans de telles conditions, il était impossible d'enregistrer l'activité et donc d'obtenir une preuve directe de l'existence des canaux ioniques. Mais en 1976, deux chercheurs allemands de l'Institut Max Planck de Göttingen, Erwin Neher (1944 –) et Bert Sakmann (1942 –) développèrent une technique de voltage imposé (voltage *clamp*) adaptée aux fragments (*patch*) de membranes plasmiques. Ils reçurent en 1991 le prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour cette technique : le patch-clamp (voir matériels et méthodes). Il est alors possible d'enregistrer l'activité d'un seul canal ionique grâce à la configuration « cellule attachée ». Plus tard, d'autres configurations permettant l'enregistrement de l'activité de tous les canaux de la membrane plasmique (« cellule entière ») ou d'un seul canal (« inside out » et « outside out ») sont venues s'ajouter à la panoplie des possibilités qu'offre cette technique.

A partir de cette avancée technologique majeure, de nombreux travaux vont venir confirmer les hypothèses et résultats de Hodgkin et Huxley. De nouvelles familles de canaux seront découvertes et leurs mécanismes d'activation et de régulation vont être pas à pas décortiqués et étudiés.

Par la suite, les techniques de biologie moléculaire et cellulaire ont été associées à la technique de patch-clamp. Il est dorénavant possible de séquencer, muter et faire exprimer un canal donné dans un modèle cellulaire afin d'en étudier les sites de régulation, de phosphorylation, de liaison avec un ligand, d'association entre sous unité ou avec d'autres protéines... L'électrophysiologie moléculaire était née.

I. B. Définition et principaux rôles des canaux ioniques

Les canaux ioniques sont des complexes protéiques transmembranaires facilitant le passage des ions au travers de la membrane plasmique mais aussi des membranes des organites intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, les mitochondries ou encore le noyau. Ils forment des pores de 3 à 5 Å de diamètre par lesquels transitent les ions. La vitesse de diffusion des ions au travers de ces structures peut atteindre 10^7 voir 10^8 ions par seconde.

Les canaux ioniques sont des éléments vitaux de l'activité cellulaire. Le flux d'ions au travers des membranes, permis par ces structures, est à l'origine de propriétés physiologiques importantes :

- Les mouvements d'ions, principalement sodiques et potassiques, au travers des canaux de la membrane plasmique sont à l'origine de la création et du maintien d'un potentiel de membrane ou potentiel de repos.
- Les canaux ioniques constituent la base de l'excitabilité cellulaire. L'ouverture des canaux sodiques, potassiques et calciques voltage-dépendants et les flux d'ions qui les traversent permettent de générer des potentiels d'action dans les cellules excitables.
- Le flux net d'ions au travers de la membrane est impliqué dans la régulation de l'équilibre osmotique.
- Les mouvements de protons H^+ par ces structures régulent le pH intracellulaire.
- Dans les cellules non excitables, le calcium est un second messager intracellulaire régulant la prolifération, la sécrétion, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire. Les variations de l'homéostasie calcique par influx et efflux de calcium au travers des canaux calciques membranaires (plasmiques, réticulaires, mitochondriaux) auront des conséquences physiologiques importantes.

Par exemple, écrire une thèse fait appel à des canaux ioniques au niveau des yeux pour la lecture de la littérature et au niveau du cerveau pour retenir et synthétiser les informations lues.

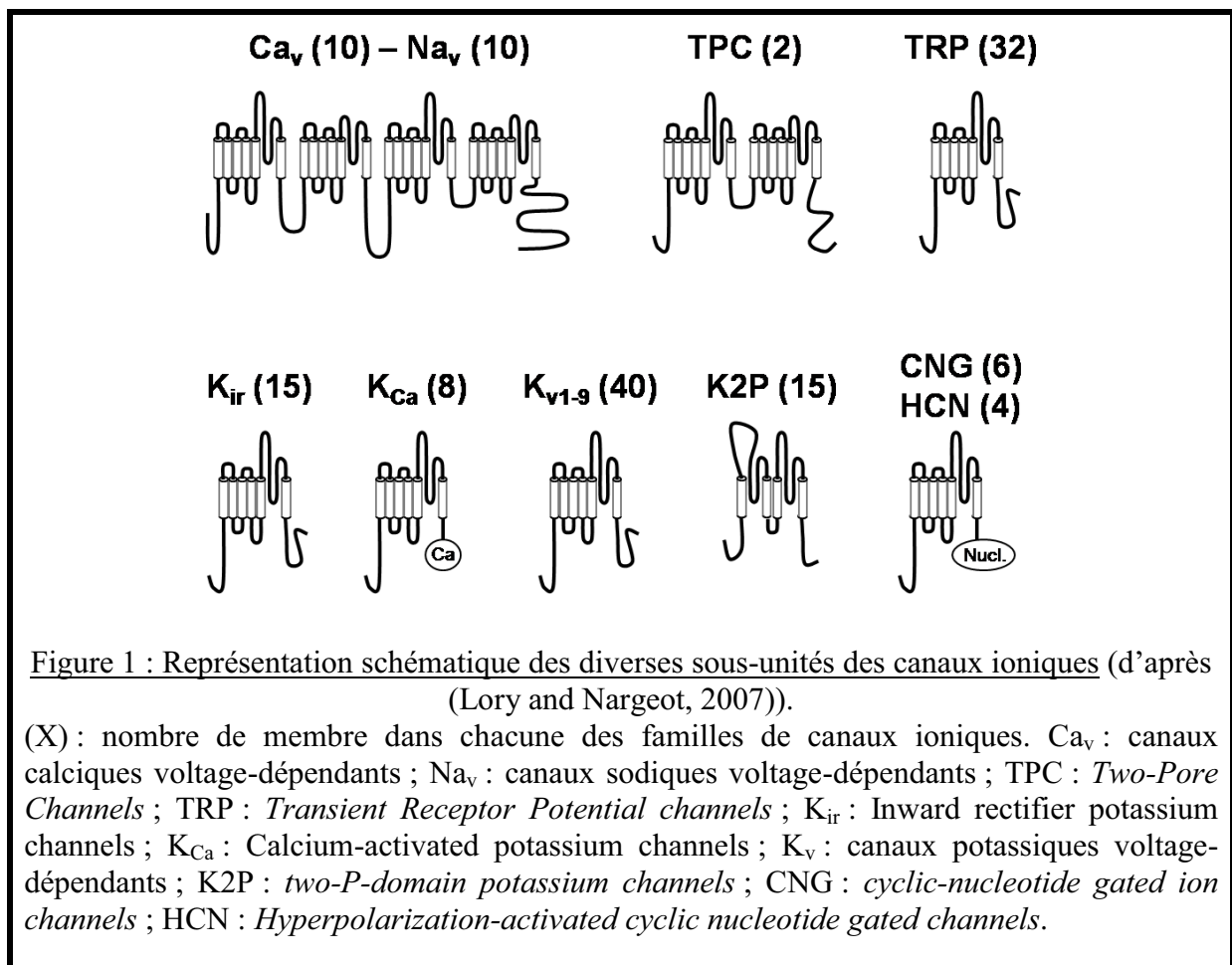
I. C. Diversité, propriétés structurales et classification des canaux ioniques

I. C. 1. Diversité

Grâce aux avancées dans l'électrophysiologie moléculaire, de nombreuses découvertes ont été réalisées dans l'identification de nouvelles familles de canaux ioniques et de leurs

mécanismes d'activation, de régulation et leur sélectivité. Les canaux ioniques représentent une superfamille de plus de 150 membres identifiés à ce jour. C'est la superfamille la plus étendue après celles des protéines kinases (~500 membres) et des récepteurs couplés aux protéines G (~400 membres) (Lory and Nargeot, 2007).

A l'heure actuelle, il a été identifié des familles de canaux ioniques portant des courants pour les quatre ions majoritaires : Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- . La figure 1 présente quelques unes de ces familles avec une schématisation des sous unités qui les composent. Elles sont classées en fonction du type d'ion dont elles assurent sélectivement le transit. Il est à noter que tous les canaux ne sont pas sélectifs d'un type d'ion donné. Il existe des familles de canaux, tels que la superfamille des canaux TRP (*Transient Receptor Potential*), dont certains membres sont moins sélectifs, ils sont définis comme cationiques non sélectifs. La figure 1 permet de souligner les éléments structuraux communs qui composent ces canaux : des segments transmembranaires en hélice α entourant une boucle P (boucle à la fois extracellulaire et membranaire séparant, pour les canaux TRP par exemple, les segments transmembranaires S5 et S6).



Afin de souligner la diversité des familles de canaux ioniques, nous présentons en figure 2, un arbre phylogénétique des canaux voltage-dépendants traduisant l'évolution et l'apparition de cette diversité à partir d'un canal ionique ancestral. Dans le même esprit, la figure 3 propose quelques arbres phylogénétiques de familles de canaux ioniques.

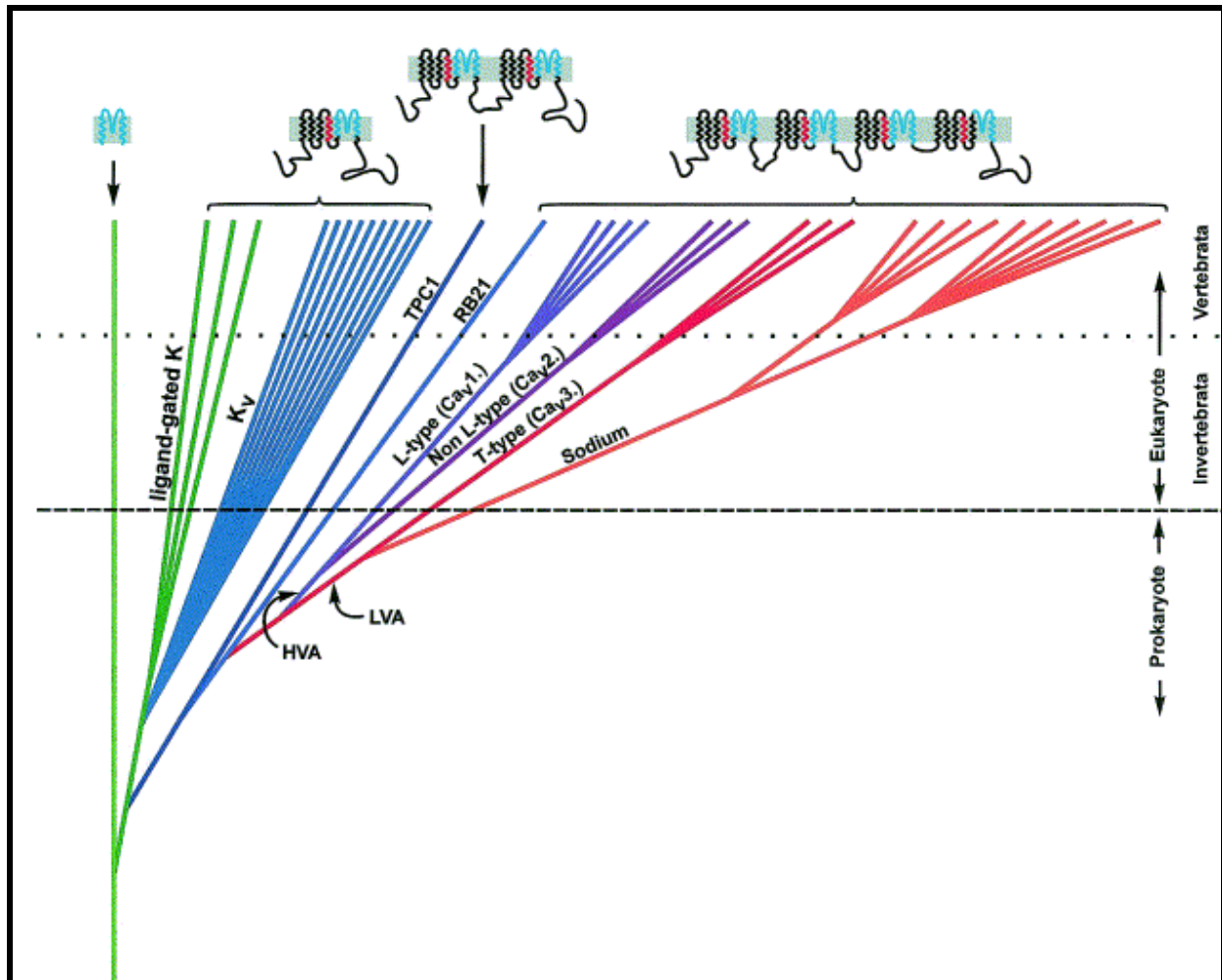
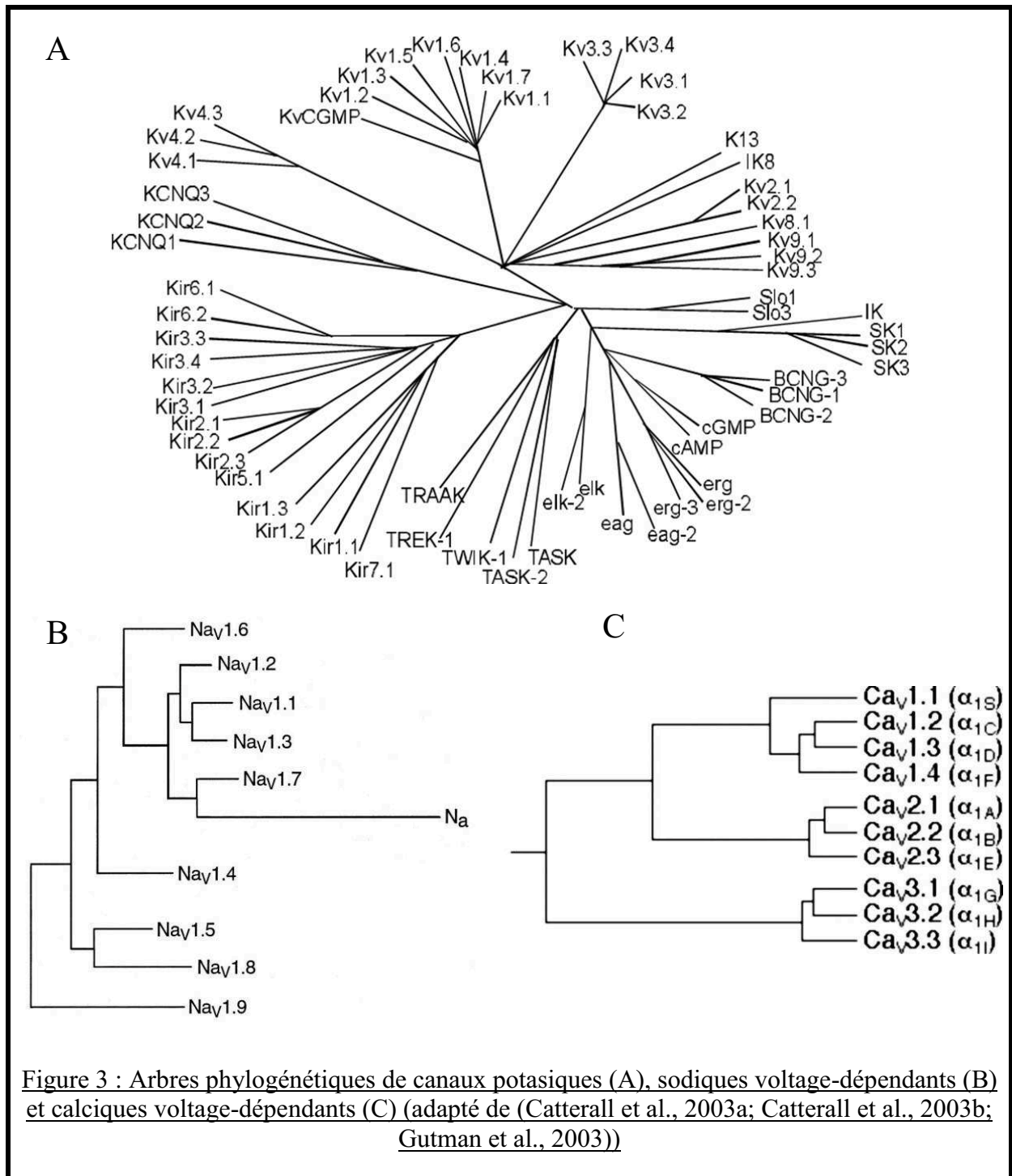


Figure 2 : Arbre phylogénique hypothétique de canaux voltage-dépendants (Anderson and Greenberg, 2001).

Les auteurs de cet arbre proposent que les canaux ioniques dérivent d'un canal ancestral procaryote à deux domaines transmembranaires. Par addition de domaines transmembranaires au cours de l'évolution, il y a apparition des sous arbres de canaux potassiques, calciques et sodiques voltage-dépendants dont les ramifications se complexifient pour les vertébrés. Abréviations : HVA : High voltage-activated ; LVA : Low voltage-activated ; K_v : canaux potassiques voltage-dépendants ; Ca_v : canaux calciques voltage-dépendants ; TPC : *Two-Pore Channels* ; RB21 : *four repeat protein related to voltage-gated sodium and calcium channels*.



Vu le sujet de cette thèse, nous allons plus en détails décrire l'une de ces familles de canaux ioniques, la superfamille des canaux TRP (*Transient Receptor Potential*).

I. C. 2. Une famille remarquable : la superfamille des canaux TRP

I. C. 2. a) Historique

Le sigle TRP apparaît pour la première fois dans une étude réalisée par Baruch Minke de l'Université de Jérusalem en 1977. Cette étude repose sur les résultats des électrorétinogrammes (ERG) obtenus sur des mutants de la Drosophile présentant une altération du processus de photo transduction. Cette technique consiste à enregistrer l'activité électrique oculaire du nerf optique suite à une stimulation lumineuse prolongée. Dans des conditions normales, la rétine de la drosophile répond à cette stimulation par une dépolarisation soutenue. Dans le cas des mutants, la réponse obtenue s'avère transitoire et la mutation conduit à la cécité (Minke, 1977). Chez la drosophile, le pigment responsable de la photo-sensibilité est la rhodopsine. C'est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G_q , qui elle-même régule positivement l'activité d'une phospholipase membranaire, la PLC_β (ou PhosphoLipase C beta) Cette enzyme est responsable de l'ouverture d'un canal ionique membranaire impliqué dans la transduction de l'information lumineuse. Chez les mutants, les travaux de Minke démontrent que le gène de ce canal est muté. Ce gène est alors baptisé *trp* pour « **T**ransient **R**eceptor **P**otential » en raison du caractère transitoire de la dépolarisation enregistrée par l'ERG chez les mutants.

Différents travaux ont ensuite démontré que le canal TRP fonctionnait en synergie avec un canal TRP-Like (TRPL) chez la drosophile (Montell, 1997; Xu et al., 1997). Les recherches se sont portées sur la caractérisation des orthologues des canaux TRP et TRPL chez les mammifères. Dans un premier temps, sept gènes furent clonés auxquels plus de vingt furent ajoutés en quelques années (pour revues (Montell, 2001; Montell et al., 2002)). Il faut également ajouter à ce nombre la possibilité d'ARNm alternatifs pour certains canaux TRP, ce qui augmente considérablement le nombre de protéines à classer dans cette superfamille (Vazquez and Valverde, 2006).

I. C. 2. b) Classification des canaux TRP

Trente deux gènes ont été découverts chez les mammifères. En utilisant un critère d'homologie de séquence, il est possible de les regrouper en 7 sous-familles (figure 4) :

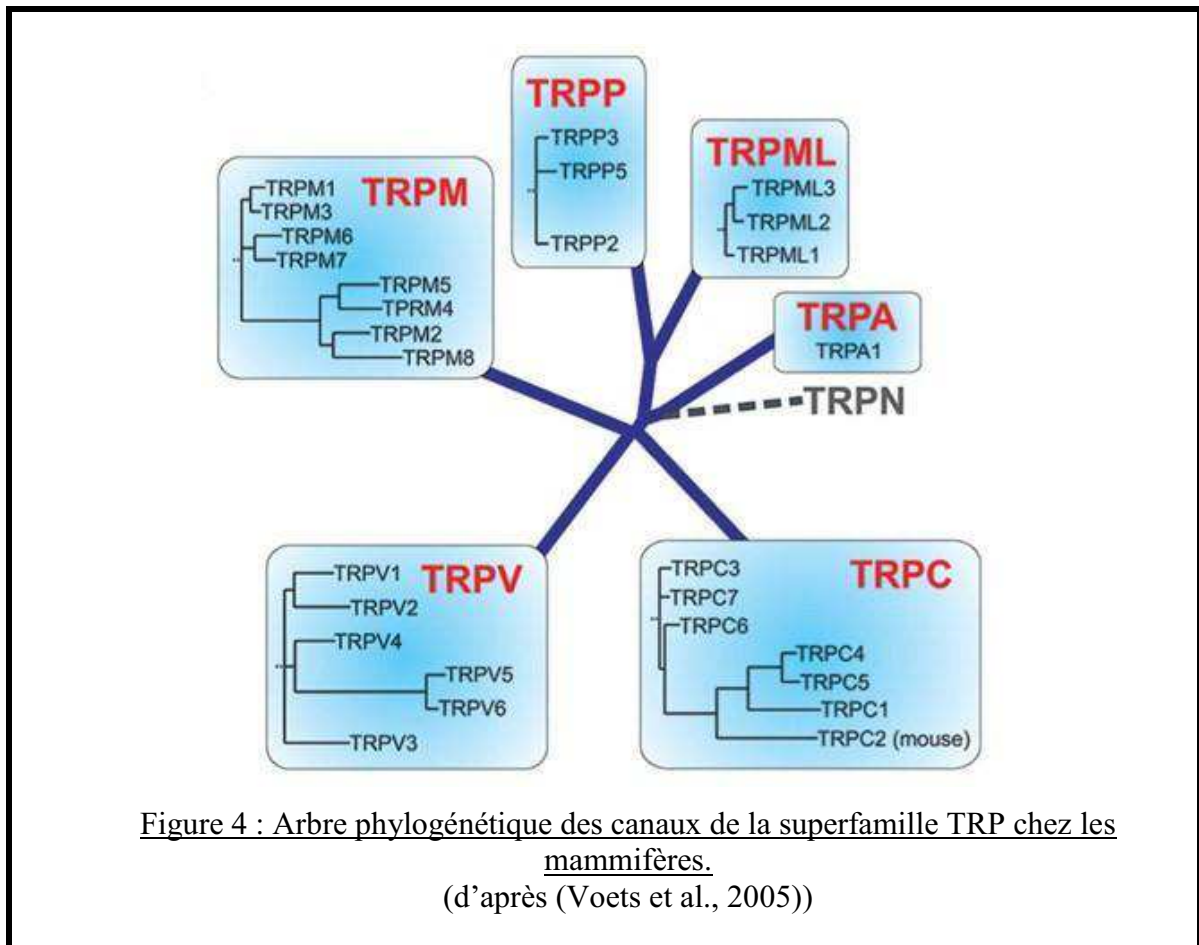
- TRPC pour Canonique ou Classique (7 membres) en référence à leur forte homologie avec le canal TRP originel identifié chez la drosophile (pour revue (Montell, 2005)).
- TRPV pour Vanilloïde (6 membres) en référence au premier canal de cette famille identifié : TRPV1. Ce canal est en effet activé par la capsaïcine, principal composant

irritant du piment rouge (*capsicum*) et membre de la famille des vanilloïdes (pour revue (Montell, 2005)).

- TRPM pour Melastatine (8 membres) également en référence au premier canal de cette famille identifié, à savoir TRPM1 ou « Melastatine ». Ce canal fut initialement cloné à partir d'une lignée murine de mélanome (pour revue (Montell, 2005)).

A ces trois principales sous-familles de canaux TRP viennent s'ajouter de nouvelles sous-familles dont l'homologie de séquence beaucoup plus faible est restreinte à quelques segments transmembranaires. Cependant leur organisation membranaire suggère que ces protéines appartiennent à la superfamille des TRP.

- TRPML (3 membres) pour « MucoLipines » (pour revue (Montell, 2005)).
- TRPP (5 membres) issus à l'origine de deux gènes *polycystic kidney diseases 1* et *2* (PKD1 pour TRPP1, et PKD2 pour TRPP2) regroupent actuellement cinq membres chez l'Homme (pour revue (Montell, 2005)).
- TRPN (1 membre) qui ne comprend actuellement aucun membre chez l'Homme et se distingue des autres TRP par la présence au niveau de son extrémité aminotermine de nombreux domaines ankyrines répétés (pour revue (Montell, 2005; Venkatachalam and Montell, 2007)).
- TRPA1 (ou « ANKTM1 »), un membre éloigné de la famille TRP (Story et al., 2003).



I. C. 2. c) Structure générale des canaux TRP

De part l'analyse de leurs séquences, en analogie avec les canaux potassiques voltage-dépendants, et mis en évidence pour la première fois pour les canaux TRPV1 par des expériences de *western-blot* en condition non dénaturante, les canaux de la superfamille TRP sont organisés en tétramères (Kedei et al., 2001). Ils peuvent être le résultat de la combinaison de quatre sous-unités ou monomères de même type (homotétramère) comme TRPM8 (Dragoni et al., 2006) ou de la combinaison de différents monomères (hétérotétramère). Ainsi il a été reporté que les monomères TRPC1 TRPC4 et TRPC5 peuvent s'associer entre eux (Goel et al., 2002; Hofmann et al., 2002; Strubing et al., 2001) ainsi que les monomères TRPC3, TRPC6 et TRPC7 (Goel et al., 2002) pour former des canaux. Mais aucune association entre les monomères de ces deux groupes de TRPC n'a été détectée (Goel et al., 2002). Chez les TRPM, ceux de type TRPM6 sont capables de se combiner avec des monomères TRPM7 (Chubanov et al., 2004). Enfin, parmi les membres de la famille TRPV, il a été démontré une possible association entre monomères TRPV5 et TRPV6 (Hoenderop et

al., 2003). Par contre, il n'a pas été encore démontré de possibles associations entre monomères de différentes sous-familles TRP (Schaefer, 2005).

Chaque monomère, quelque soit la sous-famille, possède une architecture commune. Cette structure est détaillée dans la figure 5. Ils comportent six segments transmembranaires (S1 à S6) hydrophobes séparés par des boucles hydrophiles.

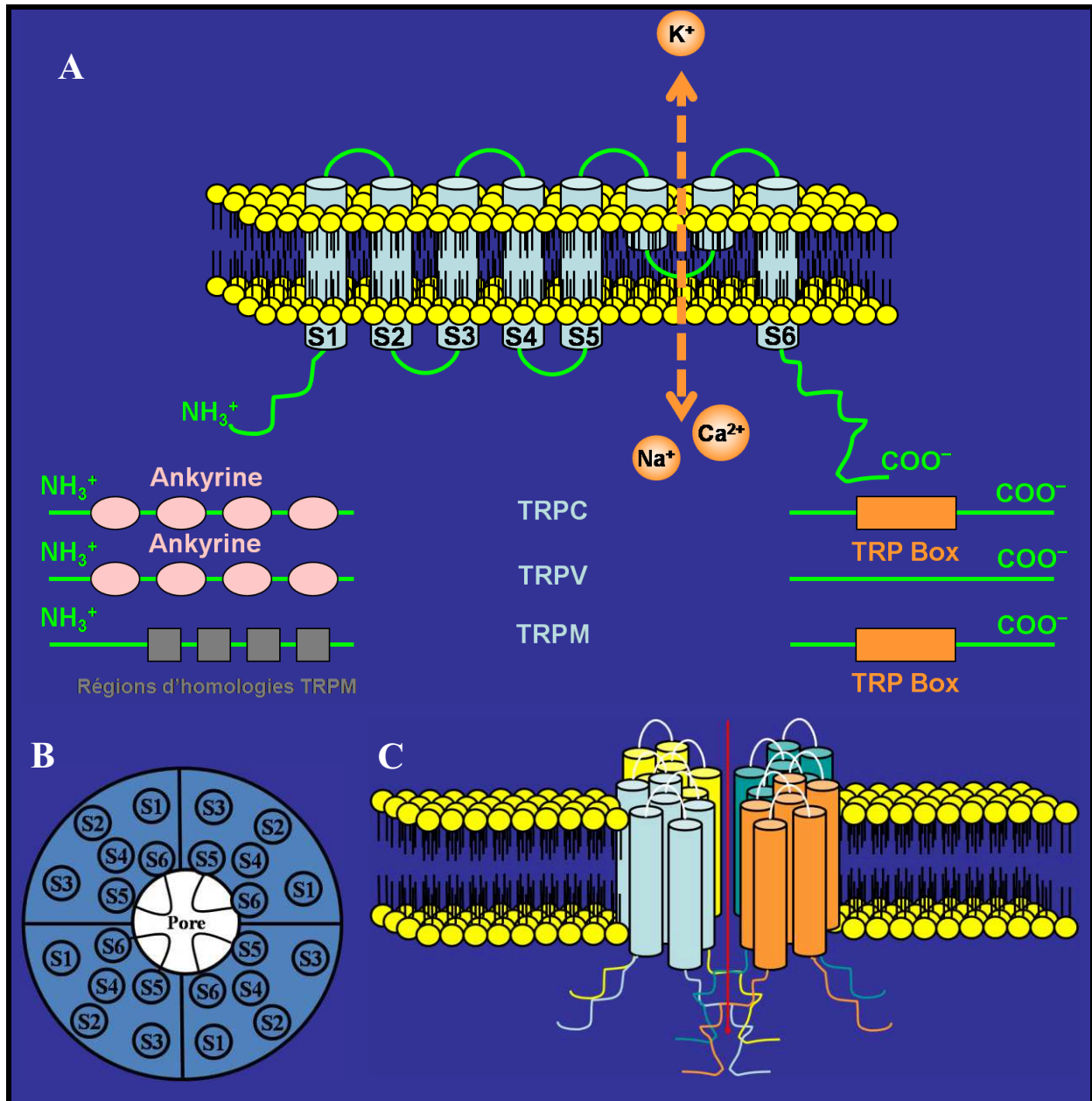


Figure 5 : Représentation schématique de la structure générale des canaux de la super famille TRP.

A : Structure de la sous-unité TRP avec les spécificités de chacune des sous-familles au niveau amino- et carboxyterminale (d'après (Clapham, 2003)). B : vue supérieure d'un canal TRP avec les boucles P de chacune des sous-unités formant le pore du canal. C : Association en tétramère des sous-unités TRP.

On trouve une boucle P ou « *P loop* » entre les segments 5 et 6, à la manière des canaux potassiques voltage-dépendants de type « *shaker* ». Les quatre monomères en s'associant délimitent le pore du canal dont la boucle S5-S6, en association avec celles des trois autres monomères, forment le filtre de sélectivité du pore du canal (Clapham, 2003).

Les extrémités amino- et carboxyterminales qui sont, quant à elles, cytoplasmiques permettent d'entrevoir des spécificités entre sous-familles. En effet, elles possèdent :

- des domaines ankyrines au niveau de l'extrémité aminoterminal des sous-familles TRPV et TRPC. Ces domaines permettent des interactions avec le cytosquelette.
- un domaine TRP conservé des canaux TRP et TRPL de la drosophile jouxtant le sixième segment transmembranaire. Chez les mammifères, on retrouve ce domaine désigné souvent sous le terme « *TRP box* » chez les membres des sous-familles TRPC et TRPM. Les travaux des équipes de Qin et de Rohacs ont proposé que cette séquence soit un site de régulation des canaux TRP par des agents lipidiques tels que le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphates (PIP2) (Liu and Qin, 2005; Liu and Liman, 2003; Rohacs et al., 2005).
- des domaines enzymatiques, on parle alors de « *chanzymes* » (Montell, 2003). Les canaux TRPM2, possèdent un domaine ADP-ribose pyrophosphatase « *NUDIX* » (Perraud et al., 2001) alors que les canaux TRPM6 et TRPM7, quant à eux, présentent un domaine alpha kinase à activité phosphotransférase (pour revue (Schlingmann et al., 2007)).

I. C. 3. Principales propriétés et structures des canaux ioniques

Le rôle biologique d'un canal ionique est déterminé par deux propriétés fonctionnelles fondamentales que sont la sélectivité et le « *gating* ».

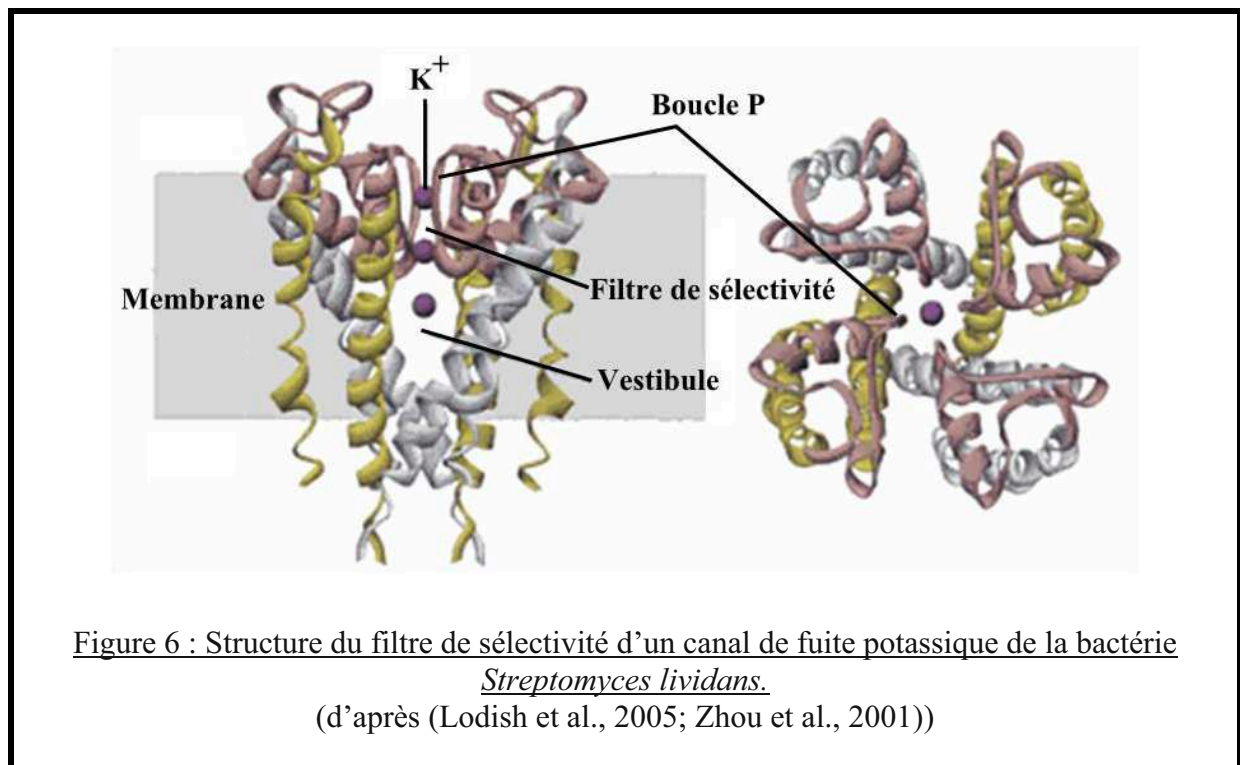
I. C. 3. a) La sélectivité

Tous les canaux ioniques présentent une sélectivité pour certains ions. Le terme sélectivité représente la capacité d'un canal à laisser transiter un type d'ions plus spécifiquement que d'autres. Cette sélectivité peut être stricte comme pour certains canaux potassiques qui ne laissent transiter que les ions potassium mais pas les ions sodium qui leurs sont étroitement apparentés, et inversement pour des canaux sodiques imperméables au potassium. Elle peut être aussi plus large, cationique mais avec des perméabilités différentes pour chacun des cations. Le canal TRPM8 est un bon exemple de ce second type de sélectivité : c'est un canal

cationique non sélectif mais avec une perméabilité au calcium versus celle au sodium (P_{Ca}/P_{Na}) comprise entre 0.97 et 3.3 ((Peier et al., 2002a) ; (McKemy et al., 2002)).

L'explication de cette sélectivité a été l'objet de nombreuses investigations. En effet, il est facile d'imaginer que les charges présentes au niveau du filtre de sélectivité du pore d'un canal permettent de discriminer entre cations et anions. Ensuite, pour une même classe d'ions, une différence de taille de ce filtre pourrait expliquer pourquoi les ions sodium peuvent transiter par un canal sodique qui leur est sélectif alors que des ions sensiblement plus gros tels que les ions potassiques ou calciques en sont exclus. Mais, si l'on reste dans cette même logique, comment expliquer que des canaux potassiques ne laissent pas transiter le sodium qui est pourtant plus petit en taille ?

La détermination par cristallographie de l'architecture tridimensionnelle d'un canal potassique voltage-dépendant de la bactérie *Streptomyces lividans* par l'américain Roderick McKinnon a permis de mieux comprendre l'origine de cette sélectivité et a été récompensée par le prix Nobel de Chimie en 2003 (Zhou et al., 2001). Ce canal, comme le canal TRPM8 dont il sera question principalement dans ce travail, est constitué d'un assemblage de quatre sous-unités identiques disposées symétriquement afin de délimiter un pore. Chaque sous-unité présente 6 segments transmembranaires en hélice α . Les segments S5 et S6 sont reliés par une boucle P qui ne pénètre que partiellement dans le feuillet externe de la membrane. Lorsque les quatre sous-unités sont assemblées, l'association des huit segments S5 et S6 forme une configuration en « tipi inversé » créant une cavité dénommée vestibule. Au dessus de cette zone, les quatre boucles P vont former le filtre de sélectivité en délimitant une région plus étroite proche de la surface extracellulaire du canal (figure 6).



La distinction entre sodium et potassium pour un canal potassique est basée sur les atomes d'oxygènes des fonctions carbonyles des résidus glycines localisés au niveau de ce filtre (deux glycine par boucle P). En milieu aqueux, les ions sont sous une forme hydratée. Arrivés au niveau du filtre, les ions perdent leur habillage de molécules d'eau. Au niveau de la partie étroite du filtre de sélectivité, l'ion va être entouré par les huit atomes d'oxygène des fonctions carbonyles du squelette qui le compose. Dans le cas de l'ion potassium, ce dernier, de part sa taille, va se lier facilement à ces atomes d'oxygène car la distance entre l'ion potassium et les atomes d'oxygène du filtre ionique de ce canal est identique à celle entre l'ion potassium et les atomes d'oxygène des molécules d'eau entourant l'ion potassium lorsqu'il est en dehors du filtre. Il peut ainsi traverser le filtre librement. Cependant, l'ion sodium, qui est plus petit que l'ion potassium, ne peut pas passer par le canal, car il ne s'ajuste pas correctement avec les atomes d'oxygène du filtre et reste donc dans la solution aqueuse. La capacité du canal pour dépouiller l'ion potassium de ses molécules d'eau et lui permettre de traverser le canal ionique n'a aucun coût du point de vue énergétique. Ainsi, le filtre à potassium se compose d'une série de fixations qui, en mimant l'hydratation de l'ion potassium, permettent de fixer des ions potassium sans leur couronne d'hydratation.

I. C. 3. b) Le « gating »

Le terme anglais « *gating* » fait référence en électrophysiologie à l'ouverture (ou activation) et à la fermeture (ou inactivation) des canaux ioniques. Les canaux ioniques adoptent deux principaux états. Lorsque les canaux sont dans un état fermé (aucune conduction possible), ils sont imperméables aux ions et ne sont à l'origine d'aucun courant électrique. Dès que le canal passe dans un état ouvert, on assiste à un flux d'ions au travers de cette structure, et donc au travers de la membrane plasmique, créant ainsi un courant électrique qui peut être détecté et analysé par la technique de patch-clamp. Le processus dénommé *gating* d'un canal ionique représente alors le passage de ce dernier d'un de ces états et à un autre et résulte de l'analogie avec l'image d'une porte qui ouvre et ferme le canal. Cette transition, ou mécanisme de *gating*, survient en fonction du type de canal, en réponse à divers stimuli (dépolérisation membranaire, fixation d'un ligand extracellulaire ou d'un second messager intracellulaire, pression mécanique, température, déformation membranaire)

Deux types de portes (« gates ») existent pour les canaux ioniques : une porte qui s'ouvre à cause d'un des stimuli listé ci-dessus (porte d'activation), une autre porte qui se ferme (porte d'inactivation). Certains canaux n'ont qu'un type de porte (porte d'activation), d'autres canaux ont les deux types.

Parmi les canaux ne possédant qu'une seule porte d'activation, on peut citer les canaux potassiques $K_v1.5$. Celle-ci est le résultat de contacts intramoléculaires dans la structure même du canal qui sont responsables de la complète occlusion du pore du côté de la face intracellulaire de la membrane.

Un exemple de canal comportant à la fois une porte d'activation et une d'inactivation est le canal sodique voltage-dépendant impliqué dans la génération du potentiel d'action à la membrane plasmique des neurones. Ce canal, pour illustrer cette notion, est des plus intéressants (figure 7).

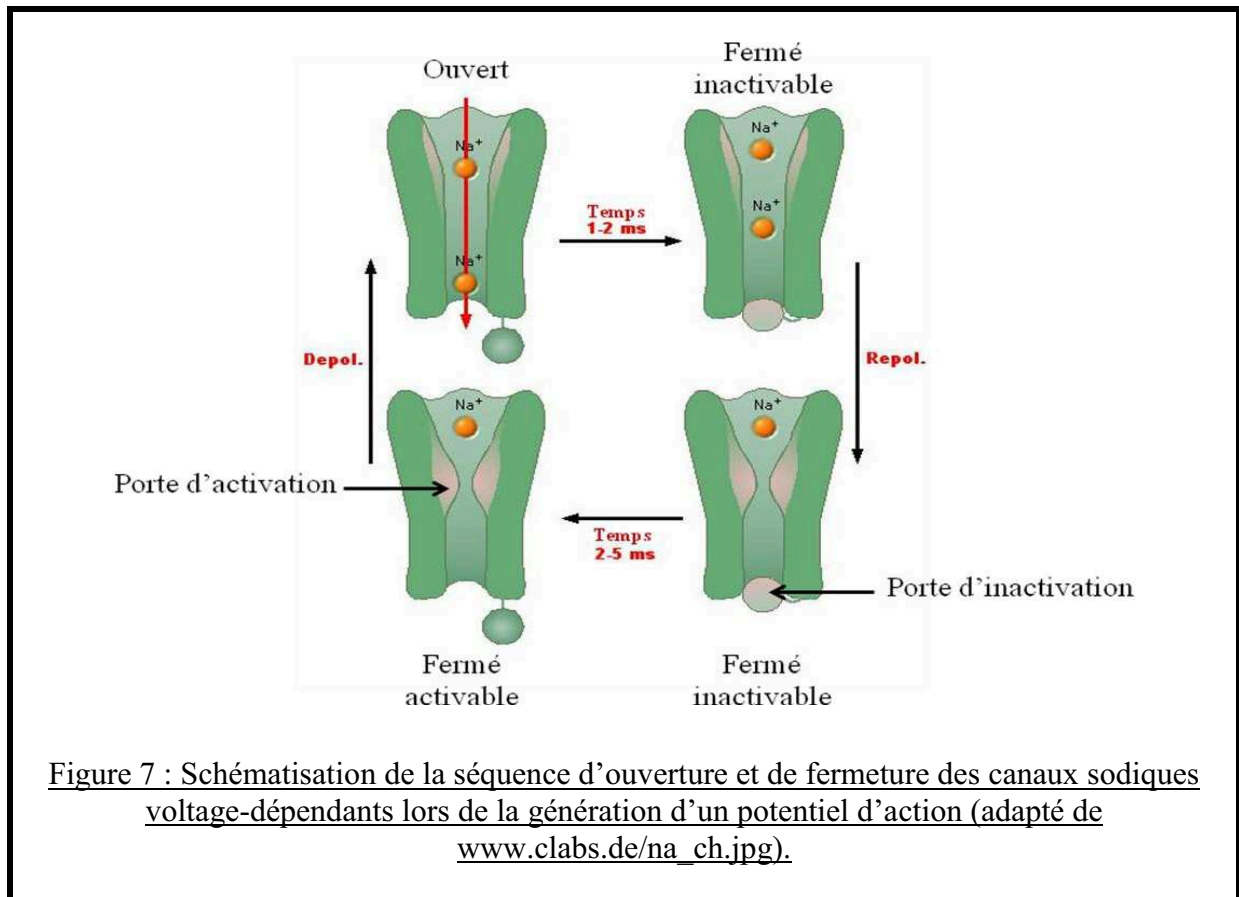


Figure 7 : Schématisation de la séquence d'ouverture et de fermeture des canaux sodiques voltage-dépendants lors de la génération d'un potentiel d'action (adapté de www.clabs.de/na_ch.jpg).

Il présente tout d'abord une porte d'activation qui, du côté extracellulaire, à la manière d'une porte tournant sur ses gonds, s'ouvre et se ferme, gardant ainsi le pore du canal. Du côté intracellulaire, la porte d'inactivation vient obstruer le canal suivant un mécanisme de « ball and chain » : une séquence d'acides aminés, prenant la conformation tridimensionnelle d'une boule reliée par une chaîne, peut aller se fixer sur un site récepteur au niveau du pore. Les jeux d'ouverture et de fermeture de ces deux portes permettent d'identifier à ce type de canal trois états : ouvert, fermé activable et fermé inactivable. C'est ainsi qu'en l'absence de dépolarisation membranaire, la porte d'activation est fermée et celle d'inactivation ouverte. Lors d'une dépolarisation membranaire dépassant le seuil d'activation de ce canal, la porte d'activation s'ouvre, laissant ainsi entrer le sodium dans la cellule et déclenchant ainsi la génération d'un potentiel d'action. Après un certain laps de temps, la porte d'inactivation se ferme, obstruant le canal qui est alors dans un état fermé inactivable. Ensuite, la porte d'activation se referme. Celle d'inactivation s'ouvre ensuite, le canal est alors dans un état fermé activable.

I. C. 4. Classification des canaux ioniques en fonction du stimulus d'activation

Classiquement, il existe quatre grandes classes de canaux ioniques en fonction de leur mode d'activation :

- VOC (*Voltage Operated Channels*)
- ROC (*Receptor Operated Channels*)
- SMOC (*Second Messenger Operated Channels*)
- SOC (*Store Operated Channels*)

Aujourd'hui, au vu des avancées réalisées sur les modes d'activation et de régulation des canaux ioniques, il est nécessaire d'ajouter de nouvelles classes à celles précédemment décrites. C'est de l'étude des canaux de la superfamille TRP ainsi que des canaux potassiques de type TREK et TRAAK qu'ont été identifiés les canaux :

- Mécanorécepteurs (MOC pour *Mechanical-Operated Channels*)
- Thermorécepteurs (TOC pour *Temperature-Operated Channels*)
- Chanzymes

Pour certains de ces modes d'activation, des exemples de canaux TRP seront donnés. Cette superfamille sera amplement décrite dans le troisième chapitre de cette introduction.

I. C. 4. a) ROC

Les canaux ROC sont, comme leur dénomination l'indique, des canaux récepteurs. Leur ouverture est conditionnée par la fixation de leur ligand (neurotransmetteurs). De ce fait, aucune voie de transduction intracellulaire n'est nécessaire pour leur activation. Parmi les canaux de type ROC, l'un des plus connus et représentatif, est le récepteur nicotinique à l'acétylcholine. Au niveau de la jonction neuro-musculaire, l'acétylcholine libérée par le bouton axonal du neurone moteur présynaptique vient se fixer sur son récepteur à la surface des myocytes. Cette interaction ligand-récepteur permet l'ouverture du canal et donc l'entrée massive d'ions Na⁺ dans la cellule.

I. C. 4. b) VOC

Par définition, les canaux VOC sont sensibles aux variations du potentiel de membrane. Ils sont ouverts consécutivement à une dépolarisation pour certains ou une hyperpolarisation membranaire pour d'autres. Les premiers sont d'une importance majeure dans la génération des potentiels d'action dans les cellules excitables. Les variations du potentiel de membrane

sont détectées par le segment S4, dit *voltage sensor*, riche en acides aminés chargés. Suite à une dépolarisation membranaire, si celle-ci dépasse le seuil d'activation du canal, elle est alors perçue par le segment S4 qui change de conformation, ouvrant ainsi le canal.

Les canaux HCN (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) sont, quant à eux, activés par l'hyperpolarisation de la membrane et impliqués dans l'activité « *pace maker* » des cellules cardiaques humaines (Ludwig et al., 1999).

Il est à noter que l'on retrouve également des canaux voltage-dépendants au sein des cellules non excitables (qui ne génèrent pas de potentiel d'action) tels que le canal calcique de type T (Cav3.2) qui intervient, par exemple, dans la différenciation et la sécrétion des cellules neuroendocrines prostatiques (Gackiere et al., 2008; Mariot et al., 2002). Les canaux de type T sont également exprimés au niveau des neurones où ils jouent un rôle primordial dans la régulation de l'excitabilité neuronale (pour revue (Iftinca and Zamponi, 2009)).

Dans le cas des canaux TRP, le segment S4 est dépourvu de ces acides aminés chargés rendant ces canaux peu ou non-classiquement voltage-dépendants.

I. C. 4. c) SMOC

L'ouverture des canaux SMOC est conditionnée par la fixation d'un second messager intracellulaire produit consécutivement à la stimulation d'un récepteur. Le cas du récepteur muscarinique M3 illustre parfaitement cette notion pour les canaux TRP. En effet, la stimulation de ce type de récepteur par l'acétylcholine entraîne l'activation de la PLC via les protéines G_q auxquelles il est associé. La PLC dégrade alors le PIP2 membranaire en inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et diacylglycérol (DAG). Le DAG, en tant que second messager intracellulaire, stimule l'ouverture des canaux SMOC tels que les canaux TRPC3, TRPC6 et TRPC7 (pour revue (Hardie, 2007)).

I. C. 4. d) SOC

Les canaux SOC (*store-operated channels*) sont par définition activés par la vidange des stocks calciques réticulaires et permettent une entrée massive de calcium dans la cellule destinée à reformer ces stocks : l'entrée capacitive de calcium (ECC) (ou *store-operated calcium entry* (SOCE)). Historiquement, ce sont les travaux de James W. Putney (1986) qui ont introduit la notion d'ECC (Putney, 1986). Du fait que cette entrée représente l'entrée principale de calcium dans les cellules non excitables, l'étude des canaux SOC et de l'ECC

auxquels ils sont couplés, est un sujet très actif. Originellement, trois mécanismes d'activation des canaux SOC ont été proposés :

- L'hypothèse du couplage conformationnel : Suite à la fixation de l'IP3 sur ses récepteurs, à la manière des récepteurs à la ryanodine et de ceux à la dihydropyridine (DHPR) situés respectivement à la membrane réticulaire et plasmique des cellules musculaires, on assisterait à un changement de conformation des récepteurs à l'IP3. Ces derniers viendraient interagir physiquement avec les canaux SOC membranaires et provoqueraient ainsi, par couplage conformationnel, leur ouverture (Berridge, 1995). Dans le cas des canaux TRP, une activation de TRPC1 par interaction conformationnelle avec le récepteur à l'IP3 par l'intermédiaire de protéines de la famille Homer a été reportée (Yuan et al., 2003).

- L'hypothèse du Calcium Influx Factor (CIF) : Lors de la vidange des stocks réticulaires de calcium, un facteur diffusible dont la nature moléculaire reste encore inconnue serait libéré par le réticulum (Parekh et al., 1993; Randriamampita and Tsien, 1993). Ce facteur, dénommé CIF, activerait les canaux SOC membranaires (Trepakova et al., 2000; Trepakova et al., 2001). Les travaux de l'équipe de Victoria M. Bolotina ont explicité ce mode d'activation. C'est en décrochant la calmoduline de la phospholipase A2 calcium indépendante (iPLA2 du groupe IVA ou iPLA2 β) que le facteur CIF active cet enzyme membranaire. La iPLA2 dégrade alors les phospholipides membranaires et génère des lysophospholipides et de l'acide arachidonique. Les lysophospholipides ainsi produits sont capables, quant à eux, d'activer les canaux SOC (Smani et al., 2004).

- L'hypothèse vésiculaire : ce dernier mécanisme propose que les canaux SOC soient situés dans des vésicules jouxtant la membrane plasmique. La vidange des stocks calciques réticulaires entraînerait l'adressage à la membrane de ces vésicules. Les canaux ainsi enchâssés dans la membrane plasmique permettraient l'entrée massive de calcium dans la cellule (Yao et al., 1999).

Des études réalisées au laboratoire ont démontré que, dans les cellules épithéliales prostatiques, les deux mécanismes de couplage conformationnel (SOC_{CC}) et la voie du facteur CIF (SOC_{CIF}) coexistent (Vanden Abeele et al., 2004).

Certains membres de la famille des canaux TRP ont été proposés en tant que canaux SOC. Principalement des membres de la famille TRPC tels que TRPC1, TRPC3, TRPC4 mais aussi TRPV6 (Vanden Abeele et al., 2004).

Malgré toutes ces hypothèses et beaucoup de travaux, la nature moléculaire ainsi que le mécanisme d'activation des canaux SOC restaient non identifiés, ce qui engendrait la publication de nombreux articles contradictoires. Grâce à la découverte des familles STIM (1 et 2) et ORAI (1,2 et 3), la situation, dans un premier temps, paraissait plus claire.

La protéine STIM1 (STromal Interacting Molecule 1), enchassée dans la membrane du réticulum endoplasmique, possède un motif « EF hand » sensible au calcium qui lui permet de détecter toute baisse du calcium dans la lumière du réticulum. Lors de la vidange de ces stocks, les protéines STIM se rassembleraient, formeraient des « punctae » au niveau de la membrane du réticulum à proximité immédiate de la membrane plasmique et des canaux SOC. Par un couplage fonctionnel, ces protéines permettraient l'ouverture de ces canaux et ainsi l'entrée capacitive de calcium (Liou et al., 2005; Zhang et al., 2005).

La protéine ORAI1 (ou CRACM1 calcium release-activated calcium channel protein 1) serait le canal SOC (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006b). Plusieurs travaux ont démontré que lors de la vidange calcique réticulaire, les protéines STIM situées dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) interagissent directement avec des multimères de ORAI au niveau de la membrane plasmique (Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006a; Yeromin et al., 2006). ORAI1 étant ubiquitaire, ces travaux renforcent l'hypothèse de la nécessité d'un couplage conformationnel pour l'activation des canaux SOC. Ce mécanisme est illustré dans la figure 8. Les travaux de l'équipe de Shmuel Muallem compliquent à nouveau le schéma d'activation des canaux SOC suite à la vidange des stocks calciques réticulaires. Ils démontrent que les protéines réticulaires STIM1 peuvent interagir et activer les canaux TRPC membranaires, et plus particulièrement TRPC1, TRPC4 et TRPC5, ce qui maintient les canaux TRPC comme canaux SOC (Yuan et al., 2007). Le couplage TRPC1 et STIM1 est de nature électrostatique, deux résidus aspartates chargés négativement de TRPC1 interagissent avec deux résidus lysines chargés positivement de STIM1 (Zeng et al., 2008). Il faut ajouter à cela le fait que les canaux TRPC sont activés par couplage conformationnel avec le récepteur IP3 réticulaire (Yuan et al., 2003). Si le récepteur IP3 n'est donc pas une condition *sine qua non* pour l'activation des canaux SOC, les canaux ORAI1 et les protéines STIM1 sont par contre une condition obligatoire pour un tel mode d'activation.

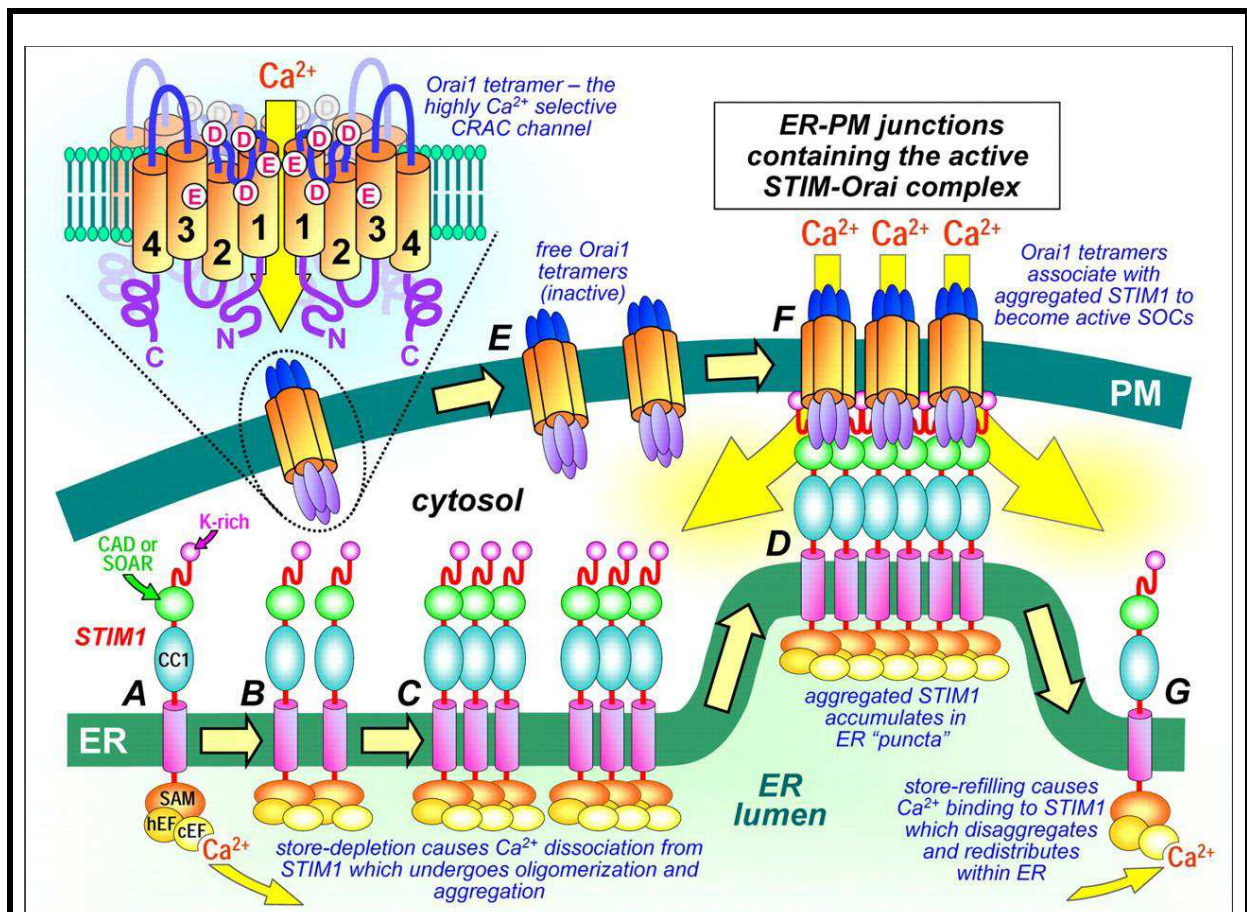


Figure 8 : Schématisation de l'activation des canaux ORAI1 par les protéines réticulaires calcium sensor STIM1 lors de la vidange des stocks calciques réticulaires (Deng et al., 2009).
 Abréviations : ER : Endoplasmic Reticulum ; PM : Plasma membrane ; CRAC : Calcium Release-Activated Calcium Channel protein ; CAD : Calcium Activated Domain ; SOAR : STIM ORAI Activating Region ; CC1 : Coiled-Coil regions ; SAM : Sterile Alpha Motifs ; hEF : hidden EF hands ; cEF : calcium binding canonical EF-hands.

I. C. 4. e) Chanzymes

Les « chanzymes », pour « channels »+« enzymes » (Montell, 2003), présentent la particularité d'être des canaux ioniques TRP possédant une fonction enzymatique sur leur extrémité carboxyterminale. Cette famille inclut les canaux TRPM2, TRPM6 et TRPM7.

Les canaux TRPM6 et TRPM7 présentent une forte perméabilité aux métaux divalents tels que le Mg²⁺ (Monteilh-Zoller et al., 2003; Nadler et al., 2001; Schlingmann et al., 2002), ainsi une mutation de TRPM6 entraîne une hypomagnésie sévère, appelée hypomagnésie avec hypocalcémie secondaire (HSH), démontrant le rôle primordial de ce canal dans l'homéostasie du magnésium (Schlingmann et al., 2002; Walder et al., 2002). Les travaux de Chubanov *et coll* ont complété ces résultats en montrant que le canal hétéromultimérique

TRPM6/TRPM7 est fonctionnel et impliqué dans l'absorption rénale de Mg^{2+} (Chubanov et al., 2004). Ces deux canaux sont également sensibles au magnésium intracellulaire qui exerce sur leur activité un rétrocontrôle négatif (Nadler et al., 2001; Voets et al., 2004b) (d'où leur première appellation de MIC pour *Magnesium-Inhibited Cation channels* (Prakriya and Lewis, 2002)) et ont la particularité de posséder au niveau de leur extrémité carboxyterminale une sérine/thréonine α -kinase dont l'activité est dépendante du Mg^{2+} -ATP cytosolique (Nadler et al., 2001; Thebault et al., 2006). Des mutations de ce domaine entraînent une diminution de la sensibilité du canal TRPM7 au magnésium intracellulaire (Schmitz et al., 2003) mais l'importance de cette fonction α -kinase dans le *gating* de ces canaux continue à faire débat (Schmitz et al., 2005).

Le canal TRPM2 possède, quant à lui, un domaine à activité ADP-ribose pyrophosphatase « NUDIX » (Perraud et al., 2001) qui lui confère une sensibilité à l'ADP ribose cyclique (cADPR) et au Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD). La suppression du domaine « NUDIX » empêche l'activation du canal par le cADPR comme par le NAD, démontrant le rôle de la fonction enzymatique du canal dans son ouverture ((Hara et al., 2002; Togashi et al., 2006). Cependant cette activation est thermosensible et n'a lieu que pour des températures supérieures à 36°C (Togashi et al., 2006). Ce canal n'est donc pas, par définition, un thermorécepteur mais son activation par le cADPR peut être modulée par la température environnante.

I. C. 4. f) Les mécanorécepteurs MOC

Les canaux mécanorécepteurs sont activés suite à un stress mécanique exercé sur la membrane plasmique. Cette stimulation peut être d'ordre mécanique (telle qu'une augmentation de la pression sanguine détectée par les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux (Lansman et al., 1987)) ou osmotique (propriété principale utilisée par les bactéries pour détecter toute variation de pression osmotique de leur environnement (Wood, 1999)).

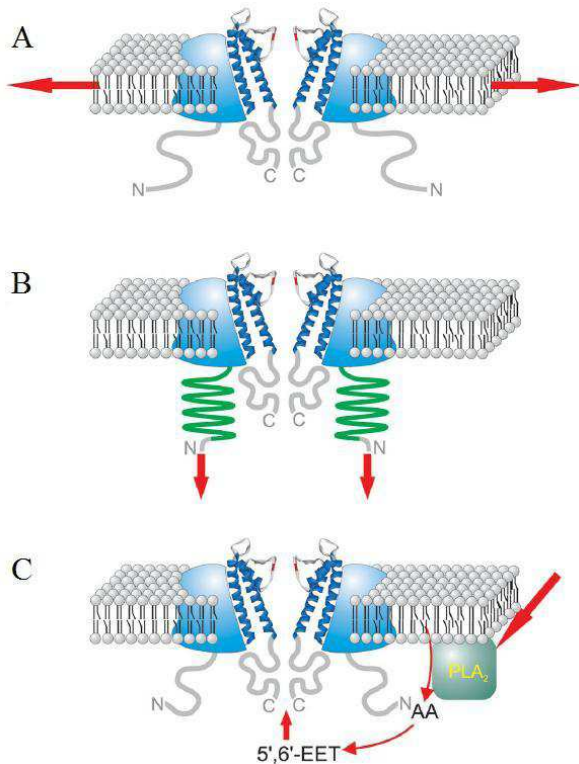
La première mise en évidence de ce type de canal date de 1994 avec la découverte du canal bactérien MécanoSensitif à Large Conductance (MscL) (Sukharev et al., 1994). Chez les mammifères, le premier canal mécanosensible cloné fut le canal potassique TREK-1 (TWIK1-related K^+ channel) en 1996 (Fink et al., 1996). Plusieurs autres canaux furent caractérisés ensuite en tant que mécanorécepteurs tels que TREK-2 et TRAAK (TWIK1-related arachidonic acid sensitive. K^+ channel). Ces derniers ainsi que TREK-1 sont sensibles à des variations du volume cellulaire. Ils sont activés par un étirement de la membrane plasmique (Patel and Honore, 2001).

Les investigations sur les mécanorécepteurs se portent maintenant sur la famille des canaux TRP depuis l'identification du canal TRPV4, orthologue de OSM-9 chez *C. elegans*, en tant que canal mécanosensible. En effet, la mutation de ce canal entraîne une perte de la sensibilité aux pressions mécaniques et osmotiques des parties antérieures de l'animal (Corey, 2003). Les données actuelles obtenues par l'étude des canaux TRP en tant que canaux mécanosensibles dans les différents règnes sont très contradictoires. Certaines proposent que pour les mammifères TRPC1, 5, 6, TRPV1, 2, 4, TRPM3, 7, TRPP2 ainsi que TRPA1, pour la drosophile TRPN1, pour *C. elegans* OSM-9 et enfin pour la levure TRPY1-3 sont mécanosensibles (pour revue (Inoue et al., 2009b)).

TRPV4 serait sensible aux gonflements cellulaires en conditions hypotoniques, tout comme TRPM3, ainsi qu'aux flux laminaires (Grimm et al., 2003; Strotmann et al., 2000). TRPV2 serait également sensible aux gonflements cellulaires en conditions hypotoniques mais également aux déformations de la membrane plasmique (Muraki et al., 2003; O'Neil and Heller, 2005).

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la mécanosensibilité des canaux TRP. Ces mécanismes sont représentés figure 9.

Figure 9 : Schématisation des différents mécanismes d'activation de canaux mécanosensibles (d'après (Voets et al., 2005)).



A : des variations de la tension membranaire sont détectées par un segment transmembranaire. Ce mécanisme est celui emprunté par le canal bactérien MscL (Perozo et al., 2002) et proposé pour TRPC1 (Maroto et al., 2005).

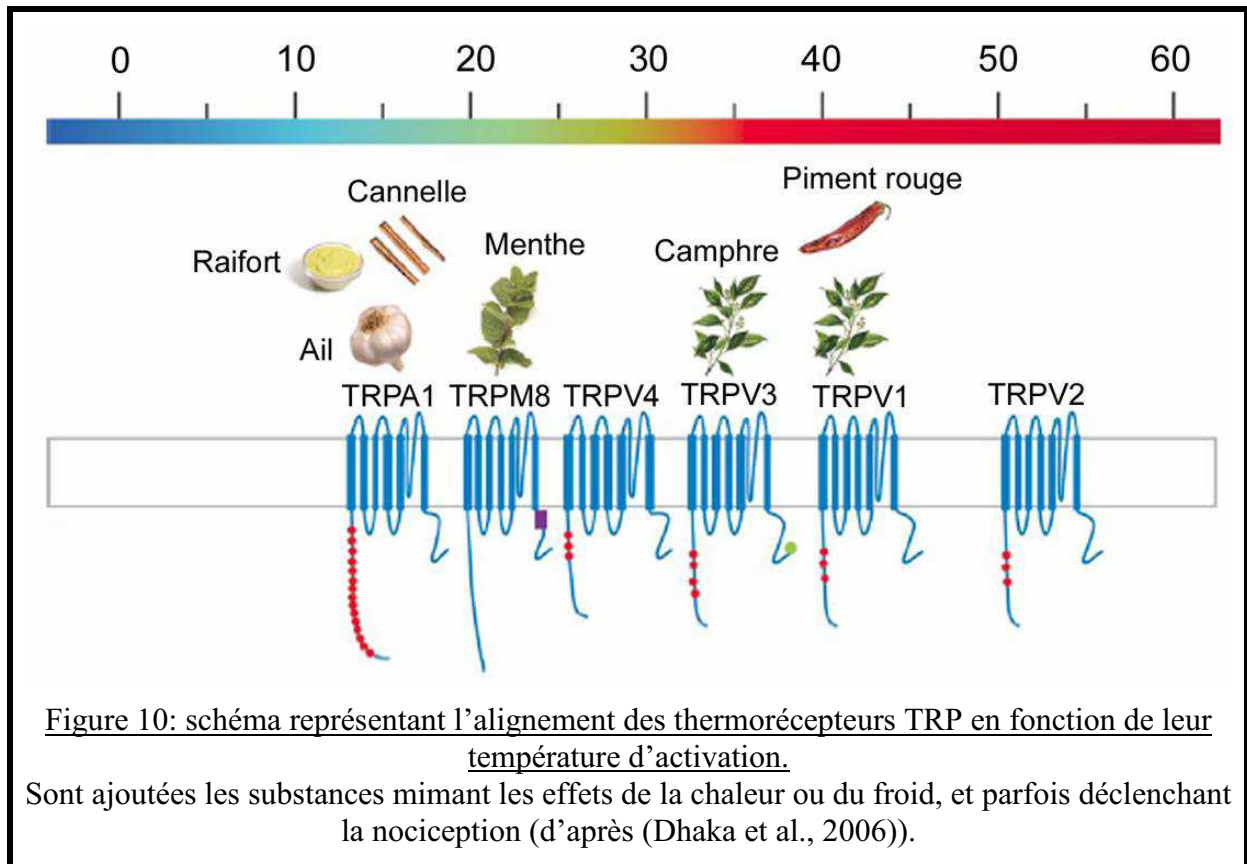
B : Les extrémités cytosoliques du canal seraient connectées au cytosquelette. Toute déformation cellulaire serait alors détectée par le canal via le cytosquelette. Un tel mécanisme a été suggéré pour TRPA1 et TRPN1 (Corey et al., 2004; Howard and Bechstetd, 2004). Un tel processus est permis grâce à l'abondance en domaines ankyrines au niveau des extrémités aminoterminales de ces canaux (Howard and Bechstetd, 2004; Sotomayor et al., 2005).

C : Des variations du volume cellulaire peuvent activer des enzymes membranaires qui activeront indirectement le canal. Ce mécanisme est celui emprunté par TRPV4. Le gonflement de la cellule active une phospholipase A2 membranaire. Il y a alors production d'acide arachidonique qui sera métabolisé en 5',6'-EET qui active le canal TRPV4 (Vriens et al., 2004; Watanabe et al., 2003).

I. C. 4. g) Les thermorécepteurs TOC

Grâce à l'étude et au clonage des canaux de la superfamille des canaux TRP, le support physique de la sensibilité aux variations de température, longtemps resté méconnu, est maintenant élucidé. Cette propriété n'est pas portée par un mais par six canaux TRP localisés dans les neurones thermosensibles des ganglions rachidiens dorsaux. TRPM8 (anciennement *cold/menthol receptor 1* CMR1) est activé par des diminutions de la température (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a), tout comme TRPA1 (ou ANKTM1) (Story et al., 2003). A l'inverse, les canaux TRV1 à V4 (Caterina et al., 1999; Caterina et al., 1997; Peier et al., 2002b; Xu et al., 2002) sont stimulés par des augmentations de la température (figure 10). Ces

canaux couvrent ainsi un large éventail de températures allant de 8 à 52°C avec des gammes propres à chacun d'eux qui se chevauchent.



Afin de connaître la nature moléculaire du détecteur des variations de température sur ces canaux, des expériences de mutations, de délétions et de construction de protéines chimériques ont été réalisées sur les canaux TRPV1 et TRPM8. Les expériences de délétions partielles de l'extrémité carboxyterminale du canal TRPV1 réalisées par Brauchi *et coll.* ont eu pour résultat une diminution de la sensibilité aux hautes températures du canal. Cette même équipe a produit des protéines chimériques TRPM8 et TRPV1 en intervertissant leurs extrémités carboxyterminales. Le canal TRPM8 avec l'extrémité carboxyterminale de TRPV1 est alors sensible aux élévations de température et à l'inverse le canal TRPV1 avec l'extrémité carboxyterminale de TRPM8 est activé par le froid. Cette extrémité est donc à la fois à l'origine de la détection de la température mais également de la spécificité du canal du point de vue de ce paramètre physique (Brauchi et al., 2006).

Il est nécessaire de faire la distinction entre canaux thermosensibles et thermorécepteurs. En effet, si TRPM8 ou TRPV1 sont des canaux activés directement par des variations de température, d'autres canaux tels que TRPM5 sont quant à eux sensibles à ce facteur environnemental. Il a été décrit, et il en sera plus amplement question au chapitre III, que le

canal TRPM5 est sensible aux augmentations de température. En effet, des études démontrent que son activité est potentialisée lorsque la température est augmentée dans une gamme comprise entre 15 et 35°C (Talavera et al., 2005).

Comme il a été dit précédemment, les canaux TRP ne possèdent pas de *voltage sensor* classique. Néanmoins, certains d'entre eux présentent une dépendance au voltage et en particulier les canaux impliqués dans la thermosensation tels que TRPV1 et TRPM8. Il est possible par des techniques électrophysiologiques comme le patch-clamp de tracer la courbe d'activation voltage-dépendante de ces canaux. Les travaux réalisés par Thomas Voets *et coll.* montrent très bien cette propriété intrinsèque des canaux TRPV1 et TRPM8 (Voets et al., 2004a). De plus, comme il en sera plus amplement question au chapitre IV, cette courbe d'activation n'est pas figée. Les activateurs de ces canaux induisent un déplacement de cette dernière vers des potentiels plus physiologiques. Ce déplacement ou *shift* explique, par exemple, comment le froid ou le menthol active le canal TRPM8. Dans le cas de ce récepteur au froid, il a été démontré que cette sensibilité au voltage, d'un point de vue moléculaire, est portée par une région du canal comprenant des acides aminés du segment S4, à la manière des canaux voltage-dépendants, et de la boucle entre les segments S4 et S5. Des mutations de ces sites perturbent à la fois la voltage-dépendance du canal mais aussi la thermosensibilité, ce qui démontre bien un couplage entre les sensibilités au voltage et aux variations de température. D'autres mutations de ces régions affectent l'affinité du canal TRPM8 pour le menthol, démontrant ainsi une interaction directe entre le menthol et ce *voltage sensor* (Voets et al., 2007a).

I. C. 4. h) Les canaux polymodaux

Certains canaux ioniques peuvent appartenir à plusieurs des classes présentées ici. On parle dans ce cas de canal polymodal. Un bel exemple est le canal TRPM8. Comme nous l'avons vu, ce canal est activé par la diminution de température (TOC) ainsi que par le voltage (VOC) et, comme nous le verrons au chapitre IV de cette introduction, par des seconds messagers intracellulaires (PIP2, lysophospholipides) (SMOC).

II. Canalopathies

II. A. Définition

Avec plus de 150 canaux ioniques identifiés à ce jour (Lory and Nargeot, 2007), ces protéines sont des acteurs fondamentaux de la physiologie humaine. L'activité des canaux ioniques est impliquée dans des processus importants tels que la contraction musculaire, l'excitabilité neuronale, la sécrétion d'hormones et de neurotransmetteurs, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation cellulaire, la régulation de la pression sanguine, la sensibilité à divers stimuli exogènes (température, goût, lumière...), la fertilité ou encore l'apprentissage et la mémoire. Les canaux ioniques sont aussi les cibles principales de différentes drogues utilisées en thérapie telles que des antimigraineux, antipsychotiques, des anesthésiques locaux, des sédatifs, des médicaments antiépileptiques ou encore antihypertensifs.

Face à une telle diversité de rôles, on imagine facilement que la moindre dérégulation d'un canal ionique peut avoir de graves conséquences au niveau physiologique. Les progrès scientifiques ont permis peu à peu de mettre en relation des pathologies, des anomalies cliniques avec des mutations de gènes codant des canaux ioniques. Le concept de « canalopathies » traduit toute maladie ayant pour cause le dysfonctionnement d'un canal ionique.

Cette notion a été introduite, pour la première fois, par une étude de 1993 sur les paralysies périodiques hypokaliémiques (HyperPP) et les paramyotonies congénitales chez les chevaux de courses de la race « Quarter ». Partant de l'animal vers l'Homme, cette étude a démontré que ces pathologies étaient dues à des mutations touchant le gène codant un canal sodique exprimé au sein du muscle squelettique (Wang et al., 1993).

A l'heure actuelle, les recherches dans ce domaine s'intensifient. Déjà des mutations retrouvées dans plus de 60 gènes codant pour des canaux ioniques ont été identifiées comme à l'origine de désordres chez l'Homme. Plus de 40 pathologies humaines ont été reconnues comme dues à des dérégulations et mutations de canaux ioniques.

II. B. Classification

Les canalopathies peuvent être classifiées de deux manières, soit en fonction du canal qui est muté (figure 11) soit en fonction de l'organe porteur du dysfonctionnement (tableau 1).

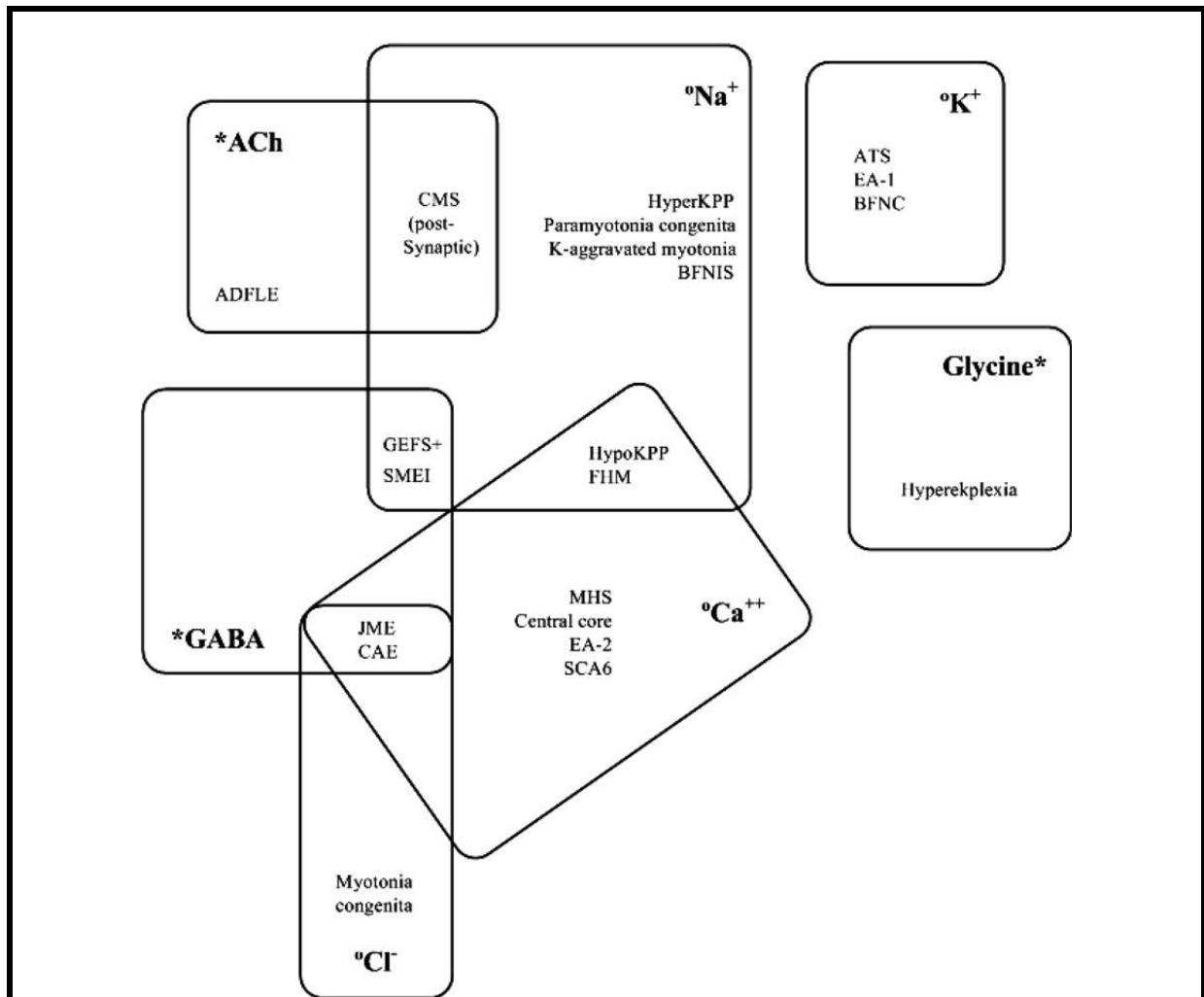


Figure 11 : Quelques exemples de canalopathies en fonction du canal muté (d'après (Bernard and Shevell, 2008)).

Abréviations : HyperKPP : paralysie hyperkaliémique périodique ; HypoKPP : paralysie hypokaliémique périodique; CMS : syndrome myasthénique congénital ; MHS : susceptibilité à l'hyperthermie maligne ; ATS : syndrome d'Andersen/Tawil ; EA-1 : ataxie épisodique de type 1 ; EA-2 : ataxie épisodique de type 2 ; FHM : migraine hémiplégiq ue familiale ; ADFLE : épilepsie nocturne du lobe frontal autosomale ; BFNC : convulsions néonatales familiales bénignes ; BFNIS : crises néonatales-infantiles familiales bénignes; GEFS : épilepsie généralisée avec convulsions fébriles plus; SMEI : épilepsie myoclonique sévère du nourrisson ; JME :épilepsie myoclonique juvénile; CAE _ absence épileptique chez l'enfant. Ligands: Ach: acétylcholine ; GABA: acide γ -aminobutyrique ; °canal voltage-dépendant. *canal récepteur.

Muscle	Cerveau
Paralysies périodiques et myotonies non dystrophiques Paralysie hyperkaliémique périodique Paralysie hypokaliémique périodique Paramyotonie congénitale Myotonie congénitale Myotonie aggravée par le potassium Syndrome d'Andersen/Tawil Susceptibilité à l'hyperthermie maligne Myopathie à axe central Syndrome myasthénique congénital	migraine hémiplégique familiale Ataxie épisodique Ataxie spinocérébelleuse de type 6 Hyperekplexie héréditaire Epilepsies (ADFLE, BAFME, BFNC, BFNIS, CAE, GEFS+, JME, SMEI) Dyskénies paroxystiques kinesiogéniques ou non kinesiogéniques
<p><u>Tableau 1 : Quelques exemples de canalopathies en fonction de l'organe porteur du dysfonctionnement.</u> (d'après (Bernard and Shevell, 2008))</p> <p>Abréviations : ADFLE, BFNC, BFNIS, CAE, GEFS+, JME, SMEI voir figure 6 ; BAFME : épilepsie myoclonique familiale bénigne de l'adulte.</p>	

II. C. Principaux types de canalopathies

Il existe quatre types de canalopathies :

II. C. 1. Les canalopathies génétiques :

Elles sont le résultat de mutations de gènes codant pour des canaux ioniques. Ces mutations peuvent entraîner un fonctionnement anormal de ce canal ou le rendre non fonctionnel, on parle alors de gain de fonction ou de perte de fonction d'un canal ionique. Ces mutations peuvent en particulier influencer sur le *gating* de ces canaux, ce qui est le cas de mutations du gène codant pour le canal calcique voltage-dépendant $Ca_v3.2$ et qui s'avèrent être impliquées dans l'épilepsie infantile. Les mutations F161L and E282K de ce gène entraînent un déplacement de la courbe d'activation de ces canaux vers des potentiels plus hyperpolarisés, plus proches du potentiel de repos de la membrane des neurones. Ce déplacement de la courbe permet ainsi une activation de ce canal pour des dépolarisations moins importantes, une entrée accrue de calcium et donc une hyperexcitabilité du tissu neuronal chez les patients exprimant majoritairement ces deux mutations (Khosravani et al., 2004).

II. C. 2. Les canalopathies acquises :

Elles font parties des maladies autoimmunes. Dans ce cas de figure, des anticorps viennent perturber le fonctionnement de canaux ioniques. Le syndrome myasthénique de Lambert

Eaton est une pathologie auto-immune acquise provoquée par des anticorps dirigés contre des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques. Le fonctionnement de ces canaux est ainsi affecté ce qui a pour conséquence une diminution de la libération d'acétylcholine dans la jonction neuromusculaire (Flink and Atchison, 2003).

Un exemple très intéressant démontrant bien les impacts importants que ces deux types de canalopathies peuvent avoir sur le fonctionnement des cellules entraînant ainsi des pathologies est l'exemple de la jonction neuromusculaire qui est décrit dans la revue de Frances M. Ashcroft (Ashcroft, 2006).

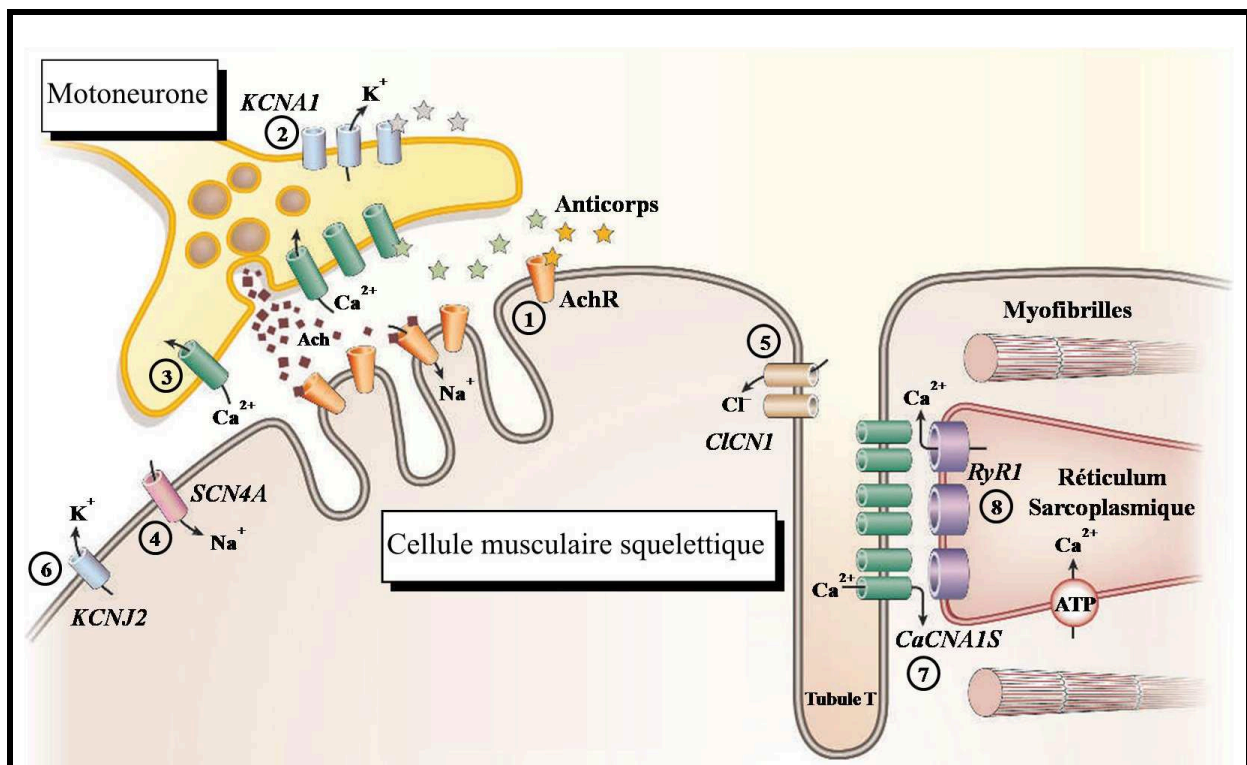


Figure 12 : Schématisation de la jonction neuromusculaire et des canalopathies qui peuvent l'affecter (d'après (Ashcroft, 2006)).

Abréviations : *RyR1* : gène codant pour le récepteur à la ryanodine 1 ; *CLCN1* : gène codant pour le canal chlore 1 ; *CaCNA1S* : gène codant pour le canal calcique voltage-dépendant de type L sous unité 1S ; *SCN4A* : gène codant pour la sous unité 4A du canal sodique voltage-dépendant ; *KCNJ2* : gène codant pour le canal Kir1.1 ; AchR : récepteur à l'acétylcholine ; KCNA1 : gène codant pour le canal $K_V1.1$; Ach : Acétylcholine.

Sur le schéma de la jonction neuromusculaire (figure 12) sont représentés d'un côté la terminaison synaptique du motoneurone et de l'autre la fibre musculaire squelettique avec leurs canaux ioniques (numéros 1 à 8) à leurs membranes. A ce niveau, plusieurs canalopathies ont été détectées.

1 : Des mutations de sous-unités du récepteur canal à l'acétylcholine peuvent engendrer une perte de fonction de cette protéine, par diminution du nombre de récepteurs canaux à la membrane ou par diminution de la cinétique d'activité de la protéine, entraînant ainsi une absence de dépolarisation de la membrane de la fibre musculaire, donc aucune contraction et de ce fait une myasthénie congénitale post-synaptique. Outre des mutations, des anticorps tournés contre ces récepteurs à acétylcholine bloquent également leur activité en provoquant leur internalisation, diminuant ainsi leur nombre à la membrane. Ce second mécanisme est à l'origine de myasthénies autoimmunes.

2 : Une perte de fonction des canaux potassiques KCNA1 (K_v1.1) présynaptiques due à des mutations du gène ou à l'internalisation par fixation d'anticorps sur ces protéines. Aucune repolarisation de la membrane présynaptique n'est alors possible, la libération d'acétylcholine est donc accrue, tout comme la contraction musculaire.

3 : Des myasthénies ont pour origine une perte d'activité des canaux calciques voltage-dépendants présynaptiques par mutations ou action d'anticorps. Il y a alors une diminution de la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique.

4-5-6: Des mutations gain de fonction des canaux sodiques voltage-dépendants SCN4A postsynaptiques et des mutations perte de fonction des canaux chlore CICN1 et potassiques Kir1.1 (KCNJ2) postsynaptiques sont à l'origine d'une hyperexcitabilité des fibres musculaires et à terme une myotonie.

7-8 : Des mutations des canaux calciques voltage-dépendants CACNA1S des tubules T des cellules musculaires et du récepteur à la ryanodine RYR1 de la membrane du réticulum sarcoplasmique perturbent la déplétion en calcium de ce réticulum et engendrent une hyperthermie maligne.

Cet exemple démontre bien l'importance des canalopathies dans la physiopathologie. Ici, pas moins de huit types de canaux ioniques sont la cible de canalopathies (par mutations ou action d'anticorps) qui aboutissent à des pathologies graves telles que des myotonie et myasthénies. Si les deux premiers type de canalopathies sont bien connus et décrits, une troisième classe a été introduite plus récemment par Stephen G. Waxman.

II. C. 3. Les canalopathies transcriptionnelles :

Elles sont dues à des modifications de la transcription de gènes non mutés codant pour des canaux ioniques. Ces modifications peuvent aboutir à l'extinction ou l'apparition de canaux ioniques à la membrane (Waxman, 2001). Un exemple qui s'avèrera révélateur pour la suite

de ce travail est celui de l'incidence d'une lésion de nerfs périphériques (*peripheral nerve injury*) sur la transcription de canaux ioniques. En cas de lésions de nerfs sensitifs des ganglions rachidiens dorsaux, des études démontrent un remaniement du profil d'expression de ces neurones favorisant les canaux sodiques voltage-dépendants. Il a été notamment démontré qu'une axotomie de ces nerfs sensitifs entraîne la disparition des canaux $Na_v1.8$ et $Na_v1.9$ et l'apparition des canaux $Na_v1.3$ (Dib-Hajj et al., 1996; Waxman et al., 1994). Les canaux $Na_v1.3$ ont la particularité de présenter une phase d'inactivation rapide. De ce fait, la période réfractaire de ces canaux est dramatiquement réduite et ils sont alors plus rapidement activables déclenchant au sein de ces neurones des « *bursts* » (bouffées) de potentiels d'action à haute fréquence et à terme une hyperexcitabilité de ces cellules (Cummins et al., 2001; Cummins and Waxman, 1997). De telles variations du profil d'expression de ces canaux ont été observées dans le cas des phénomènes d'*allodynia* (perception douloureuse d'un stimulus qui, à l'origine, ne l'est pas) et d'hyperalgésie au sein des modèles de rats présentant une lésion constrictive chronique de nerfs sensoriels (Dib-Hajj et al., 1999). Ce modèle et l'allodynie qui y est observée seront plus amplement abordés dans le chapitre IV.

II. C. 4. Les canalopathies dues à un défaut d'adressage (*trafficking*) :

Des mutations de gènes codant pour un canal ionique peuvent, outre avoir un impact sur la fonctionnalité comme il a été décrit précédemment, avoir une incidence sur le trafic intracellulaire de la protéine entre le réticulum, le golgi et l'export à la membrane plasmique (d'où l'appellation anglaise *trafficking*). Le canal $Na_v1.5$ est un bon exemple de ce type de canalopathie. Des mutations du gène *SCN5A* codant pour ce canal ont pour conséquence un défaut d'export à la membrane plasmique de ce canal (Baroudi et al., 2002; Baroudi et al., 2001). Cette altération de l'adressage à la membrane plasmique de ce canal a été mise en cause dans le syndrome Brugada. D'autres pathologies sont aussi engendrées par des rétentions de canaux au niveau du réticulum endoplasmique telles que pour les sous unités Kir6.2 et SUR1 formant les canaux potassiques K_{ATP} dans l'hyperinsulinémie congénitale (respectivement (Marthinet et al., 2005) et (Sharma et al., 1999)) ou encore pour les canaux HERG (*human ether-a-gogo related gene*) dans le syndrome du QT long (Zhou et al., 1998) et enfin pour le récepteur-canal $GABA_A$ dans l'épilepsie (Kang and Macdonald, 2004).

II. C. 5. Les canalopathies dues aux isoformes des canaux ioniques par épissage alternatif (« splice variants »)

L'épissage des pré-ARN messagers concerne au moins 95% des transcrits et constitue un préalable à l'exportation des messagers matures dans le cytoplasme, siège de la synthèse protéique. Il est sujet à de nombreuses variantes, ou épissages alternatifs, qui permettent l'assemblage de transcrits codant pour des protéines différentes, plus petites que celle obtenue par un épissage classique. Des mutations au sein des sites accepteurs et donneurs d'épissage ou des mutations générant de nouveaux sites donneurs et accepteurs auront pour conséquence l'apparition de ces isoformes. Dans le cas des canaux ioniques de telles isoformes peuvent présenter, par exemple, une fonctionnalité altérée, une absence d'adressage à la membrane plasmique ou encore une absence d'activité. Des mutations du gène encodant la sous-unité α_1 du canal calcique voltage-dépendant $Ca_v2.1$ sont à l'origine d'une pathologie dénommée migraine hémiplégique familiale (*Familial Hemiplegic Migraine* ; FHM). Une mutation non sens introduisant un codon stop au niveau du site accepteur d'épissage de l'intron 47 génère un canal $Ca_v2.1$ tronqué. Cette isoforme, par rapport à la forme normale, induit un décalage de la courbe d'activation du canal $Ca_v2.1$ vers des potentiels plus hyperpolarisés. Le canal sera donc plus actif au potentiel de repos des cellules neuronales ce qui contribue à l'augmentation de l'activité électrique neuronale corticale et à l'initiation de la migraine (Adams et al., 2009).

II. C. 6. Les canalopathies dues aux protéines partenaires et voies régulatrices intracellulaires

L'activité des canaux ioniques peut être régulée par des voies de transductions intracellulaires mais également par des protéines partenaires intracellulaires qui modulent aussi bien leur activité que leur adressage. Le canal sodique voltage-dépendant $Na_v1.5$ illustre parfaitement cette notion. Des mutations du gène codant pour ce canal (*SCN5A*) sont à l'origine de pathologies cardiaques comme par exemple le syndrome du QT long ou le syndrome Brugada. En plus de ces mutations touchant directement le gène codant pour le canal, de plus en plus de mutations des protéines partenaires de celui-ci ont été répertoriées et reliées à ces pathologies. Parmi elles on peut citer pour exemple des mutations du gène codant la cavéoline-3, connue pour interagir avec le canal, induisant une augmentation de l'activité de $Na_v1.5$ impliquée dans le syndrome du QT long. Deux mutations faux sens du gène codant la $\alpha 1$ -syntrophine, autre protéine interagissant avec le canal $Na_v1.5$, ont également pour

conséquence une augmentation du courant sodique et sont également impliquées dans le syndrome du QT long (pour revue (Abriel, 2009)).

III. Implication des canaux TRP dans la physiopathologie

Les canaux ioniques de la superfamille TRP sont impliqués dans des processus physiologiques importants tels que, au niveau cellulaire, la prolifération, la sécrétion, la différenciation et l'apoptose (Clapham, 2003; Ramsey et al., 2006). Dans le chapitre précédent, il a été décrit la grande diversité des modes d'activations des canaux TRP faisant intervenir des stimuli aussi bien physiques (température, pression, osmolarité) que chimiques. Il est donc tout à fait envisageable que, d'une part, ces canaux jouent un rôle dans la perception de stimuli extérieurs au niveau de nos différents sens et, d'autre part, que des dérégulations de l'activité de ces canaux aient des conséquences pathologiques importantes. Dans cette partie il sera donc d'abord question de l'implication des canaux TRP dans la physiologie des sens (vision, ouïe, goût, toucher et olfaction) et ensuite des pathologies résultant de leurs dysfonctionnements.

III. A. Rôles des canaux TRP dans la physiologie des sens

III. A. 1. La vue

Les canaux TRP ont été découverts de part leur rôle dans la photoperception chez la drosophile. Si, au premier abord, ils ne semblent pas impliqués directement dans le phénomène de vision chez les mammifères, ces canaux jouent néanmoins un rôle de photorécepteur dans les cellules ganglionnaires de la rétine (ou *intrinsically photosensitive retinal ganglion cells* (ipRGC)). Les travaux conjoints de David Berson *et coll.* et Samer Hattar *et coll.* ont démontré que si les bâtonnets et les cônes de l'œil sont engagés dans le phénomène de vision, ces cellules étaient également impliquées dans des processus photosensibles tels que la régulation du cycle nyctéméral (alternance veille / sommeil en relation avec des variations rythmiques et naturelles de la luminosité) et le réflexe photomoteur (ou pupillaire qui commande les ouvertures et fermetures de la pupille en fonction de la quantité de lumière pénétrant dans l'œil) (Berson et al., 2002; Hattar et al., 2002).

Les cellules ganglionnaires de la rétine ipRGC comportent une opsine photosensible différente de celle impliquée dans la phototransduction dans les bâtonnets et les cônes de l'oeil : la mélanopsine. Cette dernière est, comme la rhodopsine chez la drosophile, un récepteur couplé aux protéines G_q. Suivant le même schéma que celui décrit précédemment pour cette espèce, la stimulation de la mélanopsine entraîne l'activation des protéines G_q activant à leur tour la PLC_β auxquelles elles sont couplées. Cette phospholipase membranaire

régule positivement l'activité de canaux TRP membranaires dont l'activation produit une réponse lente, durable et proportionnelle à l'intensité de la lumière perçue. Ce type de réponse est en adéquation avec un rôle de photorécepteur dans le cadre d'une fonction biologique à faible fréquence de modification, comme celui du cycle nyctéméral. L'identification des canaux TRP impliqués dans ces phénomènes photosensibles est en cours mais d'ores et déjà une étude réalisée par Satchidananda Panda *et coll.* propose le canal TRPC3, orthologue des canaux TRP et TRPL de la drosophile chez les mammifères (Panda et al., 2005). De plus des études moléculaires et pharmacologiques permettent de proposer deux autres canaux TRP comme candidats au rôle de photorécepteurs dans les cellules ganglionnaires de la rétine ipRGC : les canaux TRPC6 et TRPC7 (Damann et al., 2008).

III. A. 2. L'oreille interne et l'ouïe

L'oreille interne est composée de la cochlée (pour l'audition) et de l'organe vestibulaire (pour la perception de l'équilibre). Ces deux structures sont tapissées de cellules ciliées qui traduisent les stimulations mécaniques que sont les vibrations sonores et les mouvements de la tête en signaux neuronaux qui seront transmis au système nerveux central via la huitième paire de nerfs crâniens (VIII). Afin de convertir cette stimulation mécanique en dépolarisation membranaire, il est nécessaire qu'une structure serve de convertisseur entre les mouvements des cils de ces cellules et l'information électrique qui sera conduite le long du nerf acoustique VIII. De récentes études, en prenant comme point de départ la découverte du canal TRPN1 en tant que mécanorécepteur chez la drosophile (Walker et al., 2000), proposent les canaux TRP comme candidats.

D'importants soupçons se sont portés sur le canal TRPV4. En effet, il est exprimé dans les cellules sensorielles ciliées. De plus, un important faisceau de conjonctions le rend très intéressant à étudier. Il est tout d'abord l'homologue de l'osmo- et mécanorécepteur OSM-9 chez *Caenorhabditis elegans*. De plus, le gène *trpv4* est également le plus proche homologue, chez les vertébrés, des gènes TRP *Inactive* et *Nanchung*, deux gènes primordiaux pour l'audition chez la drosophile (Kim et al., 2003). Cette hypothèse s'est vérifiée grâce aux souris TRPV4^{-/-} qui présentent des troubles de l'audition (Tabuchi et al., 2005).

Mais tous les canaux TRP impliqués dans les phénomènes auditifs ne sont pas des mécanorécepteurs. Les canaux TRPV5 et TRPV6 sont impliqués dans la régulation de la concentration en calcium de l'endolymphe. Cette dernière est un liquide qui remplit la cochlée et dont les mouvements, initiés en amont par les vibrations sonores, entraînent et

agitent les cils des cellules qui tapissent l'oreille interne. Ces canaux sont requis pour une audition normale. Il a été démontré que leur dysfonctionnement est à l'origine du syndrome de Pendred, à savoir une surdité congénitale bilatérale neurosensorielle. Afin d'obtenir une audition normale, il faut que la concentration calcique de l'endolymphe soit basse. TRPV5/6 empêchent toute augmentation de la concentration calcique de l'endolymphe en capturant le calcium dans les cellules épithéliales et en maintenant cette concentration aux alentours de 250 μ M (Nakaya et al., 2007).

Un dernier canal TRP est intéressant à préciser : TRPML3. La découverte de mutations du gène *trpml3* au sein des souris *varitint-waddler* (*Va*) a porté ce canal au centre de nombreuses attentions. En effet, le phénotype des souris homozygotes *Va* comporte une profonde surdité ainsi que des dysfonctionnements vestibulaires (déséquilibre, désorientation). TRPML3 est localisé plus particulièrement dans la membrane des stéréocils des cellules épithéliales de l'oreille interne. Dans ce cas également il ne s'agirait pas d'un mécanosenseur. Ce canal serait principalement requis pour l'organisation des stéréocils (Cuajungco and Samie, 2008; Di Palma et al., 2002).

III. A. 3. Le goût

L'homme perçoit 5 classes de saveurs primaires : amères, sucrées, acides, salées et « unami » (terme japonais se rapprochant de savoureux, délicieux et directement lié au goût du glutamate abondamment utilisé dans la cuisine asiatique). De récents travaux démontrent que les canaux TRPs sont impliqués dans la détection de ces saveurs ainsi que dans la transmission des messages gustatifs. De nombreux travaux démontrent que, au sein des papilles gustatives de la langue, le canal TRPM5 semble être un acteur clé dans physiologie du goût (pour revue (Chandrashekar et al., 2006)).

III. A. 3. a) TRPM5 et les saveurs amères, sucrées et « unami »

Les cellules réceptrices des papilles gustatives possèdent des récepteurs de type T1Rs et T2Rs (Taste Receptor) membranaires sensibles aux saveurs amères, sucrées et « unami ». Ces récepteurs sont couplés aux protéines G de la classe α -gustducin. Leur stimulation aboutie à l'activation de la PLC β 2 et à la production d'IP $_3$ et de DAG. L'IP $_3$, par son récepteur réticulaire, déclenche la déplétion des stocks calciques du réticulum endoplasmique. Cette vidange active à son tour les canaux TRPM5 situés à la membrane plasmique. L'entrée de sodium via TRPM5 génère un potentiel récepteur dépolarisant qui sera transmis aux fibres

nerveuses afférentes des nerfs crâniens VII, IX et X, impliqués dans la transmission de l'information gustative, situées à proximité (pour revue (Liman, 2007)).

Les travaux réalisés par Karel Talavera *et coll.* apportent au rôle de TRPM5 dans la physiologie du goût une donnée des plus intéressantes. En effet, il a été décrit que la saveur sucrée est d'autant plus intensément ressentie que la température de la substance goûtée est élevée (Bartoshuk et al., 1982; Green and Frankmann, 1988). Leurs résultats démontrent que TRPM5 est sensible aux élévations de température, entre 15 et 35°C. En augmentant la température dans cette gamme, cette équipe a constaté que la réponse électrique des nerfs gustatifs à des composés sucrés était accrue chez les souris sauvages à l'instar des souris TRPM5^{-/-}. Les auteurs expliquent donc pourquoi la qualité gustative d'un aliment à 37°C est meilleure par rapport à un aliment froid (Talavera et al., 2005).

III. A. 3. b) La détection des saveurs acides et salées

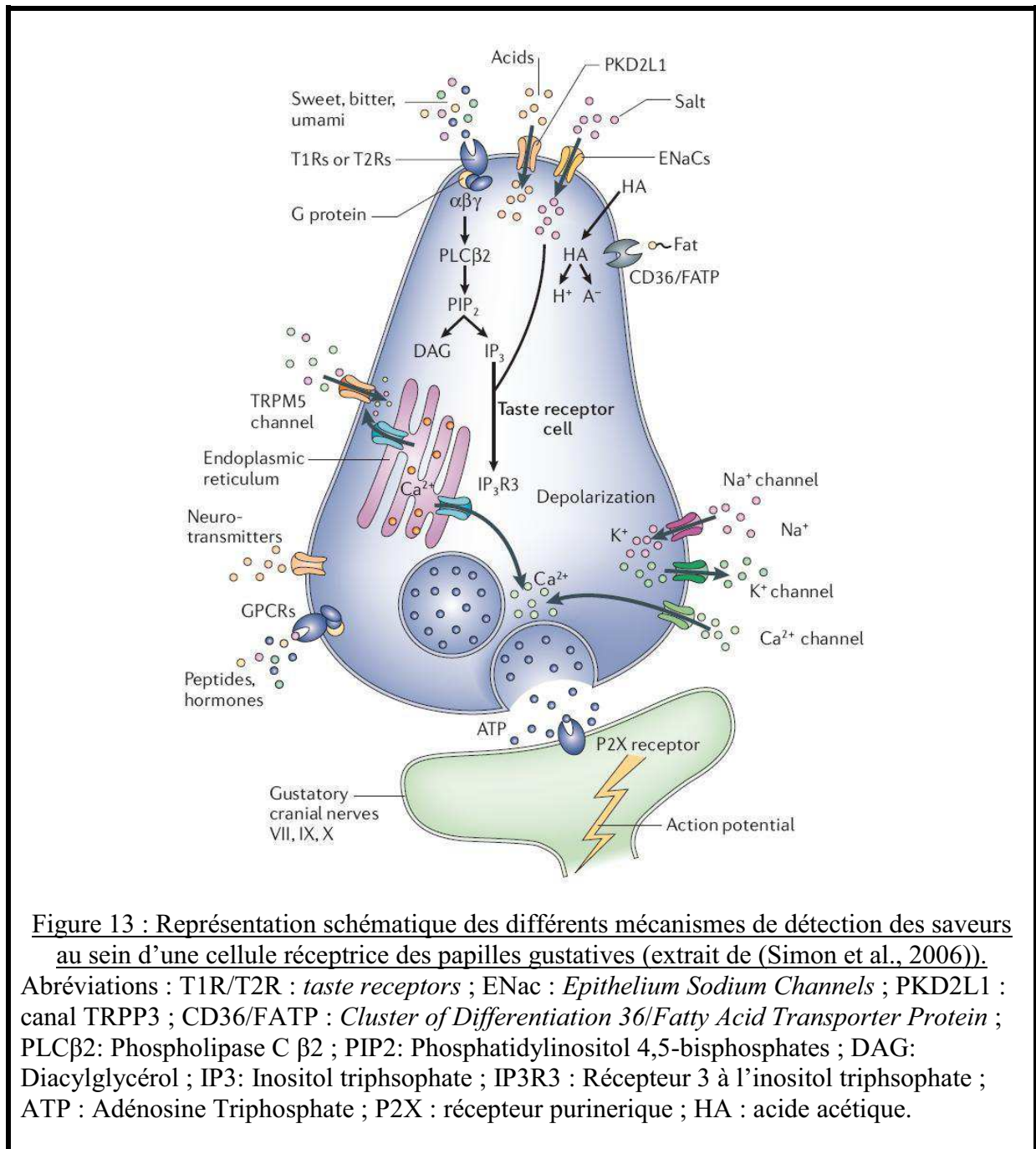
Les saveurs aigres et acides sont perçues par un complexe protéique composé de deux membres de la famille TRPP : TRPP3 (PKD2L1) et PKD1L3 (Ishimaru et al., 2006). Ces derniers ne sont pas exprimés dans les cellules réceptrices mais à la membrane plasmique des cellules présynaptiques de type III des papilles gustatives. Les observations sur les souris TRPP3^{-/-} qui ne présentent plus de sensibilité aux aliments acides viennent confirmer les résultats obtenus *in vitro*. La stimulation de ce complexe protéique fait suite à l'entrée d'acide acétique (molécule perméante) dans le cytoplasme. Cet acide en se dissociant libère des protons qui vont acidifier le pH intracellulaire. Cette diminution du pH active le complexe TRPP3/PKD1L3 qui, de part l'entrée de sodium via cette structure, est à l'origine d'un potentiel de membrane dépolarisant, d'une activation des canaux calciques voltage-dépendants et d'une libération de sérotonine à destination des récepteurs 5-HT3 des fibres nerveuses afférentes des nerfs gustatifs (Huang et al., 2008; Kataoka et al., 2008).

Concernant le goût salé, ce dernier est identifié par des canaux sodiques membranaires de type ENaC (*Epithelium Sodium Channels*) présents au sein des cellules réceptrices papillaires de la langue. Leur activation conduit également à la libération de sérotonine (pour revue (Simon et al., 2006)).

III. A. 3. c) La perception gustative des lipides alimentaires

Des études comportementales sur la souris ont démontré que, outre leurs propriétés olfactives et texturales, la préférence pour les aliments riches en lipides dépend de leurs propriétés

gustatives. Un récepteur à haute affinité aux acides gras à longues chaînes a été isolé au niveau des cellules réceptrices des papilles gustatives : la protéine CD36 (Laugerette et al., 2005). La stimulation de cette glycoprotéine membranaire par des lipides entraîne l'activation de la PLC et, par le même mécanisme que pour les saveurs sucrées, amères ou « unami », aboutit à l'activation du canal TRPM5, produisant ainsi une dépolarisation membranaire et la libération de sérotonine (El-Yassimi et al., 2008). Il est à noter que la préférence pour les aliments gras est perdue chez les souris TRPM5^{-/-} (Sclafani et al., 2007).



III. A. 3. d) Perception de l'assaisonnement

En plus des cellules réceptrices et présynaptiques des papilles gustatives, on retrouve au niveau de la langue et du palais des terminaisons libres de nerfs sensitifs issus des ganglions trigéminaux. Plusieurs canaux TRP sont exprimés au niveau de ces terminaisons nerveuses et détectent les propriétés physiques, chimiques et thermiques des aliments présents dans la cavité buccale. On retrouve notamment :

- TRPM8 pour la détection des aliments froids et des agents au pouvoir réfrigérant tels que le menthol et l'eucalyptol.
- TRPV1 pour les aliments chauds et les piments, tels que la capsaïcine pour le piment du chili et du poivre, apportant la sensation de chaleur caractéristique entraînée par ces composés.
- TRPA1 pour toutes les substances piquantes, âcres telles que la moutarde, l'ail, le wasabi.
- TRPV3 pour des condiments tels que le clou de girofle, le thym, l'origan et la sarriette (pour revue (Simon et al., 2006)).

III. A. 4. L'olfaction

Des terminaisons libres des nerfs sensitifs issus des ganglions trigéminaux sont également présentes au niveau de la cavité nasale. De ce fait, les canaux cités ci-dessus (TRPM8, TRPV1, TRPV3, TRPA1) sont également impliqués dans la détection de ces différentes épices et assaisonnements au niveau de l'odorat (Damann et al., 2008).

D'autres canaux TRP sont aussi présents au niveau des cellules de l'épithélium nasal. La détection des phéromones chez différentes espèces de mammifères, mis à part les primates, repose sur les canaux TRPC2. Ces canaux sont exprimés au niveau de l'organe voméronasal. Cette structure, située sous la surface intérieure du nez, est spécialisée dans la détection de ces molécules. Des études *in vivo* ont été réalisées sur des souris TRPC2^{-/-}. Les mâles présentent une perte de l'agressivité entre mâles et un défaut de discrimination entre les deux sexes. Les femelles, quant à elles, ont un comportement maternel diminué en particulier au niveau de l'allaitement et de la protection maternelle. Les canaux TRPC2 sont activés par le DAG produit suite à l'activation de récepteurs membranaires aux phéromones couplés à des protéines Gq et à la PLC (Kimchi et al., 2007; Zufall et al., 2005).

De manière tout à fait intéressante, on retrouve le principal canal « senseur du goût », TRPM5, au niveau des neurones sensoriels olfactifs qui projettent leurs axones en direction

des glomérules de la partie ventrale du bulbe olfactif (Lin et al., 2007). Cette région est importante pour la détection de messagers chimiques olfactifs tels que les phéromones et l'urine (Lin et al., 2005; Lin et al., 2004; Schaefer et al., 2002). Les études réalisées sur ce canal dans l'olfaction démontrent que TRPM5 serait activé par le même mécanisme que celui explicité dans la partie sur le goût suite à l'activation de récepteurs aux phéromones (Lin et al., 2007).

TRPM5 est également exprimé à la membrane de cellules réceptrices isolées au sein de l'épithélium nasal. A ce niveau, les données de la littérature semblent conférer à ce canal un rôle dans la réponse olfactive à des substances amères. En effet, au niveau de ces cellules il a été reporté une coexpression de TRPM5 avec des récepteurs gustatifs T2Rs couplés aux protéines $G\alpha$ -gustducin/PLC β 2 (Gulbransen et al., 2008). Cette localisation de TRPM5 au sein de l'épithélium de la cavité nasale positionne ce canal en première ligne pour détecter la qualité de l'air inhalé (Lin et al., 2008). Les travaux de Weihong Lin *et coll.* proposent que TRPM5 engendre une réponse olfactive en transmettant les informations des stimulations irritantes ou des aliments amères aux nerfs trigéminaux innervant l'épithélium nasal dans le but de produire un réflexe de protection (Lin et al., 2008).

III. A. 5. Les TRP et la perception cutanée

Le sens du toucher rassemble la sensibilité aux stimuli mécaniques, thermiques, chimiques et la nociception. L'épiderme est innervé par des terminaisons issues des neurones sensoriels des ganglions rachidiens dorsaux et trigéminaux. Comme il a été décrit précédemment, des canaux TRP sont exprimés au niveau de ces terminaisons nerveuses. De ce fait, des investigations ont été réalisées pour déceler le rôle de ces canaux à ce niveau.

Concernant la mécanosensation au niveau épidermique, le canal TRPV4 a été identifié comme mécanorécepteur au sein des cellules de Merkel, cellules de l'épiderme impliquées dans la mécanosensation (Suzuki et al., 2003b). L'étude des souris TRPV4^{-/-} montrent qu'il contribue à la sensibilité cutanée à la pression et aux stimuli douloureux (Suzuki et al., 2003a). Néanmoins, les canaux TRP et la mécanosensation reste toujours un intense champ d'investigations et de débats (pour revue (Christensen and Corey, 2007)).

Du point de vue de la thermosensation, on retrouve au niveau des terminaisons nerveuses libres les canaux TRPM8, TRPV1 et TRPA1. L'application cutanée de menthol génère bien une sensation de froid via les canaux TRPM8 exprimés au niveau de ces terminaisons nerveuses. Le point le plus intéressant de l'étude des TRP dans la sensibilité cutanée est la

relation entre ces canaux et la nociception. En effet, le canal TRPV1, exprimé dans les neurones nocicepteurs (une sous-population de fibres nerveuses afférentes de petit diamètre) a été décrit comme un acteur clé de la transmission des stimuli douloureux. Ce canal est activé par des températures élevées, douloureuses ($>43^{\circ}\text{C}$) ainsi que par la capsaïcine qui est connue pour générer une sensation de brûlure lorsqu'elle est appliquée sur la peau. L'activation par ces stimuli nocicepteurs du canal TRPV1 va, au niveau de la membrane des nerfs sensoriels exprimant ce canal, être à l'origine d'une dépolarisation et de la libération de neuropeptides tels que la substance P et la *calcitonin gene-related peptide* (CGRP) (Zeilhofer et al., 1997). Ces deux neuromodulateurs jouent des rôles importants dans le contrôle de l'information douloureuse. Enfin, des médiateurs de l'inflammation peuvent activer directement ou sensibiliser le canal TRPV1 aboutissant à une hyperalgésie thermique (Planells-Cases et al., 2005). En effet, des souris TRPV1^{-/-} présentent toujours une sensibilité au chaud mais ne développent plus d'hyperalgésie thermique en cas d'inflammation (Caterina et al., 2000).

Coexprimés avec TRPV1 dans une sous population de neurones sensoriels nocicepteurs de petit diamètre des ganglions trigéminaux et rachidiens dorsaux, les canaux TRPA1 sont activés par des températures basses douloureuses ($<15^{\circ}\text{C}$) mais également par des substances chimiques irritantes comme la moutarde ou l'ail et des médiateurs de l'inflammation (endocannabinoïdes, bradykinine). De ce fait, ce canal semble également important dans la nociception.

En plus des canaux TRPV1, TRPM8 et TRPA1, deux autres canaux sensibles aux augmentations de température jouent un rôle dans ce domaine : TRPV3 et TRPV4. Ces deux protéines sont exprimées non pas au niveau des terminaisons sensorielles mais à la membrane des kératinocytes. L'activation de TRPV3 et TRPV4 par des élévations de la température entraîne une dépolarisation de la membrane de ces cellules par entrée de sodium et de calcium. Cette dépolarisation est ensuite transmise aux terminaisons des nerfs sensitifs par un mécanisme non encore élucidé (Talavera et al., 2008).

III. B. TRPpathies

Comme décrit dans le chapitre II, les canalopathies sont des pathologies dues à des altérations du fonctionnement, de l'expression ou de l'adressage de canaux ioniques. Par extension, dans cette partie il sera question des « *TRPpathies* », c'est-à-dire les canalopathies dues aux canaux TRP (Kiselyov et al., 2007).

Les pathologies liées aux canaux TRP sont aussi diverses que les fonctions biologiques auxquels ils participent, c'est pourquoi de plus en plus de travaux et de revues sont publiées sur ce sujet. Nous allons ici citer quelques exemples de ces *TRPpathies*.

III. B. 1. TRPML1 et la mucopolipidose de type IV

TRPML1 est un canal calcique non sélectif encodé par le gène *MCOLN1* (Bassi et al., 2000; Sun et al., 2000). Des mutations de ce gène ont été décrites comme étant à l'origine de la mucopolipidose de type IV. C'est une pathologie autosomale récessive et neurodégénérative. Elle est caractérisée par des retards psychomoteurs graves, une opacification de la cornée ainsi qu'une dégénérescence de la rétine. Le retard psychomoteur est évident dès la première année de vie, la maladie progressant ensuite lentement. Cette pathologie touche, au niveau cellulaire, le stockage des lysosomes. Les cellules des patients, quelque soit le type ou le tissu, présentent toutes une forte accumulation dans leur cytoplasme de lysosomes aux membranes anormalement riches en lipides (notamment en phospholipides et gangliosides).

Les mutations affectant le gène *MCOLN1* et causant cette pathologie sont des mutations non-sens ou faux sens. Elles aboutissent à une délétion du canal, ou bien affectent soit la localisation subcellulaire, soit les sélectivité et perméabilité du canal TRPML1 (Cantiello et al., 2005; Kiselyov et al., 2005; LaPlante et al., 2004; Manzoni et al., 2004; Raychowdhury et al., 2004).

TRPML1 est un canal ionique enchâssé dans la membrane lysosomale. Il a été reporté qu'il limite l'acidification du pH de ces organites en créant une fuite de protons H^+ en direction du cytosol (Soyombo et al., 2006), le pH lysosomal étant vital pour le bon fonctionnement de cet organite. Dans le cas de mutations entraînant l'absence du canal, des études reportent une acidification importante du pH intralysosomal à l'origine d'une chute de l'activité de lipases présentes dans ces lysosomes. Ce défaut d'activité lipase expliquerait la présence anormalement élevée de lipides, typique de la mucopolipidose, dans les membranes des lysosomes autres organites intracellulaires (Soyombo et al., 2006).

III. B. 2. TRPM6 et l'hypomagnésie avec hypocalcémie secondaire

C'est une maladie autosomale récessive caractérisée par un faible taux de calcium et de magnésium dans le sérum. Ce désordre est dû à un défaut de réabsorption du magnésium au niveau intestinal (caractéristique de ce type d'hypomagnésie héréditaire) ainsi qu'à la présence supplémentaire d'une fuite de cet ion au niveau rénal. Les patients atteints de cette pathologie présentent de multiples symptômes neurologiques ainsi que des spasmes.

Cette maladie est génétiquement reliée à des mutations du gène codant pour le canal TRPM6. Ce canal possède une forte perméabilité au magnésium. Les mutations touchant le gène *trpm6* aboutissent pour la plupart à une protéine tronquée par introduction de codons stop précoces. Ces protéines mutées sont souvent dépourvues de pore, donc non fonctionnelles (Chubanov et al., 2007), ce qui explique l'absence de réabsorption de magnésium au niveau intestinal. L'hypocalcémie secondaire est due à une insuffisance parathyroïdienne lors d'une profonde hypomagnésie.

D'autres types de mutations ont été reportés pour ce canal. En particulier, une mutation ponctuelle du gène *trpm6* consistant en la substitution de la sérine 141 en leucine est suffisante pour abolir la formation d'homotétramères de TRPM6 ainsi que la formation d'hétérotétramères TRPM6/TRPM7 entraînant une diminution de l'absorption de magnésium par la cellule (Chubanov et al., 2004).

III. B. 3. TRPP2 et la ADPKD

La maladie polykystique rénale autosomique dominante (*Autosomal dominant polycystic kidney disease* (ADPKD)) est une affection fréquente (environ 1 cas pour 1000 naissances) caractérisée par la présence de kystes dans le parenchyme rénal. Elle n'est pas limitée uniquement aux reins mais touche beaucoup d'autres organes (présence de kystes dans le foie et le pancréas). C'est la plus fréquente des maladies héréditaires rénales. L'ADPKD est corrélée avec des mutations des gènes codant pour les canaux TRPP1 et TRPP2 : les tissus présentant des kystes n'expriment pas de canaux TRPP1 et TRPP2 fonctionnels (pour revue (Nilius et al., 2007)).

Des mutations du canal TRPP1 sont aussi associées avec d'autres troubles comme l'anévrisme cérébral et aortique, des défauts valvulaires au niveau cardiaque et l'hernie inguinale. Pour TRPP2, des mutations touchant ce canal ont été reliées à des malformations cardiaques telles qu'un défaut de formation du septum (Wu et al., 2000).

Pour l'ADPKD, la formation de kystes est due à une prolifération accrue des cellules épithéliales au niveau des tubules rénaux. Ces cellules n'expriment pas de TRPP2 ce qui démontre le rôle de ce canal comme régulateur négatif de la prolifération cellulaire (Gonzalez-Perrett et al., 2001; Nilius, 2007).

III. B. 4. TRPC6 et la sclérose glomérulaire segmentaire focale

La sclérose glomérulaire segmentaire focale est une pathologie du rein où la rigidification de certains glomérules conduit inexorablement à la perte de fonction de la filtration rénale. Cette maladie est une maladie autosomale dominante, mais présente aussi des cas sporadiques. Plusieurs mutations du canal TRPC6 dans les podocytes sont responsables d'un important gain de fonction de TRPC6 (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005). Intervenant dans la filtration rénale, les podocytes sont des cellules de l'épithélium rénal qui déterminent la perméabilité de la barrière glomérulaire à des macromolécules telles que le glucose et des protéines. Ces podocytes forment les fentes du filtre glomérulaire et leur contraction régule cette perméabilité.

L'activité accrue de TRPC6 dans ces cellules pourrait engendrer une élévation drastique du calcium intracellulaire conduisant à l'apoptose de ces podocytes. Il s'ensuivra des dysfonctionnements du filtre glomérulaire et donc une augmentation persistante de la perméabilité glomérulaire aux macromolécules, ce qui expliquerait la perte de la fonction de filtration du glomérule dans cette pathologie. (Reiser et al., 2005).

III. B. 5. TRP et cancers

III. B. 5. a) TRPM1 et le mélanome

Le gène *mélastatine* (*mlsn-1*) code pour le premier membre de la famille des canaux TRPM : TRPM1. L'expression des ARNm *trpm1* est retrouvée dans le mélanome et disparaît lors du développement métastatique des mélanomes cutanés malins (Duncan et al., 1998). Cette corrélation inverse entre l'expression des ARNm *trpm1* et le potentiel métastatique des cellules de ces tumeurs épidermales fait de TRPM1 un marqueur pronostique permettant de discriminer entre mélanomes métastatiques et non métastatiques. De plus, cette disparition au cours du développement du cancer fait que certaines études suggèrent que le gène *trpm1* serait un suppresseur de tumeur.

Il existe deux variants de ce canal, une forme native, longue, TRPM1-L et une forme tronquée ne présentant pas de domaines transmembranaires et donc pas de pore, TRPM1-S. Cette petite

isoforme interagirait avec la forme normale de TRPM1 afin de la retenir dans le cytoplasme. TRPM1 étant un canal calcique, la rétention de ces canaux dans le cytoplasme par les isoformes tronquées est à l'origine d'une perte de fonction de TRPM1 et jouerait un rôle important dans la régulation de l'entrée calcique dans ces cellules. Il a été suggéré que TRPM1 serait impliqué dans la prolifération cellulaire de part sa fonction de canal calcique membranaire mais son rôle exacte dans le mélanome est toujours à l'étude (Fang and Setaluri, 2000; Venkatachalam and Montell, 2007).

III. B. 5. b) *TRPV6, TRPM8 et cancer : cas de la surexpression de gènes*

Le gène *trpv6* n'est que peu ou pas exprimé dans la prostate saine et hyperplasique. Son expression croît lors de la cancérogénèse et semble particulièrement élevée dans les métastases de la prostate, ainsi que dans les cancers hormono-indépendants (Peng et al., 2001; Wissenbach et al., 2001). Son expression est également augmentée dans les cancers du colon, de la thyroïde, du sein et des ovaires (Prevarskaya et al., 2007b). De ce fait, *trpv6* semble être un bon marqueur de la tumorigénèse de ces tissus et organes.

Des travaux du laboratoire ont démontré que, dans les cellules épithéliales prostatiques LNCaP, l'entrée de calcium par les canaux TRPV6 est impliquée dans la régulation de la prolifération de ces cellules. La surexpression de ce canal au cours de la cancérogénèse aurait pour effet de maintenir une prolifération élevée, de favoriser la survie et la résistance à l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses (Lehen'kyi et al., 2007).

Un autre canal TRP associé au cancer de la prostate est le canal TRPM8 dont le gène présente également des variations d'expression au cours de la cancérogénèse prostatique. En effet, le gène *trpm8* voit son taux d'expression varier en fonction des stades de cancer de la manière suivante : dans la prostate saine, on détecte un niveau d'expression faible. Dans les cancers prostatiques androgéno-dépendants l'expression de *trpm8* augmente fortement (Tsavaler et al., 2001) tandis que dans les cancers avancés, androgéno-indépendants, son expression disparaît (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003). De ce fait, le canal TRPM8 pourrait être impliqué directement dans la cancérisation des cellules prostatiques. Au vu de ces résultats, les auteurs proposent également TRPM8 comme nouveau marqueur pronostique du cancer de la prostate. De plus, l'étude réalisée par Zhang et Barritt en 2004 démontre que ce canal est primordial dans la survie des cellules épithéliales prostatiques (Zhang and Barritt, 2004).

Conclusion :

Cette étude bibliographique démontre bien la diversité des membres de la superfamille des canaux TRP. Avec chez les mammifères 32 gènes réparties en 7 sous-familles, cette profusion de canaux affiche toute sa variété quand on s'intéresse à leurs voies d'activation. SOC, SMOC, thermorécepteurs ou mécanorécepteurs, les canaux TRP se classent dans ces quatre grandes classes de modes d'activation. Les dernières avancées ont du reste montré que, s'ils n'étaient pas des canaux VOC au sens classique du terme, certains d'entre eux possédaient un *voltage sensor*.

Dans la régulation de processus cellulaire telles que la prolifération, la sécrétion ou encore l'apoptose en passant par des grandes fonctions sensorielles comme la vue, la perception cutanée ou le goût, les canaux TRP sont des acteurs physiologiques majeures et leurs dérèglements (TRPathies) à l'origine de graves troubles.

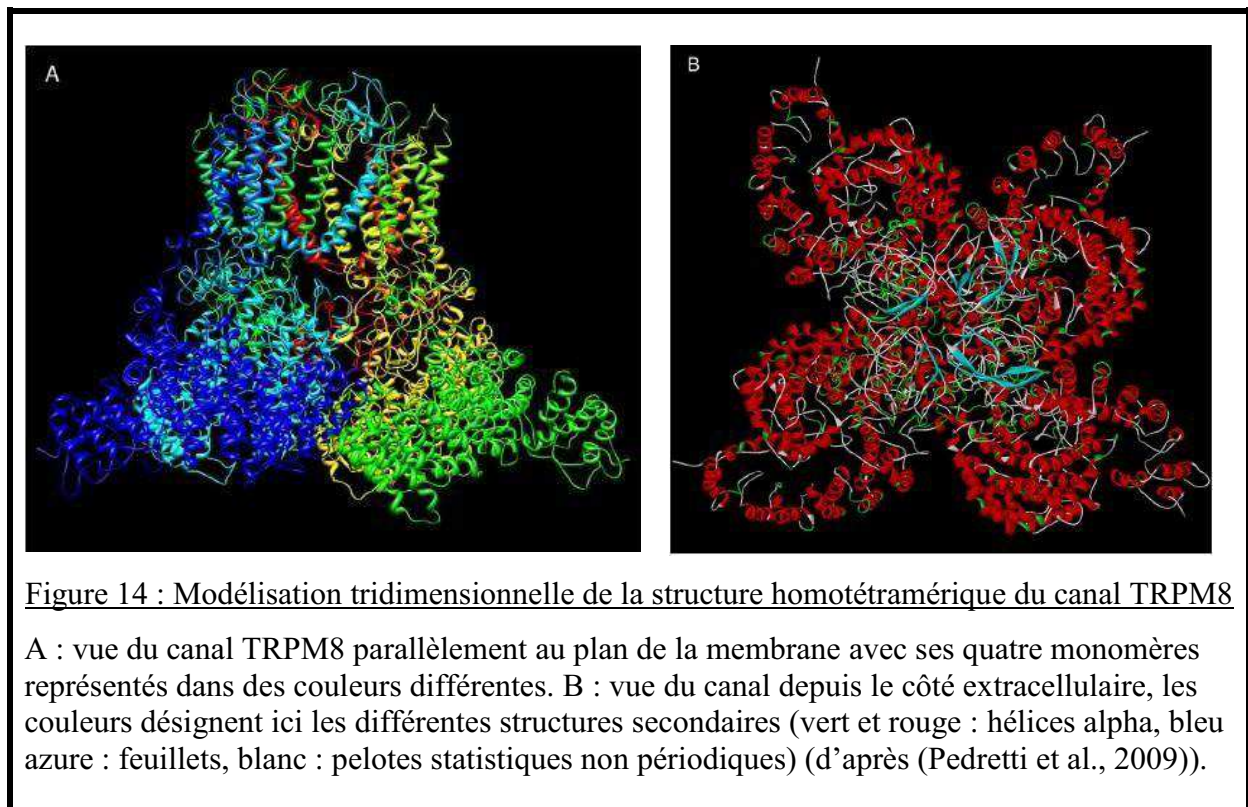
Au vu de ces données, l'étude de ces canaux TRP, de leurs modes de régulation et de leurs rôles dans la physiopathologie représentent des champs d'investigations particulièrement intéressants.

IV. TRPM8

IV. A. Découverte et structure

En recherchant de nouveaux marqueurs spécifiques des cellules prostatiques, l'équipe de Tsavaler, en 2001, identifie un nouveau gène dont l'expression semblait cantonnée à la prostate saine. Ce gène s'avérait également surexprimé dans le cancer de la prostate ainsi que dans différents autres cancers tels que ceux du colon, du poumon, du sein et de la peau (Tsavaler et al., 2001). Leurs résultats indiquaient que ce gène codait, chez l'homme, pour une protéine de 128 kDa qui présentait une forte homologie avec les canaux de la famille TRP. Ils le baptisèrent *trp-p8*. Même si, dans cet article, les auteurs n'apportaient pas de données sur la caractérisation fonctionnelle de cette protéine, ils la décrivent néanmoins comme un canal calcique. Suite à une unification de la nomenclature des canaux TRP par Craig Montell (2002) (Montell et al., 2002), cette protéine TRP-P8 fut rapprochée de la sous-famille mélastatine des canaux TRP et rebaptisée TRPM8.

Parallèlement à cela, deux équipes américaines dirigées par David Julius et Ardem Patapoutian publièrent, quasiment en même temps, respectivement dans *Nature* et *Cell* la découverte du récepteur au froid. Tout d'abord nommé CMR1 (*cold menthol receptor 1*), il s'avéra rapidement que ce récepteur était le canal TRPM8 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a).



Le gène *trpm8* est localisé au niveau du chromosome 2 (emplacement 2q37.1) et code pour une protéine de 1104 acides aminés. La structure du canal TRPM8 reprend l'archétype de celle des canaux TRP (figure 5) avec ses six domaines transmembranaires et des extrémités amino- et carboxyterminales cytoplasmiques. L'extrémité aminotermine présente de nombreux domaines d'homologie avec les TRPM. L'extrémité carboxyterminale comporte, quant à elle, un domaine « *TRP box* » important dans la régulation de ce canal par les lipides. Assemblé en homotétramère (figure 14), c'est un canal cationique non sélectif (Voets et al., 2007b).

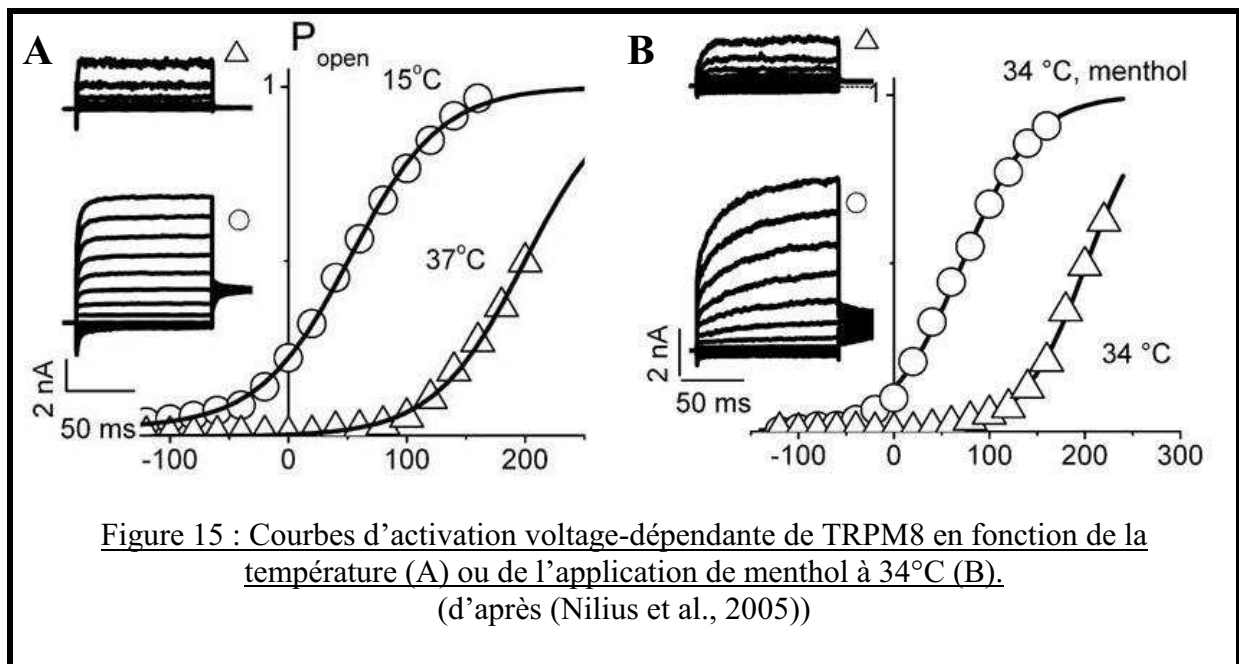
IV. B. Modes d'activation

IV. B. 1. La température

Le canal TRPM8 est un thermorécepteur, il est activé par la diminution de température dans une gamme comprise en 8 et 28°C. L'activation du canal TRPM8 par la température (maximale entre 10 et 15°C) dans les neurones thermosensoriels induit une dépolarisation membranaire qui, lorsqu'elle dépasse le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants, provoque le déclenchement d'un message nerveux sous forme de train de PA (de la Pena et al., 2005).

L'étude réalisée en 2004 par Thomas Voets de l'équipe de Bernd Nilius (Louvain, Belgique) sur la sensibilité du canal TRPM8 à la température a permis de mettre en évidence les fondements thermodynamiques de sa thermosensibilité (Voets et al., 2004a).

L'ouverture du canal TRPM8 est dépendante du voltage. Grâce à une analyse électrophysiologique, il est possible de tracer la courbe d'activation du canal, c'est-à-dire la relation entre la probabilité d'ouverture du canal et le voltage. Cette courbe montre que le canal TRPM8 à de hautes températures, telles que la température corporelle, s'active pour des potentiels très dépolarisés. Les résultats obtenus par Thomas Voets *et coll.* montrent qu'une diminution de la température entraîne un décalage de la courbe d'activation vers des potentiels plus physiologiques, c'est-à-dire plus hyperpolarisés (figure 15). De ce fait, le canal à basses températures s'active au potentiel de repos des cellules (souvent compris entre -30 et -70 mV).



De manière plus thermodynamique, l'explication de la sensibilité du canal TRPM8 fait appel à la loi d'Arrhénus qui décrit la relation entre la vitesse des réactions chimiques en fonction de la température et de l'énergie d'activation. Si l'on considère le coefficient de Van't Hoff (Q_{10}) qui représente le facteur par lequel la vitesse d'une réaction est multipliée lorsque l'on élève de 10°C la température à laquelle se développe cette réaction. Le Q_{10} de la réaction d'ouverture du canal TRPM8 est de 1,2 (c'est-à-dire que la vitesse d'ouverture du canal est multipliée d'un facteur 1,2 quand on augmente de 10°C la température de la réaction) alors que le Q_{10} de la réaction de fermeture du canal est de 9,4 (Voets et al., 2004b). Au vu de ces valeurs on comprend donc que l'état d'ouverture du canal est très peu influencé par la température mais par contre l'état de fermeture est extrêmement dépendant de ce paramètre. Dans le cas de TRPV1, le principe est le même mais cette fois c'est la réaction d'ouverture qui est dépendante de la température avec un Q_{10} de 14,8 alors que celle de fermeture à un Q_{10} de 1,2. Cette étude thermodynamique et l'utilisation du coefficient de Van't Hoff permettent donc d'expliquer pourquoi TRPV1 est sensible à de hautes températures et TRPM8 à de basses températures (Voets et al., 2004b).

Deux modèles s'affrontent pour décrire l'activation de TRPM8 à la fois par la température et par le voltage, le modèle « *two-state gating model* » proposé par Bernd Nilius (Voets et al., 2004a) et le modèle allostérique décrit par Ramon Latorre (Latorre et al., 2007).

Le modèle de Nilius propose que la température et le voltage régulent TRPM8 en un même site. La sensibilité à la température ou à un ligand (le menthol) résulterait de modifications de la dépendance du canal au voltage. Ce modèle assez simple dans son concept ne tient

néanmoins pas compte du fait que la température peut activer le canal indépendamment du voltage (Brauchi et al., 2004).

Le modèle allostérique de Ramon Latorre et Sebastian Brauchi prend en considération l'existence d'une voie de modulation de TRPM8 par la température indépendamment du voltage. Le modèle propose que la température et le voltage sont capables d'agir sur le canal séparément mais en s'influençant l'un l'autre par allostérie, l'un facilitant l'activation du canal par l'autre et inversement (Brauchi et al., 2004; Latorre et al., 2007).

Les travaux de José Matta abondent dans le sens du modèle allostérique. Il démontre que lors de l'utilisation de fortes concentrations de menthol, l'activation du canal TRPM8 devient indépendante du voltage. De plus, à température ambiante, la dépolarisation membranaire enregistrée consécutive à l'activation des canaux TRPM8 par la température arrive à saturation autour de 50-60% de la probabilité d'ouverture maximale du canal. Si l'activation des canaux TRPM8 par la température était dépendante du voltage, il ne devrait pas y avoir de saturation. De ces observations les auteurs concluent que le seul modèle expliquant leurs résultats est le modèle allostérique au sein duquel le voltage, la température et les agonistes sont indépendamment couplés au *gating* du canal (Matta and Ahern, 2007). Les canaux TRP polymodaux tels que TRPM8 ou TRPV1 (régulé par les hautes températures, le voltage et la capsaïcine (Voets et al., 2004a)) seraient donc équipés de différents senseurs indépendants mais agissant de concert pour réguler l'ouverture du canal.

IV. B. 2. Les agonistes

Outre la température, TRPM8 est activé par des substances chimiques qui miment les effets du froid. Les plus connues sont le menthol qui dérive de la menthe poivrée, l'eucalyptol et l'iciline. Des travaux réalisés au laboratoire sur des molécules analogues du menthol et de l'iciline appelées « WS » (obtenues auprès du Dr. Eddie Wei de l'Université de Berkley, Etats Unis) ont permis de mettre en évidence un nouvel agoniste extrêmement affiné pour ce canal : WS-12 (2-isopropyl-5-méthyl-cyclohexanecarboxylique acid (4-méthoxy-phenyl)-amide). Les « WS » sont des composés développés depuis les années 1970 afin d'augmenter le pouvoir réfrigérant du menthol lors de contact avec la peau ou dans la cavité buccale. Les résultats obtenus par le laboratoire montrent que le WS-12, une molécule dont la structure dérive de celle du menthol, présente la plus haute affinité connue pour TRPM8 avec un EC_{50} 2000 fois inférieur à celui du menthol (Beck et al., 2007).

D'autres molécules qui ne sont pas destinées à mimer les effets du froid ont été découvertes en tant qu'agonistes de TRPM8. Il s'agit de substances retrouvées dans les huiles essentielles : géraniol (géranium, citron), le linalol (lavande, bergamote) et l'hydroxy citronellal (citronelle) (pour revue (Voets et al., 2007b)).

IV. B. 2. a) Activation par l'iciline et régulation par le calcium intracellulaire

L'iciline est resté longtemps (avant la découverte du WS-12) comme le composé le plus affiné pour TRPM8. En effet son affinité pour le canal est deux cents fois supérieure à celle du menthol. Les travaux de Chuang *et coll.* ont explicité le mode d'activation de TRPM8 par l'iciline. A la différence du menthol et du froid, l'iciline nécessite, pour exercer son action de manière optimale, une élévation de la concentration intracytoplasmique en calcium. Cette augmentation du calcium cytoplasmique peut provenir soit de l'ouverture d'un petit nombre de canaux TRPM8 soit de la vidange des stocks calciques réticulaires. Le calcium n'ayant pas d'action directe de type agoniste sur le canal, il servirait de co-agoniste à l'iciline pour l'activation de TRPM8 (Chuang et al., 2004).

Mais là n'est pas la seule contribution du calcium à l'activité du canal TRPM8. En effet, le calcium intracellulaire est également impliqué dans la désensibilisation du courant (activé par le menthol, le froid ou l'iciline) TRPM8 lors d'une stimulation prolongée (Chuang et al., 2004; Thut et al., 2003).

Dans la même étude, Chuang *et coll.* ont également, par comparaison entre l'orthologue murin de TRPM8 sensible à l'iciline et celui du poulet insensible à cette molécule, réussi à localiser les résidus nécessaires à l'activation de TRPM8 par l'iciline. Cette dernière se fixerait sur des résidus localisés au niveau de la boucle intracellulaire reliant les segments transmembranaires 2 et 3 (Chuang et al., 2004). De manière tout à fait intéressante, ces mêmes résidus sont impliqués dans la fixation de la capsaïcine et d'autres composés de la famille des vanilloïdes sur TRPV1 (Gavva et al., 2004; Jordt and Julius, 2002) mais aussi de la 4 α -PDD (4 α -phorbol 12,13-didecanoate) sur TRPV4 (Vriens et al., 2004). Une telle observation suggère que les canaux TRP présenteraient une organisation conservée concernant la fixation, sur ces derniers, d'agonistes chimiques.

IV. B. 2. b) Activation par le menthol

Les données obtenues par l'étude d'un large éventail de mutants TRPM8 (~14000 mutants) ont permis à l'équipe d'Ardem Patapoutian d'apporter quelques éclaircissements sur le mécanisme d'activation de TRPM8 par le menthol. Ils démontrent l'existence de trois résidus importants pour l'action du menthol sur TRPM8 : un situé au sein du segment transmembranaire S2 et deux localisés au niveau de la « TRP box » de l'extrémité carboxyterminale. La mutation du site en S2 entraîne une diminution de l'affinité du canal pour le menthol suggérant que le segment S2 intervient dans la fixation du menthol. Des mutations des deux résidus situés dans le domaine TRP ont pour effet de diminuer l'efficacité du menthol ce qui laisserait supposer que ces résidus sont impliqués dans les événements qui suivent la fixation du menthol sur le canal. Les auteurs proposent alors le mécanisme suivant : le menthol se lierait à son domaine de fixation localisé au niveau du segment S2. Suite à cette fixation, on assisterait à un changement de conformation du domaine TRP entraînant l'ouverture du canal TRPM8. Leurs résultats démontrent également que l'activation du canal TRPM8 par le menthol est un processus distinct de celui par la température et le PIP2 (Bandell et al., 2006).

Les travaux de Thomas Voets *et coll.* ont montré que le menthol, comme la température, induisait un décalage de la courbe d'activation du canal vers des potentiels plus physiologiques (figure 15). De ce fait, le canal TRPM8 en présence de menthol s'activerait au potentiel de repos des cellules (Voets et al., 2004a).

IV. B. 3. Les antagonistes

Il n'existe à l'heure actuelle aucun inhibiteur spécifique du canal TRPM8 qui permettrait d'étudier le rôle physiologique de TRPM8 dans différentes thématiques de recherches (cancer de la prostate, thermosensitivité au niveau sensoriel).

Néanmoins différentes molécules ont été identifiées comme des inhibiteurs de ce canal :

- la capsazepine, connue également pour inhiber TRPV1 mais avec plus d'affinité que pour TRPM8.
- le *N*-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1(2*H*)-carboxamide (BCTC) et son dérivé le thio-BCTC. Ils sont aussi des inhibiteurs plus affins de TRPV1.

- le 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) qui est aussi décrit comme bloquant, à forte concentration, des canaux SOCs mais encore comme activateur des canaux TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV6 (pour revue (Voets et al., 2007b)).

IV. B. 4. Régulation de TRPM8 par le pH

Les travaux de David A. Andersson *et coll.* ont mis en évidence une régulation de l'activité de TRPM8 par le pH intracellulaire. Dans leur étude, ils démontrent qu'une acidification du pH intracytoplasmique (passant de 7,3 à une valeur de 6) abolit l'activation du canal par la température, l'iciline mais pas par le menthol (Andersson et al., 2004). Cette régulation différente par le pH entre menthol d'une part et iciline/température d'autre part renforce les conclusions des autres études qui démontrent que ces trois activateurs de TRPM8 utilisent des voies d'activation différentes.

IV. B. 5. Régulation de TRPM8 par le PIP2

Les études de patch clamp effectuées en configuration cellule entière sur TRPM8 ont mis en évidence un phénomène de « run down » du courant porté par ce canal. Ce dernier correspond à une diminution de l'activité du canal dans le temps alors que la stimulation (menthol, température) est maintenue. Classiquement, ceci s'explique par la dilution de régulateurs intracytoplasmiques dans le milieu intrapipette qui est en contact direct avec le milieu intracellulaire. Dans le cas de TRPM8, ce phénomène a été expliqué : c'est la chute de la concentration intracellulaire de PIP2 qui en est à l'origine. L'entrée de calcium via les canaux TRPM8 entraîne l'activation de phospholipases C calcium-dépendantes, telles que la PLC δ 1, qui vont dégrader le pool de PIP2 intracellulaire en IP3 et DAG au niveau des canaux TRPM8. Parallèlement à cette chute de la concentration locale de PIP2, on assiste à une réduction de l'activité des canaux TRPM8 à proximité (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005).

L'étude réalisée par Tibor Rohacs *et coll.* va encore plus loin en identifiant, en tant que site d'interaction du PIP2 sur le canal TRPM8, des résidus chargés positivement localisés dans le domaine TRP de l'extrémité carboxyterminale. Des mutations de ces résidus entraînent une diminution de la sensibilité du canal pour le PIP2 et potentialisent l'effet de la déplétion en PIP2 sur l'activité de TRPM8. Les auteurs démontrent également que, si le PIP2 est nécessaire à l'activation du canal par la température et le menthol, cette classe de

phospholipides est capable à elle seule d'activer TRPM8. Enfin, les auteurs proposent que le froid et le menthol activent TRPM8 en le sensibilisant au PIP2 (Rohacs et al., 2005).

Enfin, la même équipe montre que si le calcium est indispensable à l'activation de TRPM8 par l'iciline (effet rapide), le calcium extracellulaire en entrant dans la cellule *via* TRPM8 (activé aussi bien par le menthol que par l'iciline) stimule la PLC calcium dépendante (effet lent). Cette phospholipase membranaire dégrade alors le PIP2 et entraîne ainsi une désensibilisation du canal TRPM8. Le calcium extracellulaire inhibe donc, à long terme, TRPM8 (Rohacs et al., 2005).

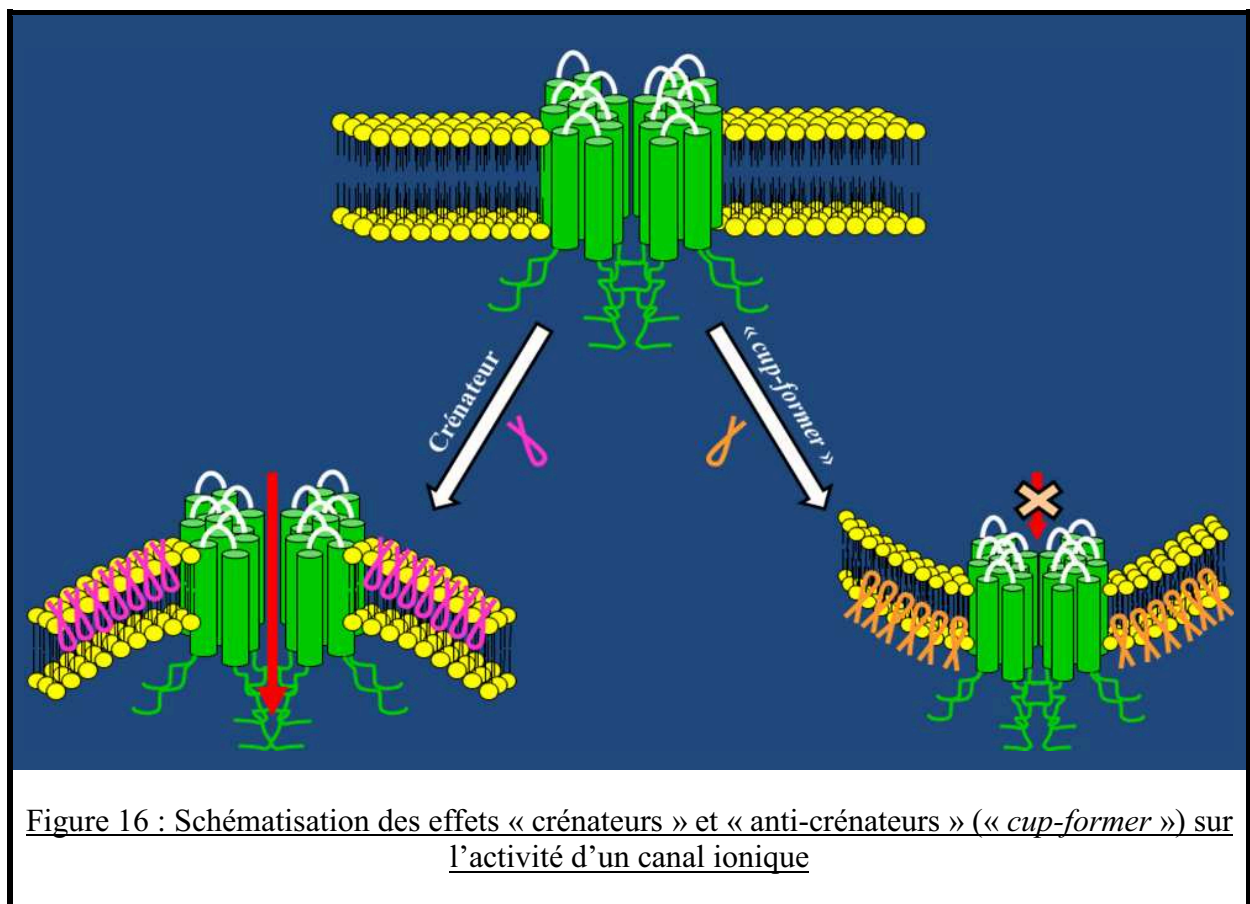
IV. B. 6. Régulation de TRPM8 par la PKC

Les résultats combinés des études de Premkumar *et coll.* et Abe *et coll.* suggèrent un mécanisme indirect de désensibilisation du canal TRPM8 par la protéine kinase calcium-dépendante (PKC) (Abe et al., 2006; Premkumar et al., 2005). En effet, de manière paradoxale, l'activation de cette kinase entraînerait une diminution de la phosphorylation de TRPM8. Cette action désensibilisatrice se ferait *via* l'activation, par la PKC, d'une phosphatase telle que la PP1 (protéine phosphatase 1) qui déphosphorylerait donc TRPM8. Les résultats de Premkumar *et coll.* démontrent que cette déphosphorylation a pour conséquence une diminution de la probabilité d'ouverture du canal TRPM8 et donc une inhibition du courant TRPM8. Il est à noter que si l'activation de la PKC désensibilise TRPM8, à l'inverse celle-ci potentialise TRPV1. Au niveau des neurones sensoriels, l'activation de la PKC a effectivement de tels effets sur les canaux TRPV1 et TRPM8. Enfin, au niveau des synapses entre les neurones sensoriels (qui expriment les canaux TRPM8 et TRPV1) et ceux de la corne dorsale, l'activation de la PKC entraîne une diminution des potentiels excitateurs post-synaptiques suite à une stimulation par le menthol des fibres sensorielles et une augmentation de ces mêmes événements post-synaptiques suite à une stimulation par la capsaïcine (agoniste de TRPV1) (Abe et al., 2006; Premkumar et al., 2005).

IV. B. 7. Régulation de TRPM8 par la iPLA2 et ses produits de dégradation

Une étude réalisée par le laboratoire a mis en évidence une voie de régulation de TRPM8 par la phospholipase A2 calcium indépendante. Tout comme le mécanisme d'activation des canaux de type SOCs décrit par Smani *et coll.* (2000), suite à la vidange des stocks calciques réticulaires, il y a activation de la iPLA2 (Smani et al., 2004). Cette phospholipase calcium

indépendante va produire, par dégradation des phospholipides membranaires, des lysophospholipides qui sont susceptibles à la fois d'activer les canaux SOCs mais aussi TRPM8. Les auteurs démontrent que les produits de dégradation des phospholipides par la iPLA2, en particulier le LysoPhosphatidyl-Inositol (LPI) et la LysoPhosphatidyl-Choline (LPC), entraînent l'activation du canal TRPM8 par stabilisation de sa conformation dans l'état « ouvert » (Vanden Abeele et al., 2006). Cette activation indirecte de TRPM8 par les lysophospholipides serait due à leur propriété « crénatrice ».



Les lysophospholipides, en s'insérant dans la bicouche lipidique, entraînerait une déformation de cette dernière (« crénation ») qui adopte alors au voisinage du canal une forme convexe favorisant l'ouverture du canal. Cet effet peut être supprimé par l'application de molécules « anti-créatrices » connues pour déformer la membrane en sens inverse (« cup-former ») telles que divers anesthésiques (chloroforme) et la chlorpromazine (Vanden Abeele et al., 2006) (figure 16). Ce mécanisme de crénation est connu pour les canaux potassiques mécanosensibles TREK et TRAAK activés par les lysophospholipides (Maingret et al., 2000).

Ce mécanisme est de première importance car si l'on connaît bien le mécanisme d'activation de TRPM8 au niveau sensoriel par la température, il en est tout autrement pour les canaux TRPM8 exprimés dans des tissus non soumis aux variations de température. La vidange des stocks calciques réticulaires étant une voie largement utilisée au niveau des cellules non excitables, ce mode d'activation de TRPM8 par la iPLA2 représente une voie physiologique de régulation de ce canal possible dans les tissus non exposés à des diminutions de température.

Les résultats d'une seconde étude menée par David A. Andersson au niveau des neurones sensoriels de DRGs de rats apportent de nouvelles informations. Leurs résultats expérimentaux suggèrent que les produits du catabolisme de la iPLA2 ont des effets opposés sur le canal TRPM8. En effet, tout comme l'étude réalisée au laboratoire, les lysophospholipides produits activent le canal mais l'acide arachidonique obtenu inhibe l'activation de celui-ci par la température, l'iciline et le menthol. Ils démontrent également que les lysophospholipides altèrent la sensibilité du canal à la température. Ces lipides déplacent la gamme de température d'activation du canal vers la température corporelle permettant ainsi au canal de s'activer. De ce fait, ils concluent que les lysophospholipides sont capables d'activer TRPM8 de manière physiologique en l'absence de variations de température (Andersson et al., 2007).

IV. B. 8. Désensibilisation de TRPM8 par l'iciline

Une récente étude a démontré qu'une stimulation prolongée d'iciline désensibilise le canal TRPM8 et empêche son activation par d'autres agonistes. Cette désensibilisation est indépendante du calcium extracellulaire et différente de celle décrite pour le menthol (Kuhn et al., 2009). En adoptant une stratégie de mutagenèse dirigée vers le site de fixation de l'iciline sur la boucle intracellulaire S2-S3, les auteurs ont démontré que cet effet inhibiteur de l'iciline est également indépendant de son site de fixation sur TRPM8 (Kuhn et al., 2009).

Conclusion :

Toutes ces données bibliographiques rassemblées ici sur TRPM8 montrent que de nombreuses équipes travaillant sur ce sujet se sont principalement intéressées à décrypter les modes d'activation de ce canal par la température et les agonistes réfrigérants que sont le menthol et l'iciline. Si des études sur l'impact du pH, du calcium, de lipides (PIP2) et de partenaires intracellulaire (PKC, iPLA2 et PLC) sur l'activité de TRPM8 ont été publiées, aucune ne s'est encore intéressée à identifier des modulateurs physiologiques de ce canal, autres que le froid. De plus, aucune voie de régulation du canal TRPM8 n'a encore été décrite. De telles investigations pourraient s'avérer très intéressantes à réaliser. En effet, comme nous allons le voir dans la dernière partie de ce chapitre, le canal TRPM8 est exprimé au niveau des neurones sensoriels où il joue pleinement son rôle de récepteur au froid, mais également au niveau prostatique, organe non soumis aux variations de température, où si son rôle reste encore inconnu, il semble néanmoins impliqué dans la cancérogenèse prostatique. L'identification de telles voies de régulations et des modulateurs physiologiques de TRPM8 pourraient permettre d'apporter des données non négligeables pour une meilleure compréhension du rôle de ce canal au niveau prostatique et apporter des pistes pour des stratégies thérapeutiques. D'un point de vue sensoriel, une meilleure compréhension des modes de régulation de ce canal s'avéreront intéressants dans le cadre d'une pathologie ayant pour symptôme une hypersensibilité douloureuse aux températures modérément basses, l'allodynie au froid.

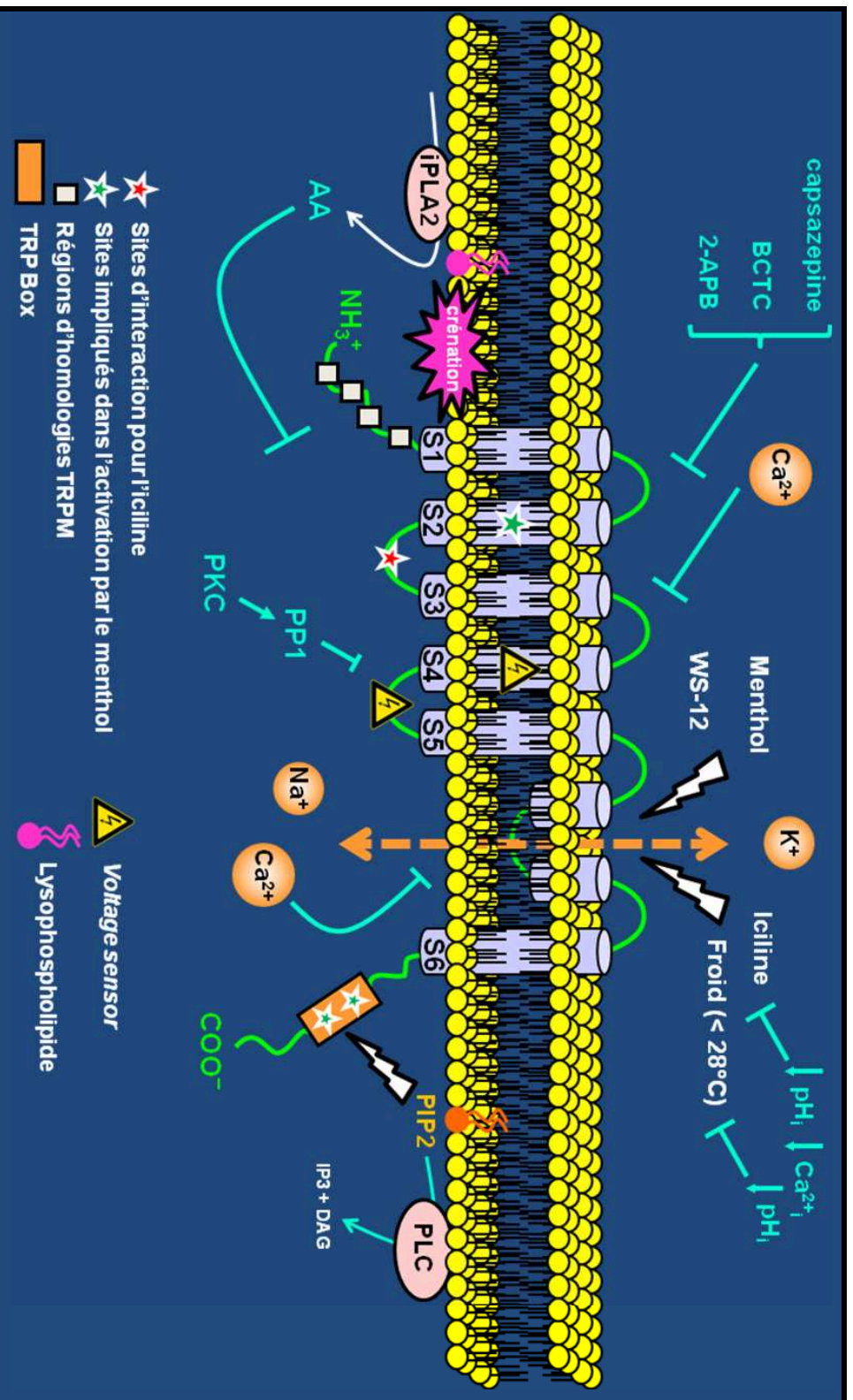


Figure 17 : Schématisation des modes d'activation et de régulation connus du récepteur au froid TRPM8 au début de la thèse.

Abréviations : AA : acide arachidonique ; PKC : protéine kinase C ; PP1 : protéine phosphatase 1 ; Pi : phosphate ; IP3 : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; BCTC : *N*-(4-tertiarybutylphényl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2*H*)-carboxamide ; 2-APB : 2-aminoéthoxydiphényl borate ; PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PLC : phospholipase C ; WS-12 : 2-isopropyl-5-méthyl-cyclohexanecarboxylic acid (4-méthoxy-phényl)-amide ; iPLA2 : phospholipase A2 calcium indépendante.

IV. C. Distribution tissulaire de TRPM8 et implications dans la physiopathologie

IV. C. 1. Profil d'expression de TRPM8

Le canal TRPM8 a tout d'abord été détecté au niveau des cellules épithéliales prostatiques saines (expression faible) et cancéreuses (surexpression) (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003; Tsavaler et al., 2001). Il est retrouvé également au niveau périphérique dans des tumeurs primaires du sein, du colon (adénocarcinome colorectal), de la peau (mélanome) et du poumon (Tsavaler et al., 2001). En condition saine, son expression est indétectable dans ces tissus. Les avancées des recherches sur ce canal ont permis de mettre en évidence la présence dans certains tissus d'isoformes plus petites du canal TRPM8. Il convient donc à chaque fois de préciser si le canal TRPM8 détecté dans un tissu est bien le canal entier (« *full length* »), classique ou l'une des isoformes. Par exemple, au niveau du poumon, ce n'est pas la forme normale, entière, du canal qui est retrouvée mais une isoforme tronquée. Au niveau de l'épithélium bronchique, cette isoforme de TRPM8 tronquée reste enchâssée dans la membrane du réticulum (Sabnis et al., 2008). Ce canal est également présent dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et aortiques (Yang et al., 2006). Il est localisé dans les myocytes cardiaques aussi bien au niveau de la membrane plasmique que réticulaire et semble être impliqué dans la régulation du tonus vasculaire (Johnson et al., 2009). Les données portant sur l'expression de TRPM8 dans les testicules se limitent à quelques résultats de PCR ou d'immunohistochimie (Stein et al., 2004; Tsavaler et al., 2001). Ni la fonctionnalité de TRPM8 dans ces cellules ni son rôle n'ont été démontrés pour le moment. Il a été mis en évidence récemment la présence de ce canal dans le sperme (De Blas et al., 2009). Enfin, l'expression de TRPM8 dans la vessie a été démontrée par immunohistochimie dans les fibres afférentes C et A δ innervant la vessie ainsi que dans l'urothélium (Mukerji et al., 2006; Stein et al., 2004; Tsukimi et al., 2005).

Au cours de la thèse nous nous sommes principalement intéressés à la forme normale, entière, de TRPM8 exprimée dans deux principaux tissus : les neurones sensoriels et la prostate.

IV. C. 2. TRPM8 au niveau sensoriel

IV. C. 2. a) Localisation

Le canal TRPM8, au niveau sensoriel, est exprimé dans les fibres afférentes A δ et C des ganglions rachidiens dorsaux (innervant la peau) ainsi que dans les neurones linguaux

sensitifs de petits diamètres issus des ganglions trigéminaux qui innervent la langue (Abe et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Il y joue pleinement son rôle de récepteur au froid et aux substances au pouvoir réfrigérant (menthol). Lors d'une diminution de température (avec un seuil d'activation de 28-30°C), d'applications cutanées de menthol ou d'ingestion d'aliments froids ou contenant du menthol, l'activation de ces canaux TRPM8 au niveau des terminaisons nerveuses libres entraîne une entrée de calcium engendrant une dépolarisation de la membrane de ces cellules. Si la dépolarisation dépasse le seuil d'activation des canaux sodiques voltage-dépendants, on assiste alors à la génération de trains de potentiels d'actions conduisant le message nerveux sensoriel en direction du système nerveux central (de la Pena et al., 2005).

Plusieurs équipes se sont intéressées à déterminer le profil d'expression de TRPM8 dans les différents types de neurones issus des deux structures que sont les ganglions rachidiens dorsaux et trigéminaux.

IV. C. 2. a) i. Au niveau trigeminal

TRPM8 présente un taux d'expression plus important dans les neurones issus du ganglion trigéminal que dans ceux issus des DRG (Kobayashi et al., 2005).

Au niveau trigéminal, les travaux de Nealan *et coll.* (Nealen et al., 2003) démontrent qu'il existe deux types de neurones :

- des neurones avec une sensibilité au froid à bas seuil, c'est-à-dire que l'on enregistre une réponse calcique au niveau du cytoplasme de ces neurones dès 29°C. Au sein de cette population, 44% des neurones expriment TRPM8.
- des neurones avec une sensibilité au froid à haut seuil, nécessitant une forte diminution de température (à partir de ~20°C) pour obtenir une réponse calcique qui, dans cette sous population, présente une cinétique lente.

Une étude réalisée par Junji Abe *et coll.* vient ajouter de nouvelles données concernant l'expression de TRPM8 dans les fibres nerveuses issues du ganglion trigéminal. En effet, les auteurs montrent que ce canal est principalement retrouvé au niveau du nerf lingual qui innerve les papilles gustatives de la langue. De plus, ils démontrent à ce niveau une coexpression des canaux TRPM8 et TRPV1 dans certains de ces neurones (Abe et al., 2005).

IV. C. 2. a) ii. Au niveau des DRG

Alexandru Babes *et coll.* décrivent au sein des neurones sensitifs issus des ganglions rachidiens dorsaux trois populations suivant leur sensibilité au menthol et aux températures basses :

- Des neurones sensibles au menthol qui sont également activés pour de faibles diminutions de température (non douloureuses). Cette sensibilité à la température est augmentée par le *nerve growth factor* (NGF) (Babes et al., 2004).
- Des neurones insensibles au menthol mais réceptifs uniquement à de fortes diminutions de température, douloureuses. Ces derniers ne voient pas leur sensibilité modifiée par un traitement au NGF (Babes et al., 2004).

La fraction de neurones sensibles au menthol représente environ 10% des neurones issus des DRG (Madrid et al., 2006).

- Une troisième population de neurones, minoritaire (4,3% des neurones issus du DRG), répondant à des températures basses mais ne possédant aucun des récepteurs au froid que sont TRPM8 et TRPA1 (Babes et al., 2006).

Les investigations de Kimiko Kobayashi *et coll.* apportent à cette étude d'intéressants compléments. Par une approche d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, les auteurs observent que le canal TRPM8 est présent à la fois dans les fibres nerveuses de type A δ (particulièrement dans les neurones de petits diamètres) et de type C. A l'inverse des résultats de Babes *et coll.* dans leur article de 2004, ils ne détectent pas de colocalisation entre TRPM8 et TRPV1 malgré que ce dernier soit retrouvé dans les fibres de type C. Mais TRPA1 est quant à lui colocalisé avec TRPV1 (Kobayashi et al., 2005).

Une dernière étude observe une colocalisation de TRPM8 avec TRPV1 dans une sous-population de neurones sensibles au menthol. Elle propose l'existence de deux sous-populations de neurones sensibles au menthol : des neurones sensibles au menthol / capsaïcine insensibles (neurones non nociceptifs) et des neurones menthol / capsaïcine sensibles (neurones nociceptifs). De basses concentrations entraînent le recrutement préférentiel des neurones non nociceptifs menthol sensibles / capsaïcine insensibles alors que de hautes concentrations engendrent un recrutement plus large des neurones non nociceptifs et nociceptifs, menthol sensibles / capsaïcine sensibles. Ce résultat est en accord avec les observations que l'application de faibles concentrations de menthol produit une sensation de froid alors que de hautes concentrations induisent une sensation douloureuse de brûlure (Cliff and Green, 1994; Eccles, 1992; Green, 1992; Wasner et al., 2004).

IV. C. 2. b) Souris KO TRPM8 : preuve de l'implication du canal dans la sensation de froid

Alors que de nombreux travaux démontrent *in vitro* la sensibilité du canal TRPM8 aux diminutions de température ainsi qu'aux substances chimiques imitant ce paramètre physique, la validation du rôle de TRPM8 dans la détection et la transduction de la sensibilité au froid *in vivo* a été apportée par la création et l'étude de souris transgéniques déficientes pour le gène *trpm8* par trois équipes indépendantes (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Ces trois équipes s'intéressaient à la même question : du fait que la gamme de températures auxquelles TRPM8 est sensible s'étend des températures non douloureuses (<30°C) à celles engendrant une sensation de douleur (<15°C), TRPM8 est-il impliqué dans la transduction des messages nerveux non douloureux, douloureux ou des deux ?

Pour répondre à cette question, ces trois groupes ont réalisé des tests de préférence entre une plaque réglée pour des températures chaudes (30-38°C) et une réglée pour des températures froides. Alors que les souris sauvages préfèrent la plaque « chaude », les souris KO pour TRPM8 ne présentent aucune préférence entre les deux plaques. Si les trois études sont en accord sur cette observation, il en va autrement pour les températures très basses. En effet, Bautista *et coll.* reportent un retour de l'aversion pour les températures froides à partir de 10°C alors que pour Colburn *et coll.* les souris KO TRPM8 n'ont toujours pas de comportement de préférence de plaques lorsque la plaque « froide » est à 5°C. De plus, Colburn *et coll.* observent également que la latence d'échappement de ces souris sur une plaque à 0°C est augmentée chez les KO par rapport aux sauvages, démontrant bien pour leur lignée une totale disparition de la sensibilité au froid aussi bien pour des températures douloureuses que non douloureuses. Dans les mêmes conditions, Dhaka *et coll.* ainsi que Bautista *et coll.* n'observent aucune différence pour ce temps de latence entre les souris sauvages et les souris KO, ces dernières ayant bien un regain de sensibilité pour des températures extrêmement basses, douloureuses. Malgré ces différences d'observations pour les températures extrêmes, les trois groupes sont en accord pour conclure que le canal TRPM8 est bien, *in vivo*, la base moléculaire de la perception des diminutions de température et de la transduction du message « froid » vers le système nerveux central. Ce canal serait un acteur majeur de la détection des températures modérément basses mais peut être, pour Colburn *et coll.*, également des températures extrêmes et douloureuses.

IV. C. 2. c) Rôle de TRPM8 dans la nociception

TRPM8 semble être impliqué dans un phénomène douloureux important en clinique à savoir l'allodynie au froid (*cold allodynia*). Dans cette partie vont être synthétisées les données de la littérature concernant l'implication de TRPM8 dans cette pathologie et les voies analgésiques proposées impliquant ce canal.

IV. C. 2. c) i. Implication de TRPM8 dans l'allodynie au froid

L'allodynie correspond à une sensation douloureuse intense suite à une excitation par un stimulus normalement non nociceptif. Ce phénomène peut être induit soit de manière physique par la lésion de nerfs sensitifs, soit de manière chimique en utilisant le menthol et l'oxaliplatine.

Allodynie chimiquement induite

L'application cutanée de menthol entraîne une allodynie au froid par sensibilisation des fibres nerveuses nociceptives de type C qui, comme il l'a été décrit précédemment, expriment TRPM8 (Wasner et al., 2008; Wasner et al., 2004). Un tel effet est également observé par application d'oxaliplatine. Cette molécule est connue depuis longtemps pour ses effets sensoriels neurotoxiques aggravés par l'exposition au froid. Des injections d'oxaliplatine chez des souris entraînent une allodynie au froid trois jours après administration et qui se prolonge. Cette allodynie peut être reversée par la capsazepine, un inhibiteur de TRPM8 et TRPV1, mais pas par la 5'-iodoresiniferatoxin (I-RTX), un inhibiteur du canal TRPV1 (Gauchan et al., 2009). Dans les expériences de Colburn *et coll.*, des injections d'iciline entraînent, chez les souris sauvages, des mouvements similaires à un chien qui s'ébroue (« *wet-dog shake* ») et des sauts absents chez les souris KO, prouvant l'implication de TRPM8 dans ces comportements (Colburn et al., 2007). Des injections d'oxaliplatine, en plus de celles d'iciline, accentuent ces comportements démontrant bien que l'oxaliplatine voit ses effets médiés par TRPM8. L'oxaliplatine augmente l'expression de TRPM8 dans les neurones sensoriels des ganglions rachidiens dorsaux trois jours après injection pour ensuite diminuer avec le temps (Gauchan et al., 2009). Les auteurs en déduisent que l'allodynie au froid induite par l'oxaliplatine est en partie due à la surexpression de TRPM8 dans les fibres nerveuses sensitives afférentes. Cette étude fait de TRPM8 une cible intéressante pour annihiler l'effet douloureux neurotoxique qu'est l'allodynie au froid de traitements à l'oxaliplatine.

Allodynie au froid induite par des lésions/constrictions de fibres nerveuses sensibles

Plusieurs groupes utilisent le modèle de douleur neuropathique dénommé en anglais CCI pour « *chronic constrictive nerve injury* » afin d'étudier l'allodynie au froid. L'hypersensibilité aux basses températures est induite par la ligature du nerf sciatique, prolongement à destination de la périphérie des nerfs sensitifs nociceptifs des ganglions rachidiens dorsaux. Suite à la ligature, on assiste à une augmentation de l'expression de TRPM8 dans les neurones sensitifs des ganglions rachidiens dorsaux (Frederick et al., 2007; Proudfoot et al., 2006; Xing et al., 2007) suggérant donc que l'hypersensibilité des patients présentant une allodynie au froid serait due à la surexpression de TRPM8 (Frederick et al., 2007; Xing et al., 2007). La ligature du nerf sciatique a été également réalisée par l'équipe de Colburn chez les souris sauvages et KO TRPM8 (Colburn et al., 2007). Ces derniers ont utilisé l'application cutanée d'acétone pour mesurer la sensibilité au froid des souris CCI (ce test ayant été établi par (Choi et al., 1994)). Avant ligature, l'application d'acétone sur la face plantaire d'une patte de souris entraîne rapidement un retrait de cette patte accompagné de léchage ou de soubresauts chez l'animal. Aucune réaction n'est constaté chez les animaux TRPM8^{-/-}. Après ligature, ces comportements sont accrus chez les souris sauvages lors de l'application d'acétone et toujours absents chez les TRPM8^{-/-} montrant bien que le récepteur au froid TRPM8 est fortement impliqué dans l'allodynie au froid dans ce modèle de CCI.

Si les différents travaux réalisés sur cette thématique s'accordent sur ce point, les mécanismes analgésiques proposés par ces études diffèrent. Les articles publiés par Hong Xing *et coll.* et Clare J. Proudfoot *et coll.* sont un exemple de cette différence (Proudfoot et al., 2006; Xing et al., 2007).

IV. C. 2. c) ii. TRPM8 : allodynie ou analgésie ?

La première équipe observe que la capsazepine, un inhibiteur de TRPM8 et TRPV1, atténue les symptômes d'allodynie au froid chez les animaux CCI, alors que la I-RTX, un inhibiteur de TRPV1, n'a pas d'effet (tout comme le feront plus tard Gauchan *et coll.* pour l'allodynie induite chimiquement (Gauchan et al., 2009)). L'allodynie au froid est donc bien due dans le modèle de CCI au canal thermorécepteur aux basses températures TRPM8 (Xing et al., 2007), ce qui est en adéquation avec les résultats de Colburn *et coll.* sur leur modèle de souris TRPM8^{-/-} (Colburn et al., 2007). Les auteurs observent après ligature une hypersensibilité au froid suite à une augmentation du nombre de neurones exprimant TRPM8. Parmi ces

neurones menthol et température sensitifs nouvellement apparus, la plupart s'avèrent être également sensibles à la capsaïcine. Les auteurs ont décrit dans une précédente étude que ces neurones menthol-/froid-/capsaïcine-sensitifs sont impliqués dans la nociception (Xing et al., 2006). Le gain de sensibilité au froid après CCI est donc du à l'apparition de ce type de neurones nociceptifs. Enfin, ils observent que ces neurones se projettent au niveau de la peau et présentent une sensibilité accrue au menthol et au froid. Cette surexpression de TRPM8 et cette augmentation de sensibilité concourent à conférer une hypersensibilité aux basses températures, et donc à provoquer une allodynie au froid chez les animaux après CCI (Xing et al., 2007). De ce fait, l'inhibition de TRPM8 pourrait apporter une solution analgésique à l'allodynie au froid. A l'inverse Clare J. Proudfoot *et coll.* observent que l'application cutanée (ou l'injection intrathécale) de faibles doses d'iciline ou de menthol, ou l'exposition à des températures modérément froides produisent un effet analgésique chez les animaux CCI (Proudfoot et al., 2006). Ils reportent comme l'étude précédente (Xing et al., 2007) une surexpression de TRPM8 après ligature du nerf sciatique. TRPM8 lui même participerait à l'analgésie par un mécanisme de rétrocontrôle glutaminergique des neurones thermosensibles sur les neurones nociceptifs.

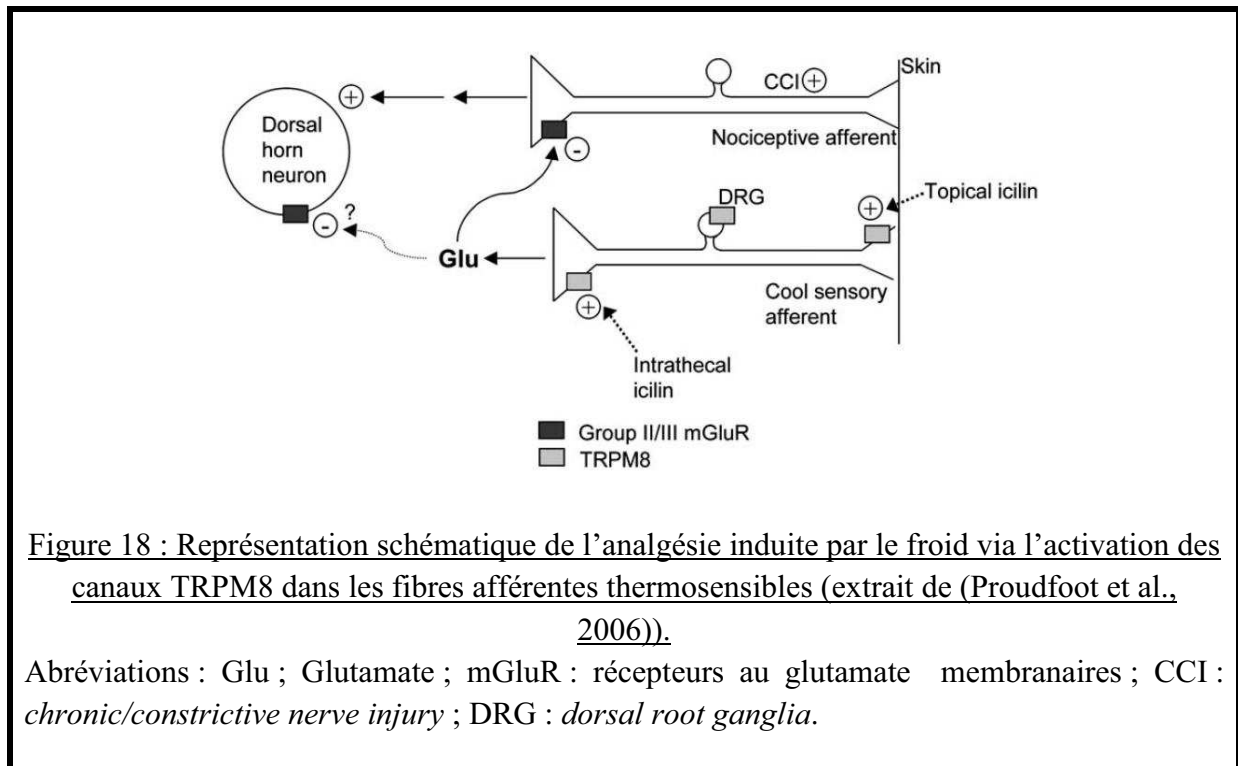


Figure 18 : Représentation schématique de l'analgésie induite par le froid via l'activation des canaux TRPM8 dans les fibres afférentes thermosensibles (extrait de (Proudfoot et al., 2006)).

Abréviations : Glu ; Glutamate ; mGluR : récepteurs au glutamate membranaires ; CCI : *chronic/constrictive nerve injury* ; DRG : *dorsal root ganglia*.

Comme décrit sur la figure 18, l'activation des canaux TRPM8 des neurones thermosensibles afférents par application de menthol, d'iciline ou de températures modérément froides entraînerait au niveau central la libération de glutamate. Les récepteurs au glutamate mGluR

des groupes II et III sont situés au niveau présynaptique sur les neurones nociceptifs activés lors de la CCI mais également au niveau postsynaptique sur les neurones de la corne dorsale de la moelle épinière (neurones de relais de la sensibilité extéroceptive). Le glutamate, par interaction avec ses récepteurs mGluR, va entraîner une inhibition de ces structures et ainsi permettre d'atténuer la sensibilité nociceptive. Les auteurs proposent alors TRPM8 comme principal acteur de l'analgésie dans les cas de CCI (Proudfoot et al., 2006). Cette analgésie due à TRPM8 a également été observée chez des patients présentant une allodynie au froid. Six patients sur huit, après application cutanée de menthol, au lieu de présenter une hyperalgésie au froid, montraient des signes d'analgésie (Wasner et al., 2008).

Conclusion :

Si le rôle de TRPM8 en tant que récepteur au froid au niveau des neurones sensoriels des ganglions trigéminaux et rachidiens dorsaux est bien connu, son rôle dans la nociception reste encore sujet à débats. Ce canal est un acteur majeur lors de l'allodynie au froid mais les différentes études concernant ce sujet lui confèrent un rôle analgésique ou hyperalgésique. Il reste néanmoins une cible thérapeutique de premier ordre pour la lutte contre l'allodynie au froid. L'identification de voies de régulation de ce canal ainsi que de modulateurs physiologiques au niveau sensoriel ouvrirait la porte à de nouvelles stratégies de lutte contre les symptômes douloureux de l'allodynie au froid consécutivement à des lésions de nerfs périphériques ou à des traitements avec des molécules connues pour induire ce type de manifestations telles que l'oxaliplatine.

IV. C. 3. TRPM8 et la prostate

Outre son expression au niveau sensoriel, où son rôle de récepteur au froid est bien identifié, le canal TRPM8 est exprimé de manière physiologique au niveau des cellules épithéliales prostatiques. Plusieurs études démontrent l'importance de ce canal dans le cancer de la prostate. La prostate n'étant pas un organe soumis à des variations de température, la découverte intrigante de TRPM8 à ce niveau a ouvert un nouveau champ d'investigations dans le cancer de la prostate.

IV. C. 3. a) La prostate : définition et localisation

La prostate est localisée en avant du rectum et juste sous la vessie, c'est un organe exocrine appartenant à l'appareil génital masculin. Située au carrefour des voies urinaire et génitale,

elle entoure le canal éjaculateur et l'urètre. La prostate intervient dans le processus éjaculatoire en sécrétant environ 30% du liquide séminal responsable de l'activation et de la protection des spermatozoïdes. La prostate participe également au processus mictionnel.

La prostate est le siège de différentes pathologies dont les plus fréquentes sont les prostatites (inflammations d'origine bactérienne), les adénomes (hyperplasies bénignes des épithélia) et les adénocarcinomes (cancers de l'épithélium).

Cette glande est innervée par le système nerveux autonome sympathique, représenté par les récepteurs aux catécholamines (noradrénaline), et parasympathique, représenté par les récepteurs cholinergiques (acétylcholine). Les récepteurs alpha-adrénergiques ainsi que les récepteurs muscariniques représentent les principaux sous-types de récepteurs respectivement catécholaminergiques et cholinergiques (Caulfield et al., 1993; Pennefather et al., 2000; Ruggieri et al., 1995).

IV. C. 3. b) Le cancer de la prostate

Avec plus de 26 000 cas déclarés et environ 10 000 décès par an en France, le cancer de la prostate représente la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme. Cette pathologie a la particularité de voir son incidence croître avec l'âge dans les pays développés. Ainsi, le nombre de cas total augmente parallèlement avec l'espérance de vie.

Le carcinome prostatique se caractérise par une prolifération lente et reste localisé dans les premiers stades de la maladie. Ces cancers se développent principalement dans la zone périphérique de la prostate (80%), 15% apparaissent dans la zone transitionnelle et 5% dans la zone centrale. Au cours de la tumorigenèse, les cellules tumorales peuvent s'étendre en dehors de la prostate par envahissement des tissus et organes proches de la prostate ou par envahissement d'organes à distance (os, ganglions, etc...) formant ainsi des métastases. On parle alors de cancer non localisé de la prostate.

Tout comme pour la prostate saine, la croissance et le développement du cancer de la prostate sont sous le contrôle des androgènes (et plus précisément de la dihydrotestostérone). De ce fait, le cancer de la prostate est un cancer hormono-dépendant.

IV. C. 3. c) Les androgènes

Découvertes en 1936, ce sont des hormones de type stéroïdien, c'est-à-dire qui dérivent du cholestérol, qui interviennent dans la régulation de nombreux aspects du développement masculin. Les androgènes, testostérone et dihydrotestostérone, participent notamment dans le développement des organes sexuels, dans l'acquisition et le maintien des caractères sexuels

secondaires (pilosité, la mue par l'élargissement des cordes vocales) et la croissance de la prostate.

La testostérone qui est le principale androgène circulant est produite quasi-exclusivement (pour plus de 95 %, le reste étant du à la cortico-surrénale et pour une part infinitésimale au cerveau) par les cellules interstitielles de Leydig des testicules. Ces cellules endocrines forment le tissu interstitiel qui entoure les tubes séminifères et qui est parcouru d'artérioles et de veinules. Elles sécrètent 5 à 7,5 mg de testostérone par jour chez un individu mâle adulte (Vierhapper et al., 2000). L'orchidectomie, c'est-à-dire l'ablation des testicules, va entraîner un arrêt quasi-total de la production des androgènes circulants.

IV. C. 3. c) i. Biosynthèse

Le cholestérol est donc le précurseur des androgènes. Les cellules de Leydig peuvent en assurer la synthèse à partir de l'acétate, mais elles utilisent surtout le cholestérol extrait des lipoprotéines plasmatiques (LDL) ou des membranes cellulaires. La figure 19 illustre les étapes de la biosynthèse des androgènes au sein de ces cellules testiculaires. L'hormone lutéinisante LH (*Luteinizing Hormone*), produite par les cellules gonadotropes du lobe antérieur de l'hypophyse, en se fixant sur son récepteur membranaire (LH-R) stimule la production de cAMP et, de ce fait, l'activité de la PKA. Cette kinase intracellulaire va à son tour induire le transport de cholestérol du pool cytoplasmique où il s'accumule (gouttes lipidiques) vers la mitochondrie. Le passage de la membrane externe vers la membrane interne de la mitochondrie est assuré par la protéine activatrice de la stéroïdogénèse ou stAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*) et la protéine PBR (*peripheral benzodiazepine receptor*). Cette étape est l'étape limitante de cette biosynthèse. Au niveau de la membrane interne de la mitochondrie se trouve la cytochrome P450 qui convertit le cholestérol en prégnénolone. Ce précurseur stéroïdien sera à son tour transféré dans le réticulum endoplasmique lisse où se réalise la production de testostérone.

La synthèse de testostérone peut alors se faire à partir de deux voies : soit à partir de la prégnénolone (prégnénolone → DHEA → androstènedione → testostérone) qui est la voie majoritaire soit à partir de la progestérone (prégnénolone → progestérone → androstènedione → testostérone) (pour revue (Haider, 2004)).

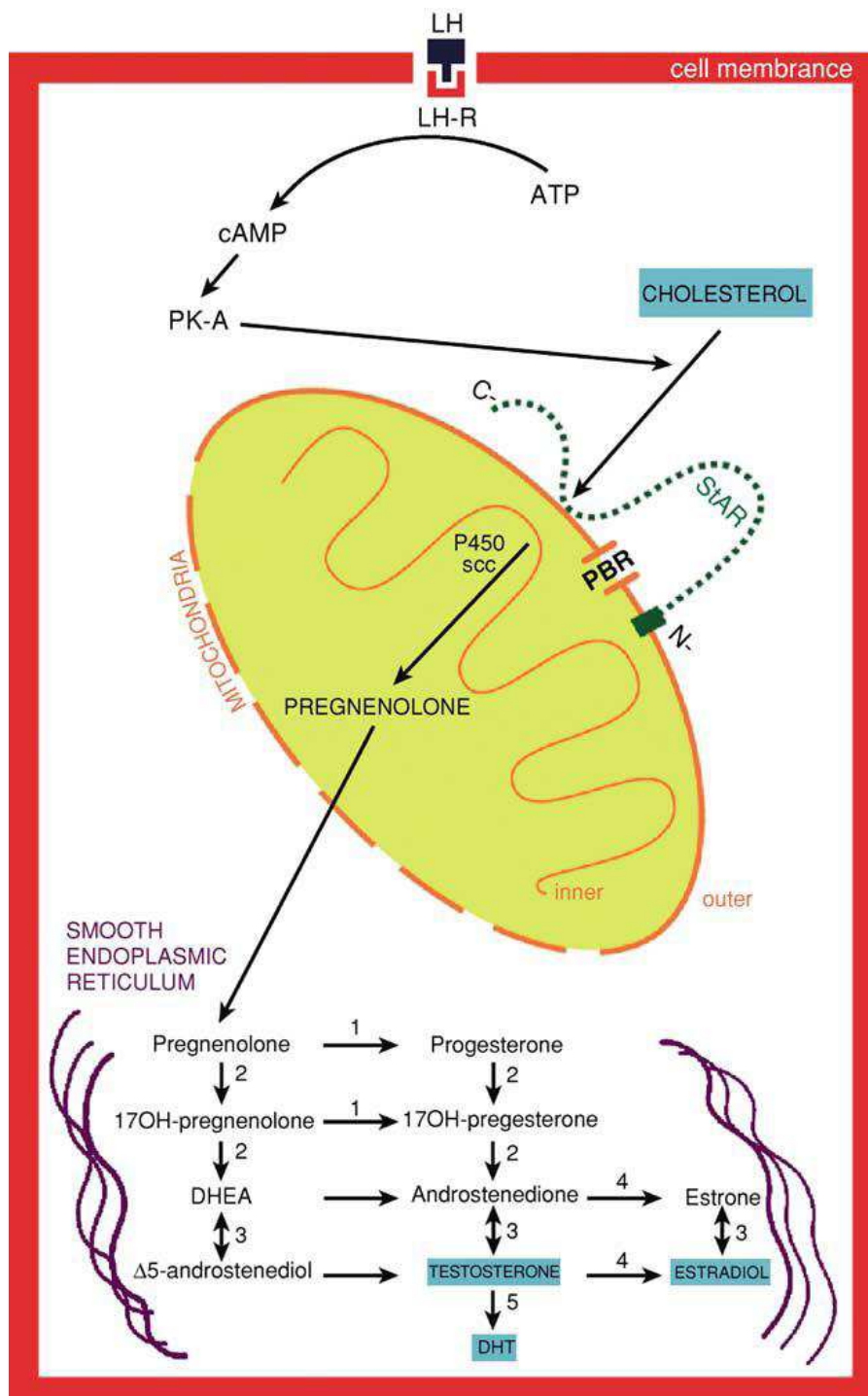


Figure 19 : Principales étapes de la stéroïdogénèse au sein de la cellules interstitielle de Leydig des testicules (d'après Syed G. Haider).

Abréviations : DHEA : Dihydroépiandrostérone ; DHT : dihydrotestostérone ; LH : *Luteinizing Hormone* ; LH-R : récepteur membranaire à la LH. Réaction 1 : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; réaction 2 : cytochrome P450 17α-hydroxylase ; réaction 3 : 17β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; réaction 4 : cytochrome P450 aromatase ; reaction 5 : 5α-réductase.

IV. C. 3. c) ii. Transport des androgènes dans le compartiment plasmatique

De part leur caractère hydrophobe, les hormones stéroïdes comme la testostérone diffusent librement au travers de la membrane plasmique des cellules interstitielles de Leydig. La circulation de la testostérone dans le compartiment plasmatique se fait sous trois formes : 2% sous forme libre, seule forme utilisable directement par les tissus, 45 à 75% sont liés à la SHBG (*Sex Hormone Binding Globulin*), la protéine de transport des stéroïdes sexuels, et 30 à 55% sous forme liée à l'albumine (Dunn et al., 1981; Rosner, 1990; Rosner, 1991).

IV. C. 3. c) iii. Métabolisme de la testostérone

La testostérone libre peut diffuser au travers de la membrane plasmique et agir directement sur le récepteur aux androgènes (RA). Elle peut aussi être assimilée à une pro-hormone en agissant de manière indirecte par le biais de métabolites actifs qui augmentent et diversifient ses effets biologiques. Elle joue alors le rôle de pro-hormone et doit être métabolisée en un androgène plus puissant, la dihydrotestostérone (DHT) qui activera le RA.

Cette transformation de la testostérone en DHT se fait par les enzymes 5 α -réductase 1 et 2. Le type 2 prédomine au niveau des organes génitaux, la prostate en particulier. Le type 1 est présent dans la peau avec une activité enzymatique variable suivant la zone considérée. La testostérone peut également être transformée pour être éliminée. La stabilité du taux de testostérone dépend donc de l'équilibre entre les systèmes de synthèse, de transformation et de dégradation (Mowszowicz et al., 1995).

IV. C. 3. c) iv. Catabolisme des androgènes

La majorité des réactions cataboliques se font dans le foie, mais aussi dans la peau et la prostate, pour aboutir à une élimination dans l'urine ou par la peau. La testostérone elle-même induit les enzymes hépatiques responsables de son propre catabolisme. Elle est convertie en androgènes faibles et inactifs : la DHEA, l'androstérone et l'étiocolanolone éliminés dans l'urine et la bile, les deux derniers étant les métabolites urinaires les plus abondants. La DHT peut être transformée en androstènediol, à la fois forme de stockage, car la conversion est réversible, et forme d'élimination stéroïdienne. Cet ensemble métabolique est très actif puisque la demi-vie de la testostérone est de 12 minutes, ce qui implique une fabrication permanente par le testicule (pour revue (Tostain et al., 2004)).

IV. C. 3. d) Les besoins cliniques

IV. C. 3. d) i. Recherche de nouveaux traitements

La découverte de l'androgéno-dépendance de ce cancer est à la base des premiers traitements dits anti-androgéniques par castration chimique et/ou chirurgicale.

Dans un premier temps, ces traitements visant à diminuer les concentrations sériques d'androgènes permettent de ralentir la progression tumorale. Cette thérapie anti-androgénique aboutit dans la plupart des cas à un échappement thérapeutique dû à l'évolution des cellules tumorales d'un phénotype androgéno-dépendant vers un phénotype androgéno-indépendant. A partir de ces cellules tumorales se développe une tumeur résistante à la privation hormonale et à la chimiothérapie.

La découverte des mécanismes à l'origine de l'acquisition d'un phénotype androgéno-indépendant permettrait de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

IV. C. 3. d) ii. Recherche de nouveaux marqueurs diagnostiques

Afin de diagnostiquer ce cancer, plusieurs marqueurs existent : la PSA (*prostate-specific antigen*), la PAP (*prostate acid phosphatase*), la PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) et la hK2 (*human kallikrein*). Mais ces marqueurs comportent certaines limites. Par exemple, la PSA qui est spécifiquement sécrétée par les cellules épithéliales prostatiques est le marqueur sérique le plus utilisé pour diagnostiquer le cancer de la prostate. Malheureusement, il ne permet pas de différencier le carcinome de l'hyperplasie prostatique bénigne dans une gamme de concentration de 4 à 10 ng/ml, ce qui est couramment le cas.

Pour ces raisons, les cliniciens sont toujours à la recherche de nouveaux marqueurs diagnostiques plus spécifiques et fiables dans le but de découvrir les tumeurs à un stade encore curable.

IV. C. 3. e) Découverte d'un nouveau marqueur prostatique : TRPM8

Dans cette recherche de nouveaux outils diagnostiques, les travaux menés par Henshall *et coll.* (2003), Tsavaler *et coll.* (2001) et Fuessel *et coll.* (2003) proposent un nouveau marqueur diagnostique du cancer de la prostate : *trpm8* (Fuessel *et al.*, 2003; Henshall *et al.*, 2003; Tsavaler *et al.*, 2001).

Le premier article traitant du gène *trpm8* (précédemment appelé *trp-p8*) reportait le clonage de ce gène par une analyse soustractive d'ADNc issu de lots de prostates saines et de lots de prostates cancéreuses (Tsavaler *et al.*, 2001). Dans cette même étude, les auteurs démontrèrent

l'expression de TRPM8 dans la prostate, les testicules, et faiblement dans le sein. Sa surexpression en cas de cancer a été détectée dans la prostate, le sein, le poumon, le mélanome et l'adénocarcinome colorectal (Tsavaler et al., 2001). D'autres études utilisant d'autres techniques ont confirmé la surexpression de TRPM8 dans le cancer de la prostate intracapsulaire (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003; Schmidt et al., 2006). En outre, Henshall *et coll* ont mis en évidence l'androgéno-dépendance de TRPM8, ce qui a été confirmé par Zhang *et coll* (Henshall et al., 2003; Zhang and Barritt, 2004).

Les travaux de Kiessling *et coll* (2003) ont mis en évidence le fait que ce gène *trpm8* voit son taux d'expression varier en fonction des grades cancéreux. Dans la prostate saine, on détecte un niveau d'expression faible (Kiessling et al., 2003). Dans les cancers prostatiques androgéno-dépendants l'expression de *trpm8* augmente fortement (Tsavaler et al., 2001) tandis que dans les cancers avancés, androgéno-indépendants, son expression disparaît (Fuessel et al., 2003; Kiessling et al., 2003). De ce fait, le canal TRPM8 pourrait être impliqué directement dans la cancérisation des cellules prostatiques. Au vu de ces résultats, les auteurs proposent TRPM8 comme nouveau marqueur pronostique du cancer de la prostate.

Henshall *et coll* ont démontré que la diminution d'expression de TRPM8 était associée à un mauvais pronostic lors de la rechute d'un cancer de la prostate (Henshall et al., 2003). Enfin notre laboratoire a également montré que le gène *trpm8* est régulé par le récepteur aux androgènes dans les cellules épithéliales de prostate humaine (Bidaux et al., 2005).

Cette transcription de TRPM8 régulée par les androgènes fait de cette protéine une sérieuse candidate comme nouveau facteur pronostique du cancer de la prostate puisque l'absence d'expression de cette protéine signerait la présence d'un cancer androgéno-indépendant pour lequel aucun traitement n'existe.

IV. C. 3. f) Localisation subcellulaire de TRPM8 en fonction des stades de cancer

Les travaux de McKemy et Peier (2002) sont à l'origine de la découverte du canal TRPM8 en tant que récepteur au froid dans les neurones sensoriels (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Leurs résultats de caractérisation fonctionnelle de cette protéine démontrent que TRPM8 est un canal cationique localisé au niveau de la membrane plasmique de ces neurones sensoriels. Au niveau prostatique, les premiers travaux réalisés par le laboratoire ont démontré que, à la différence des neurones sensoriels, le canal TRPM8 était enchâssé dans la membrane du réticulum endoplasmique au sein des cellules de la lignée épithéliale prostatique humaine

androgéno-dépendante LNCaP (*lymph node carcinoma of the prostate*) (Thebault et al., 2005). Au sein de ces cellules, la stimulation du canal TRPM8 entraîne la vidange des stocks calciques réticulaires et l'activation des canaux SOCs de la membrane plasmique.

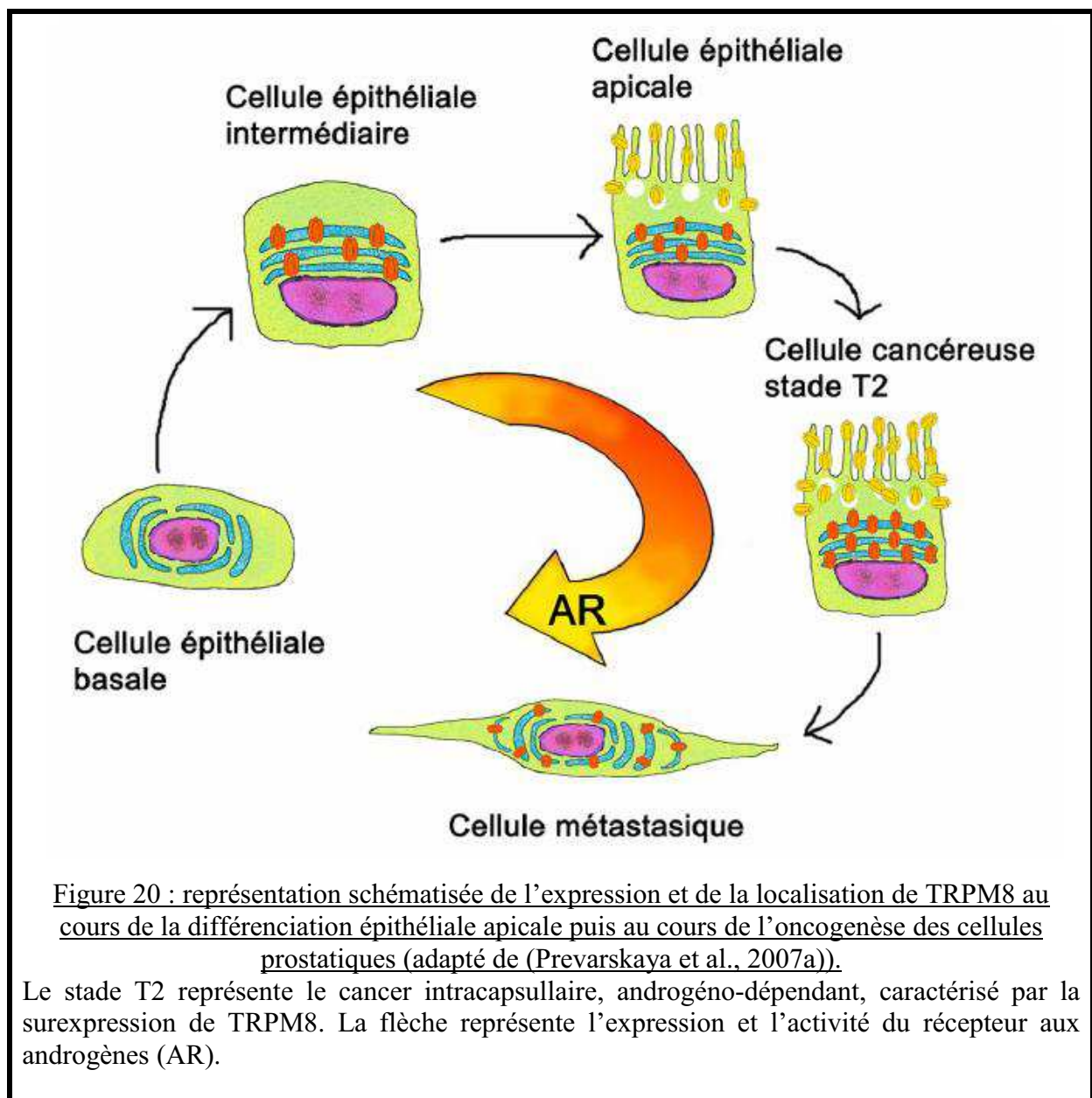
Une seconde étude réalisée au laboratoire a démontré d'une part que l'expression du gène *trpm8* était régulée par le récepteur aux androgènes et son ligand, la 5 α dihydrotestostérone, et d'autre part, que la protéine TRPM8 était exprimée dans les cellules épithéliales prostatiques apicales et principalement sur leur membrane lumineuse (Bidaux et al., 2005).

Le canal TRPM8 étant uniquement réticulaire au sein des cellules LNCaP qui sont des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses issues de métastase, la question d'une possible évolution de la localisation subcellulaire de TRPM8 en fonction des stades cancéreux au niveau des cellules épithéliales prostatiques apicales s'est posée.

Une troisième étude a été réalisée dans cette optique par le laboratoire sur les cellules épithéliales prostatiques issues de cultures primaires obtenues à partir de prélèvements de prostatites à différents stades cancéreux grâce à une collaboration avec le service d'Urologie du Professeur Brigitte Mauroy de l'Hôpital Saint Philibert de Lomme. Ce travail a mis en évidence une variation de la localisation subcellulaire du canal TRPM8 au cours de la progression du cancer. Les résultats avancés par les auteurs sont les suivants (figure 20) :

- Les cellules épithéliales prostatiques apicales normales, cancéreuses et hyperplasiques expriment toutes la protéine TRPM8 classique et fonctionnelle de 128 kDa à leur membrane plasmique.
- Les cellules épithéliales prostatiques apicales cancéreuses androgéno-dépendantes (correspondants au stade précoce du cancer de la prostate intracapsulaire) présentent une augmentation de l'activité du récepteur aux androgènes. Cette suractivité du récepteur aux androgènes a pour conséquence une surexpression du canal TRPM8 aboutissant à une plus grande densité de canaux TRPM8 au niveau des membranes plasmique et réticulaire.
- Lors de l'évolution du cancer vers l'androgéno-indépendance, les cellules épithéliales apicales se différencient et acquièrent un phénotype de cellules épithéliales intermédiaires. Ce changement de phénotype s'accompagne d'une perte du récepteur aux androgènes. Ces cellules différenciées perdent la localisation membranaire du canal TRPM8.

- Les cellules épithéliales prostatiques différenciées ou dédifférenciées présentent une localisation réticulaire d'une isoforme du canal TRPM8 dont l'expression s'avère indépendante de l'activité du récepteur aux androgènes.
- Au sein des cellules épithéliales apicales différenciées, au niveau réticulaire uniquement, il y a cohabitation de la forme normale et de l'isoforme réticulaire du canal TRPM8. Au cours de la dédifférenciation ou de l'entrée en métastase de ces cellules, on assiste à une disparition au niveau de la membrane plasmique et réticulaire de la forme classique ne laissant que l'isoforme réticulaire (Bidaux et al., 2007).



IV. C. 3. g) Implication de TRPM8 dans la survie cellulaire

Les travaux de Zhang et Barritt publiés en 2004 mettent en évidence un rôle du canal TRPM8 dans la survie des cellules épithéliales prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP. Ce rôle est le résultat de la constatation de plusieurs faits expérimentaux. Les auteurs, soit en laissant ces cellules en présence de menthol de manière prolongée, soit en les transfectant avec des siARN contre TRPM8, avaient observé une augmentation de leur apoptose. Zhang *et coll* concluaient dans leur article que TRPM8 était nécessaire à la viabilité cellulaire, mais que son activation forcée déclenchait l'apoptose (Zhang and Barritt, 2004). Autrement dit, TRPM8 protège de l'apoptose mais peut aussi agir comme inducteur de la mort cellulaire programmée.

Conclusion :

De façon tout à fait intéressante, si dans les neurones sensoriels la fonction de TRPM8 en tant que récepteur au froid est bien identifiée, son rôle dans la physiopathologie prostatique ainsi que ses mécanismes de régulation restent encore inconnus. Un enjeu majeur consiste en l'identification des modulateurs physiologiques de TRPM8 au niveau de la prostate. De nombreux neuropeptides, neurotransmetteurs et hormones sont synthétisés et sécrétés par les cellules stromales mais aussi par des cellules de la composante glandulaire de la prostate. Or, la synthèse et/ou la sécrétion de ces substances sont dérégulées lors de la cancérisation de la prostate. Malheureusement, l'action de ces molécules sur le canal TRPM8 reste inconnue.

Une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de TRPM8 permettra, premièrement, de découvrir son rôle physiologique dans la prostate normale et, deuxièmement, de préparer le terrain à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Depuis sa découverte en 2001, le canal TRPM8 fait l'objet de nombreuses études. Mis en évidence en tant que récepteur au froid dans les neurones sensoriels des ganglions rachidiens dorsaux et trigéminaux, le canal TRPM8 est également exprimé, au niveau périphérique, au sein des cellules épithéliales prostatiques apicales. Si de nombreux articles démontrent comment d'un point de vue thermodynamique la température régule l'activité du canal, quels sont les sites d'interactions entre les agonistes chimiques (menthol et iciline) et TRPM8 ou encore comment les lipides, le pH et le calcium influent sur son activité, aucune équipe ne met en évidence l'existence de modulateurs physiologiques de TRPM8, autres que le froid, aussi bien prostatiques que neuronaux. Vu l'intérêt que le laboratoire portait à l'étude du rôle du canal TRPM8 dans la physiopathologie prostatique, ma thèse était consacré à la recherche de modulateurs physiologiques de TRPM8 dans des tissus non soumis aux variations de température.

La démarche à l'origine du choix de notre stratégie fut l'analyse d'observations publiées telles que celles reportant le fait que la thermosensation soit modifiée dans différentes situations physiologiques telles que le stress, les traitements hormonaux, l'âge et le sexe (Doeland et al., 1989; Harju, 2002; Potkanowicz et al., 2003). Nous avons émis l'hypothèse que TRPM8 peut être régulé par les voies de signalisation empruntées par certains neuromodulateurs et hormones.

Mon projet a donc consisté à tenter d'élucider les points suivants :

1) La recherche de modulateurs physiologiques hormonaux du canal TRPM8 chez l'homme

Les androgènes étant des régulateurs prostatiques importants notamment pour la différenciation des cellules épithéliales prostatiques apicales, exprimant TRPM8, et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques, surexprimant TRPM8, nous avons sélectionné les hormones stéroïdiennes sexuelles ainsi que leurs précurseurs (prégnénolone, progestérone) comme candidats. Comme précisé plus avant, la thermosensation est modulée par l'état endocrinien de l'individu, nous avons alors décidé d'étudier la régulation potentielle du canal récepteur au froid TRPM8 dans les deux tissus que sont les neurones sensoriels et la prostate par les androgènes et leurs précurseurs.

2) L'implication de TRPM8 dans les cas pathologiques d'hypersensibilité au froid

Si les observations des souris KO pour le gène *trpm8* ont permis de souligner que ce canal est bien le récepteur au froid, elles ont néanmoins montrées que TRPM8 semble être impliqué

dans l'allodynie au froid qui correspond à une hypersensibilité douloureuse à des températures modérément basses (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). Cette pathologie fait suite à des lésions/constrictions de nerfs périphériques ou à l'utilisation de certains médicaments tels que l'oxaliplatine. Nous allons étudier les voies de régulations du canal TRPM8 au niveau sensoriel qui sont impliquées dans ce phénomène nociceptif aussi bien du point de vue de l'induction de cette hypersensibilité au froid que de l'analgésie pour combattre ces symptômes douloureux.

3) Quel est l'impact de ces voies de régulation ainsi que de ces modulateurs de TRPM8 dans la physiopathologie prostatique ?

Le canal TRPM8 a été décrit d'une part comme le récepteur au froid au niveau sensoriel mais son rôle au niveau de la prostate reste encore non élucidé. Des études ont démontré son rôle dans la survie des cellules cancéreuses prostatiques (Zhang and Barritt, 2004) et sa surexpression dans les cancers précoces androgéno-dépendants fait de lui un facteur oncogénique (Tsavaler et al., 2001). Des travaux du laboratoire suggèrent son implication dans la sécrétion des cellules prostatiques (Bidaux et al., 2007; Bidaux et al., 2005). Les sécrétions prostatiques des cellules épithéliales apicales étant nécessaires pour la fertilité du sperme (Elzanaty et al., 2002), le canal TRPM8 pourrait donc être également indirectement impliqué dans la fertilité (Bidaux et al., 2005). Au vue de ces données, l'importance du canal TRPM8 dans la physiopathologie prostatique est de plus en plus évidente. L'étude des voies de régulation de TRPM8 ainsi que l'identification de modulateurs physiologiques prostatiques de ce canal permettrait de mieux comprendre le rôle de celui-ci au niveau prostatique et serait potentiellement à l'origine de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif général de cette thèse est donc une étude fondamentale des mécanismes de régulation physiologiques de TRPM8 ainsi que la recherche de modulateurs de ce canal, autres que le froid, aussi bien au niveau sensoriel que prostatique.

Dans ce chapitre, je vais décrire les différentes techniques et lignées cellulaires qui ont été utilisées au cours de ma thèse pour réaliser les travaux présentés dans la partie résultat. Les études impliquant des techniques de biologie moléculaire et cellulaire ont été réalisées en collaboration avec des membres du laboratoire. Les expériences *in vivo* sur les rats ainsi que les études électrophysiologiques sur les neurones sensoriels sont le fruit de collaborations établies avec des laboratoires français et étrangers.

I. La culture cellulaire

I. 1. Les lignées cellulaires

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé les lignées cellulaires suivantes :

I. 1. a) La lignée HEK-293_{M8} :

Pour les études mécanistiques, nous avons principalement utilisé la lignée HEK-293_{M8}. Cette lignée est le résultat de la transfection stable des cellules HEK-293-TREx (*Human Embryonic Kidney 293*) avec le gène *trpm8* cloné à partir de cellules prostatiques humaines.

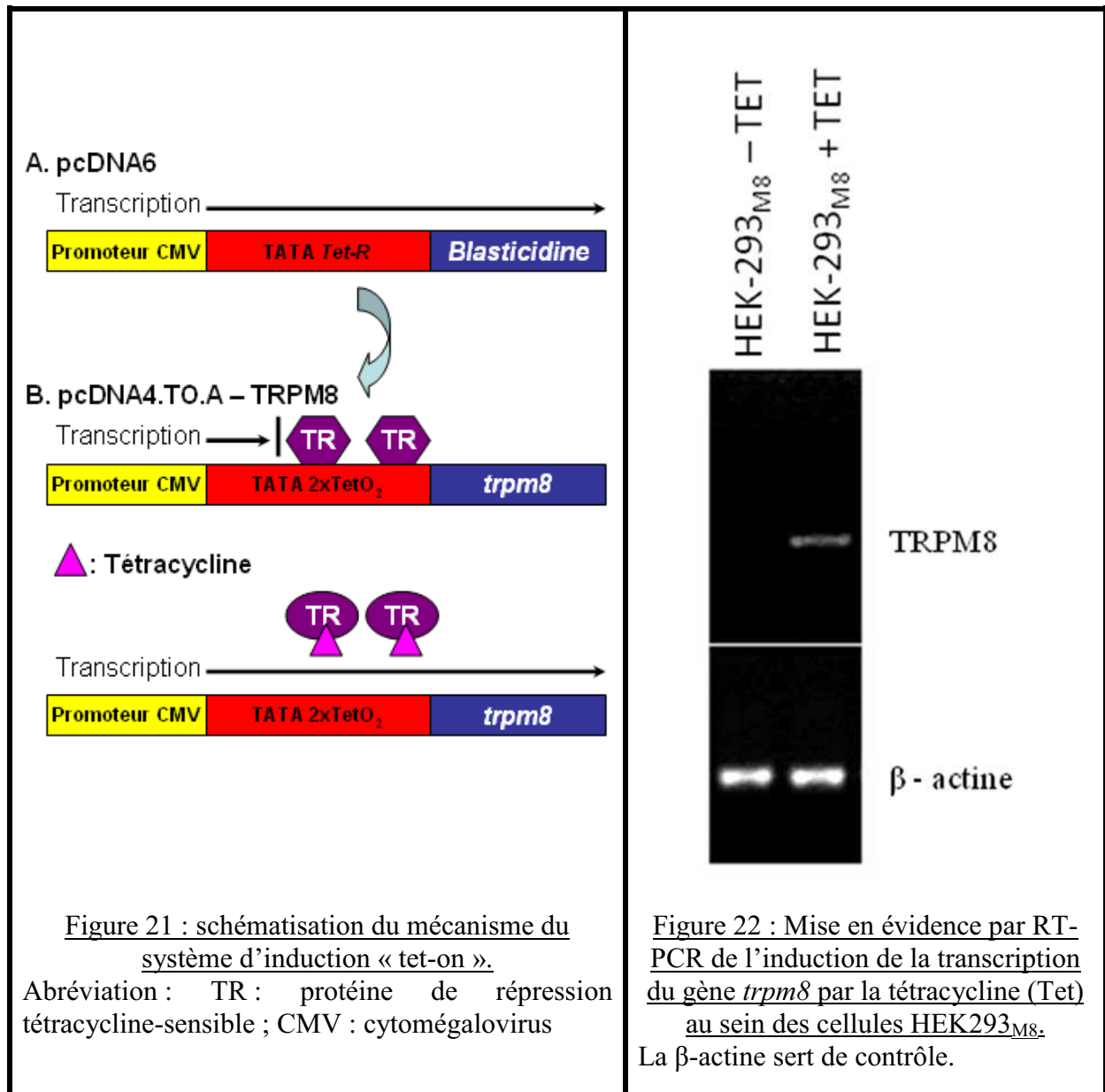
La lignée HEK-293-TREx est elle même le résultat de la transfection stable de cellules HEK-293 (lignée transformée dérivant de cellules rénales corticales d'embryon humain) avec le gène de la protéine de répression tétracycline-sensible (*Tet-R*) ainsi que celui de résistance à la blasticidine.

Un tel modèle cellulaire est la base d'un système d'expression inductible de gènes hétérologues par la tétracycline. En effet, en transfectant ces cellules HEK-293-TREx avec un plasmide pcDNA.TO.A – TRPM8 présentant :

- un promoteur CMV (cytomégalovirus),
- deux séquences opérateurs tétracyclines (TetO₂) entre la boîte TATA du promoteur CMV et le site de départ de la transcription du gène *trpm8*,
- le gène *trpm8* et
- le gène de résistance à la zéocine,

l'expression du gène *trpm8* sera dépendante de la présence ou non de tétracycline dans le milieu de culture.

- En absence de tétracycline, les protéines Tet-R se fixent sur leurs séquences cibles empêchant la transcription du gène *trpm8*.
- En ajoutant la tétracycline, celle-ci se fixe sur les protéines Tet-R et change leur conformation spatiale. Les protéines Tet-R alors malconformées ne se fixent plus sur leurs séquences cibles permettant ainsi la transcription du gène *trpm8* (figures 21 et 22).



I. 1. b) Les neurones sensoriels

Les neurones sensoriels sont isolés à partir de ganglions rachidiens dorsaux de rats adultes Wistar (250 – 300g) par digestion enzymatique. Les expériences effectuées sur ces cellules sont réalisées le jour même de l'isolation.

I. 1. c) La lignée PC-3 (Prostate Carcinoma)

Provenant de l'ATCC (*American Type Cell Collection*, USA), cette lignée prostatique androgéno-indépendante a été obtenue à partir de métastases osseuses d'un adénocarcinome de grade IV (peu différencié) chez un patient caucasien de 62 ans. Ces cellules présentent un fort potentiel métastatique et n'expriment pas le récepteur aux androgènes.

I. 1. d) La lignée LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate)

Commercialisée également par l'ATCC, cette lignée prostatique androgéno-dépendante a été établie à partir de cellules d'un adénocarcinome de prostate métastasées dans un ganglion lymphatique supraclaviculaire d'un patient caucasien de 50 ans. A la différence des cellules PC-3, les cellules LNCaP expriment le récepteur aux androgènes.

I. 2. Les conditions de culture

Les différents types cellulaires sont cultivés dans des flacons en plastique de 25 ou 75 cm² incubant dans une étuve à 37°C saturée en humidité et dont l'atmosphère est enrichie en CO₂ (Air 95%, CO₂ 5%). Les milieux sont changés tous les trois jours.

Pour chacune des lignées, un passage est réalisé une fois par semaine lorsque les cellules atteignent 80% de confluence. Les cellules sont incubées à 37°C en présence de Trypsine EDTA (0,25%) afin de les décoller. La réaction est stoppée par l'ajout de milieu de culture complet. Les cellules sont ensuite individualisées mécaniquement. Un volume de cette suspension cellulaire correspondant à environ 50-60.000 cellules est prélevé, ajouté à 10 ml de milieu complet et replacé dans un nouveau flacon pour continuer la culture. Le reste de la suspension cellulaire est répartie, au besoin, dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre pour l'électrophysiologie. Pour les expériences en imagerie calcique, une lamelle de verre, sur laquelle seront ensemencées les cellules, est ajoutée dans la boîte de pétri.

Les lignées prostatiques PC-3 et LNCaP sont cultivées dans un milieu RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) complet contenant 10% de SVF (sérum de veau fœtal), 2 mM de L-Glutamine et 100 µg/ml de kanamycine. Les cellules HEK-293_{M8} sont, quant à elles,

cultivées dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*) complété par 10% de SVF et 100 µg/ml de kanamycine.

I. 3. L'induction de l'expression de TRPM8 dans les cellules HEK-293_{M8}

L'expression de TRPM8 est, comme il a été décrit précédemment, régie par un système « Tet on ». L'induction se fait par ajout, 24h avant l'expérience, de tétracycline (1 µg/ml) dans le milieu de culture.

II. Transfections réalisées

Au cours de ma thèse, j'ai utilisé aussi bien la lignée stable HEK-293_{M8} que des modèles de surexpression transitoire. Dans ce chapitre seront décrites les méthodes de transfections transitoires et stables utilisées au cours de mes expériences.

II. 1. La transfection transitoire : nucléofection

La nucléofection (ou *Nucleofector Technology*) est une méthode de transfection, basée sur l'électroporation, mise au point par la société Amaxa et commercialisée par Lonza (Köln, Allemagne). Cette dernière permet, de manière reproductible et efficace, d'introduire des plasmides, siARNs et autres matériels nucléiques directement dans le noyau des cellules.

D'un point de vue plus technique, la transfection est réalisée sur des cellules en suspension. Après trypsinisation et comptage au moyen d'une lame de Malassez, deux millions de cellules sont culotées, reprises dans 100 µl de tampon de transfection (le type de tampon varie avec la lignée) auquel est ajouté le matériel génétique à transférer : 2µg de plasmide et/ou 100 nM de siARN ainsi que 0,5 µg de GFP (pour choisir les cellules transfectées lors des expériences d'électrophysiologie). La suspension obtenue est ensuite placée dans une cuve d'électroporation, transférée dans le nucléofector dont les paramètres de stimulation électrique sont optimisés pour chacune des lignées cellulaires. Les cellules reposent ensuite quelques minutes dans du milieu de culture à 37°C et sont ensuite réparties selon les besoins des expérimentations à réaliser.

Les études fonctionnelles sont réalisées 24h après nucléofection. Dans le cas où les expériences nécessitent la transfection de siARN, celles-ci sont effectuées 48h après nucléofection.

II. 2. L'établissement d'une lignée stable HEK-293_{M8}

Deux jours après transfection des cellules HEK-293-TREx avec le plasmide pcDNA.TO.A – TRPM8, ces dernières sont mises en contact avec les antibiotiques de sélection (zéocine et blasticidine) à des doses pré-déterminées lors de tests de toxicité (respectivement 200 et 5 µg/ml). Lorsque toutes les cellules contrôles (non transfectées) sont mortes, la sélection est arrêtée pour permettre aux clones de croître. Les différents clones résistants sont alors récupérés soit directement dans un cône de pipette avec de la trypsine, soit trypsinisés dans des anneaux de repiquage puis sous-clonés. Les différents clones HEK-293_{M8} obtenus sont ensuite criblés par PCR, Western-blot et analyses fonctionnelles (patch-clamp et imagerie calcique). Les clones positifs sont congelés.

III. Les études fonctionnelles

III. 1. Le patch clamp

Afin d'étudier les différents mécanismes de régulation du canal TRPM8, j'ai principalement utilisé la technique de patch clamp.

III. 1. a) Définition

L'étude de l'activité des canaux ioniques repose sur l'enregistrement des événements électriques engendrés par le flux des particules chargées que sont les ions au travers de ces structures protéiques. Les courants ioniques qui résultent de ce flux d'ions au travers des canaux ont des valeurs généralement comprises entre quelques picoampères (pA) et quelques microampères (µA). La technique de patch-clamp permet de mesurer en temps réel les variations de courant induites par les mouvements d'ions au travers des canaux. Ces variations reflètent alors l'activité des canaux ioniques. Il est, de ce fait, possible d'étudier avec cette méthode électrophysiologique la fonctionnalité et les modes de régulation des canaux ioniques. La technique de patch-clamp permet, en outre, d'enregistrer l'activité de canaux unitaires ou de l'ensemble des canaux d'une cellule selon la configuration utilisée.

III. 1. b) Principe

Cette technique consiste à apposer une pipette en verre ou pipette de patch (d'un diamètre de l'ordre du micromètre) à la surface de la cellule à l'aide d'un micromanipulateur. Grâce à un système d'application de pressions / dépressions d'air au niveau du porte-pipette, on exerce une légère aspiration afin de faire pénétrer et d'isoler électriquement un fragment de

membrane (*patch*) dans la pipette. La dépression est maintenue jusqu'à l'obtention d'un contact intime (ou *seal*) entre la pipette et la membrane de la cellule. La résistance membranaire mesurée est le reflet de la qualité de ce contact. Lorsque celle-ci est de l'ordre du gigaohm ($G\Omega$), on considère que le contact est étanche (qualifié de *giga seal*), aucune fuite ne viendra perturber les mesures. On peut alors imposer à la membrane un potentiel (*voltage clamp*) et mesurer le courant nécessaire pour maintenir ce potentiel à une valeur constante. Cette mesure est donc un reflet des courants transitant par les quelques canaux isolés dans le *patch*. Cette configuration, nommée « cellule attachée » (*cell attached*), est la configuration de départ permettant d'obtenir les quatre autres configurations de patch-clamp.

III. 1. c) Les configurations de patch-clamp

Afin de réaliser les mesures d'activité électrique des canaux de la membrane plasmique, cinq configurations de patch clamp sont envisageables. Le choix de la configuration dépend du but de l'expérience. Elles se répartissent en deux grandes catégories :

- Les configurations permettant l'enregistrement d'un courant microscopique ou unitaire (activité d'un ou d'un faible nombre de canaux), à savoir les configurations « cellule attachée » (*cell attached*), « *inside-out* » et « *outside-out* ».
- Les configurations permettant d'enregistrer un courant global ou macroscopique (activité de tous les canaux de la membrane plasmique) que sont les configurations « cellule entière » (*whole-cell*) et « patch perforé ».

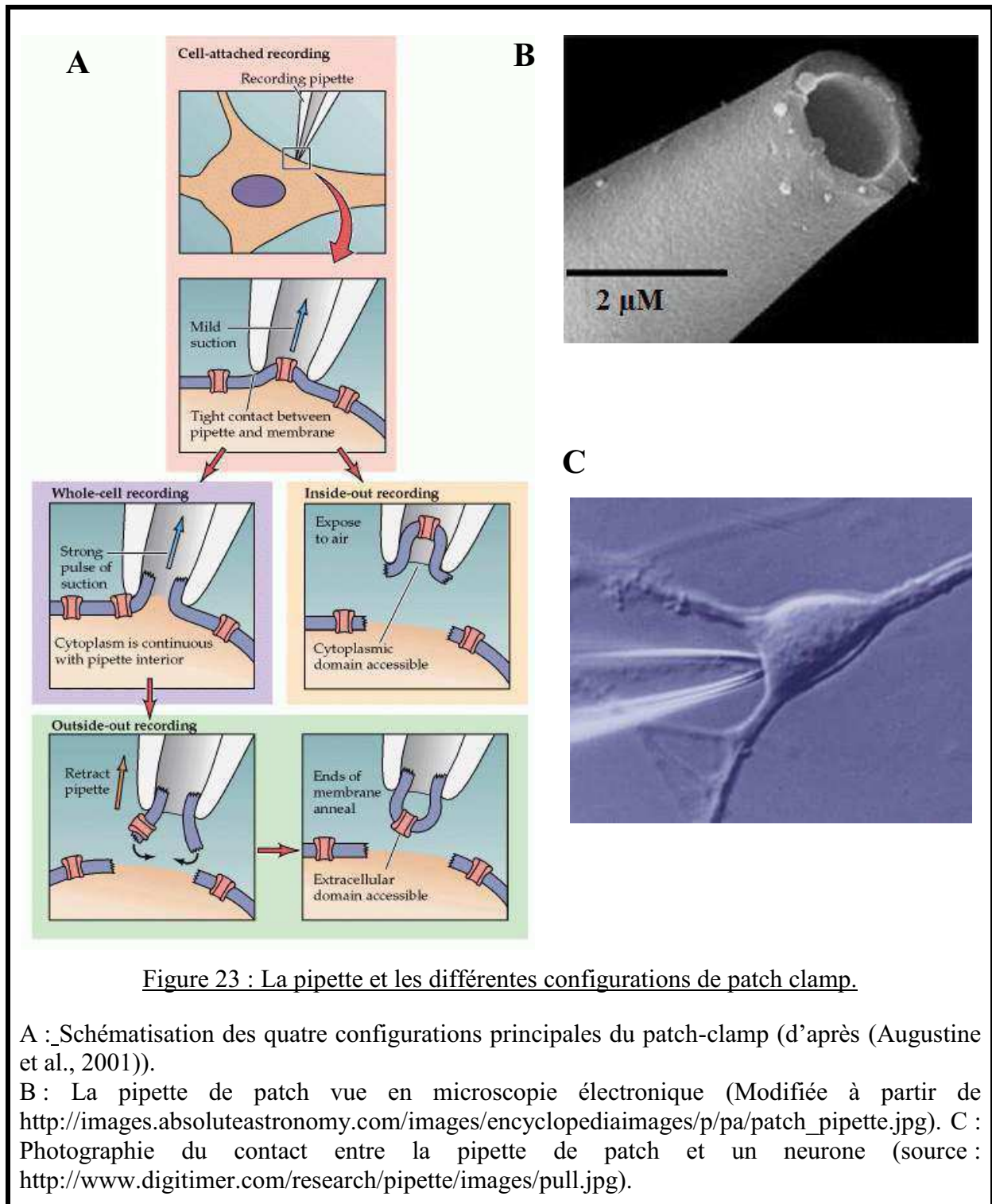
La configuration « cellule-attachée » (*cell-attached*) : Comme décrit précédemment, celle-ci consiste à créer un contact étanche entre une portion de la membrane plasmique et la pipette de patch. Cette configuration permet de mesurer un courant microscopique correspondant à l'activité unitaire des canaux isolés sous la pipette de patch. Du fait que la membrane reste intacte, cette approche est la plus physiologique. Il n'y a pas de dilution par le milieu intrapipette des régulateurs intracytoplasmiques et de ce fait pas de phénomène de *run down* possible. Malheureusement, l'intégrité respectée de la membrane plasmique ne permet pas d'avoir accès au potentiel intracellulaire. Il est impossible de contrôler le potentiel imposé (potentiel membranaire inconnu), d'où la nécessité de rendre ce potentiel membranaire nul par l'utilisation de solutions symétriques.

La configuration « cellule-entière » (*whole-cell*) : elle découle de la configuration précédente. Elle est obtenue par rupture du fragment de membrane présent sous la pipette de

patch en « cellule attachée » par une aspiration brève et intense et/ou l'application d'un voltage élevé (*zap*). De cette manière, la solution intrapipette est en contact avec le cytoplasme de la cellule. On enregistre alors un courant macroscopique reflétant l'activité de tous les canaux de la membrane plasmique. Du fait que l'intérieur de la pipette soit en communication avec l'intérieur de la cellule, il est alors possible d'injecter directement dans le cytoplasme de la cellule certaines substances (ATP, GTP, anticorps, agents chimiques non diffusible au travers de la membrane...) susceptibles de moduler l'activité de canaux ioniques ou des protéines (telles que des enzymes) régulant l'activité de ces canaux. Enfin, du fait de cette communication entre la pipette et la cellule, le milieu intrapipette vient diluer le cytoplasme, il y aura donc perte de régulateurs intracytoplasmiques. Le phénomène de *run down* est donc observable dans cette configuration pour les canaux qui y sont sensibles comme TRPM8 avec la perte de la machinerie énergétique de la cellule qui permet le renouvellement du PIP2.

La configuration « inside-out » : Toujours à partir de la configuration « cellule attachée », si on soulève la pipette de patch, on emporte alors le fragment de membrane auquel elle était accolée. La face interne de la membrane plasmique étant à l'extérieur de la pipette, d'où l'appellation « *inside-out* », la boîte de pétri est remplie avec le milieu intracellulaire et la pipette de patch avec le milieu extracellulaire. L'intérêt d'une telle configuration est à la fois d'enregistrer l'activité unitaire des canaux présents (courant microscopique) mais aussi de pouvoir appliquer, sur la face interne du canal, différentes drogues ou différents agents intracellulaire susceptibles de réguler le canal. Cette configuration est donc particulièrement recherchée pour l'étude du *run down* et l'identification du régulateur perdu et responsable de la disparition du courant.

La configuration « outside-out » : A partir de la configuration cellule entière, si l'on éloigne la pipette, on arrache alors les deux fragments de membrane qui étaient attachés à la pipette de patch. Ces deux fragments vont passivement fusionner et former une petite vésicule au bout de la pipette. La face externe de la membrane plasmique est cette fois-ci à l'extérieur de la pipette de patch expliquant la dénomination de « *outside-out* ». Cette configuration est particulièrement utile si l'on veut étudier l'impact sur l'activité des quelques canaux emportés lors de l'excision (courant microscopique) de divers composés, tels des ligands extracellulaires ou des agents non diffusibles, sur leur face externe.



La configuration « patch perforé » : Cette dernière configuration dérive de la configuration cellule attachée. L'ajout d'antibiotiques ionophores (nystatine, amphotéricine B) dans la solution intrapipette va perméabiliser le fragment de membrane situé sous la pipette de patch en y créant des pores. Cette perforation va diminuer fortement la résistance membranaire de telle manière que l'on peut, en première approximation, considérer qu'il y a accès électrique

au compartiment intracellulaire. Le résultat obtenu est donc une configuration « cellule-entière » hybride. Grâce aux pores néoformés, il est maintenant possible d'accéder au potentiel intracellulaire et de réaliser des mesures du courant macroscopique. Mais l'intérêt premier de ces pores est qu'ils ne vont laisser passer que des molécules de diamètres inférieures à 10 Å ainsi que des ions monovalents. Les ions multivalents tels les ions Ca^{2+} sont peu ou pas perméants. Il n'y aura pas de perte de régulateurs intracellulaires et donc pas de *run down*. Cette configuration est donc à choisir dans le cas de l'étude de canaux subissant un phénomène de *run down* drastique en « cellule-entière ».

III. 1. d) L'appareillage

Le poste de patch-clamp (figure 24) est composé des éléments suivant :

1 : **la table anti-vibrations** amortie les vibrations mécaniques extérieures afin d'assurer une totale stabilité du système lors de l'expérience.

2 : **la cage de Faraday** isole le système de toutes les perturbations électrostatiques.

3 : **le microscope inversé** (Nikon Instruments, Japan).

4 : **le micromanipulateur** MP-225 (Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA) permet d'imprimer à la tête de patch des mouvements fins et précis dans les trois dimensions pour approcher la pipette et la poser à la surface de la cellule.

5 : **la tête de patch** qui est le premier étage d'amplification. Elle comporte en outre l'électrode de mesure en chlorure d'argent emprisonnée dans la pipette de patch.

6 : **la pipette de patch** permet le contact avec la membrane de la cellule. Elle contient l'électrode de mesure en chlorure d'argent qui plonge dans le milieu intrapipette. Elle est obtenue par chauffage et étirement d'un capillaire de verre (World Precision Instr., Inc., Sarasota, FL) effectués grâce à une étireuse automatique horizontale modèle P-97 (Sutter Instruments Co., Novato, CA, USA).

7 : La **Digidata 1322A** (Molecular Devices, Union City, CA, USA) sert de convertisseur signal analogique/numérique. Il assure une communication bidirectionnelle entre l'ordinateur et le système de mesure. Il permet enfin la mesure de la capacité membranaire (taille de la cellule).

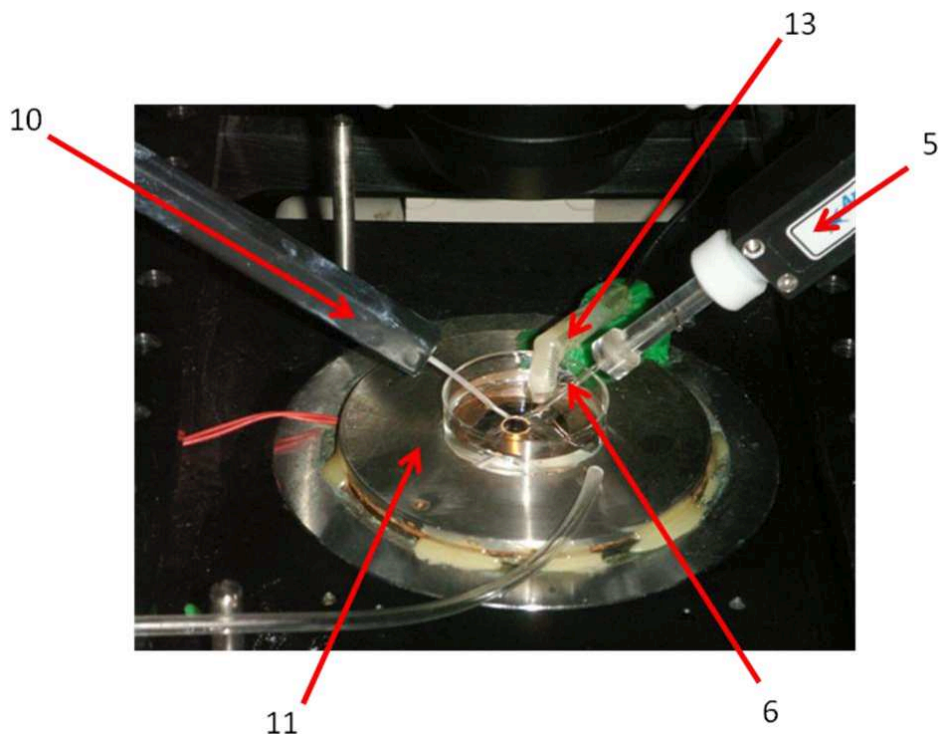
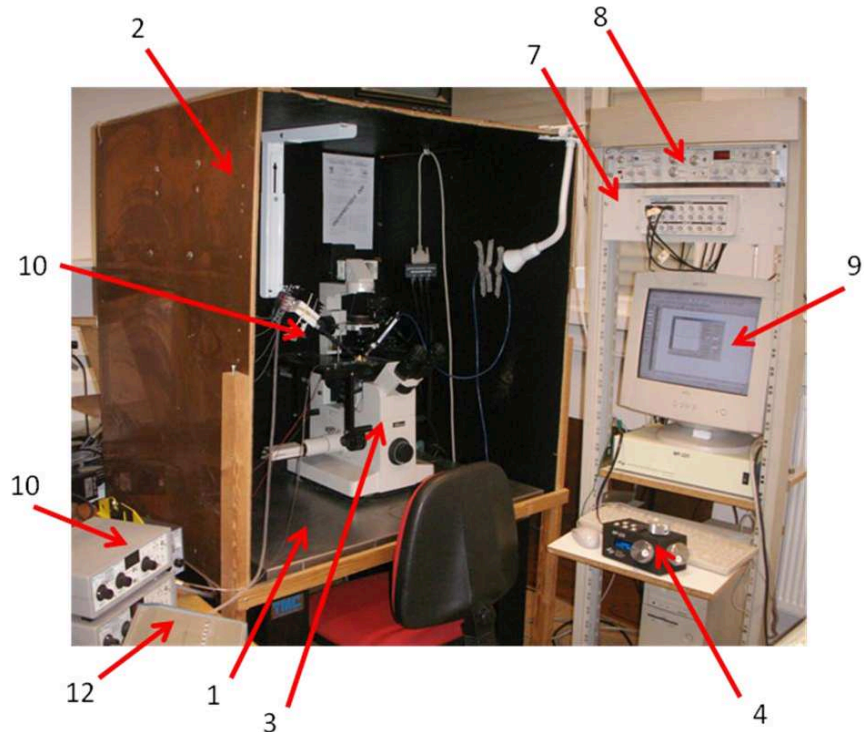


Figure 24 : Elements composant le poste de patch-clamp

8 : **l'amplificateur de patch-clamp Axopatch 200B** (Molecular Devices, Union City, CA, USA) adapté à la mesure de courants de l'ordre du picoampère, il permet d'imposer le voltage.

9 : **l'ordinateur** muni des logiciels **Pclamp v9.0** (Molecular Devices, Union City, CA, USA) pour visualiser les courants, de **Clampfit v9.0** (Molecular Devices, Union City, CA, USA) et **Origin v5.0** (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) pour l'analyse et de **Instat v3.06** (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) pour les tests statistiques.

10 : **la tête de perfusion thermorégulée CH (cooling/heating) module** (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA) permet d'appliquer les solutions et drogues à tester aux températures souhaitées. La température du module est régulée par le **contrôleur analogue de température TC2BIP** (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA).

11 : **une plaque chauffante** pour maintenir la boîte de pétri contenant les cellules à 37°C.

12 : **le contrôleur du système de perfusion MEV-9** (BioLogic) assure les changements rapides des solutions à tester.

13 : **l'électrode de référence** qui ferme le circuit électrique.

III. 1. e) Les solutions utilisées

La composition des solutions intracellulaire et extracellulaire varie en fonction du but de l'expérience mais aussi du modèle cellulaire utilisé. De ce fait, par rapport aux solutions utilisées pour les HEK-293_{M8}, celles employées dans les manipulations concernant les cellules LNCaP et PC3 diffèrent en deux points : l'ajout de TEA (tétraéthylammonium) en extracellulaire et le remplacement du chlorure de potassium par du chlorure de césium en intracellulaire.

Les cellules PC3 et LNCaP présentent un courant potassique de base important. Ce courant est, comme le courant TRPM8, rectifiant sortant. Par contre, il diffère du courant TRPM8 par son potentiel d'inversion qui avoisine les -70mV pour le courant potassique et 0 mV pour le courant TRPM8. Afin de ne pas « polluer » le signal par ce courant potassique endogène, nous avons ajouté des inhibiteurs de ce courant en extracellulaire, le TEA, et en intracellulaire en remplaçant le potassium par du césium.

Solutions extracellulaires

	HEK-293 _{M8}	LNCaP / PC3	Neurones
NaCl	140	140	140
KCl	5	5	5
CaCl ₂	2	2	2
MgCl ₂	1	1	1
Hepes	10	10	10
Glucose	5	5	10
Na ₂ HPO ₄	0.3	0.3	-
KH ₂ PO ₄	0.4	0.4	-
NaHCO ₃	4	4	-
TEA	-	10	-
pH (ajusté avec)	7.4 (NaOH)	7.4 (NaOH)	7.4 (NaOH)

Solutions intracellulaires

	HEK-293 _{M8}	LNCaP / PC3	Neurones
CsCl	-	140	140
KCl	140	-	-
CaCl ₂	2.5	2.5	-
MgCl ₂	1	1	-
Hepes	10	10	10
EGTA	4	4	5
Mg-ATP	-	-	2
Li-GTP	-	-	0.5
pH (ajusté avec)	7.2 (KOH)	7.2 (CsOH)	7.3 (CsOH)

Les osmolarités des solutions extracellulaires (320 mosm.l⁻¹) et intracellulaires (290 mosm.l⁻¹) sont ajustées par ajout de D-mannitol.

III. 1. f) Protocoles de stimulation et caractéristiques du courant TRPM8

Pour mesurer l'activité des canaux TRPM8, j'ai principalement utilisé les deux protocoles suivants :

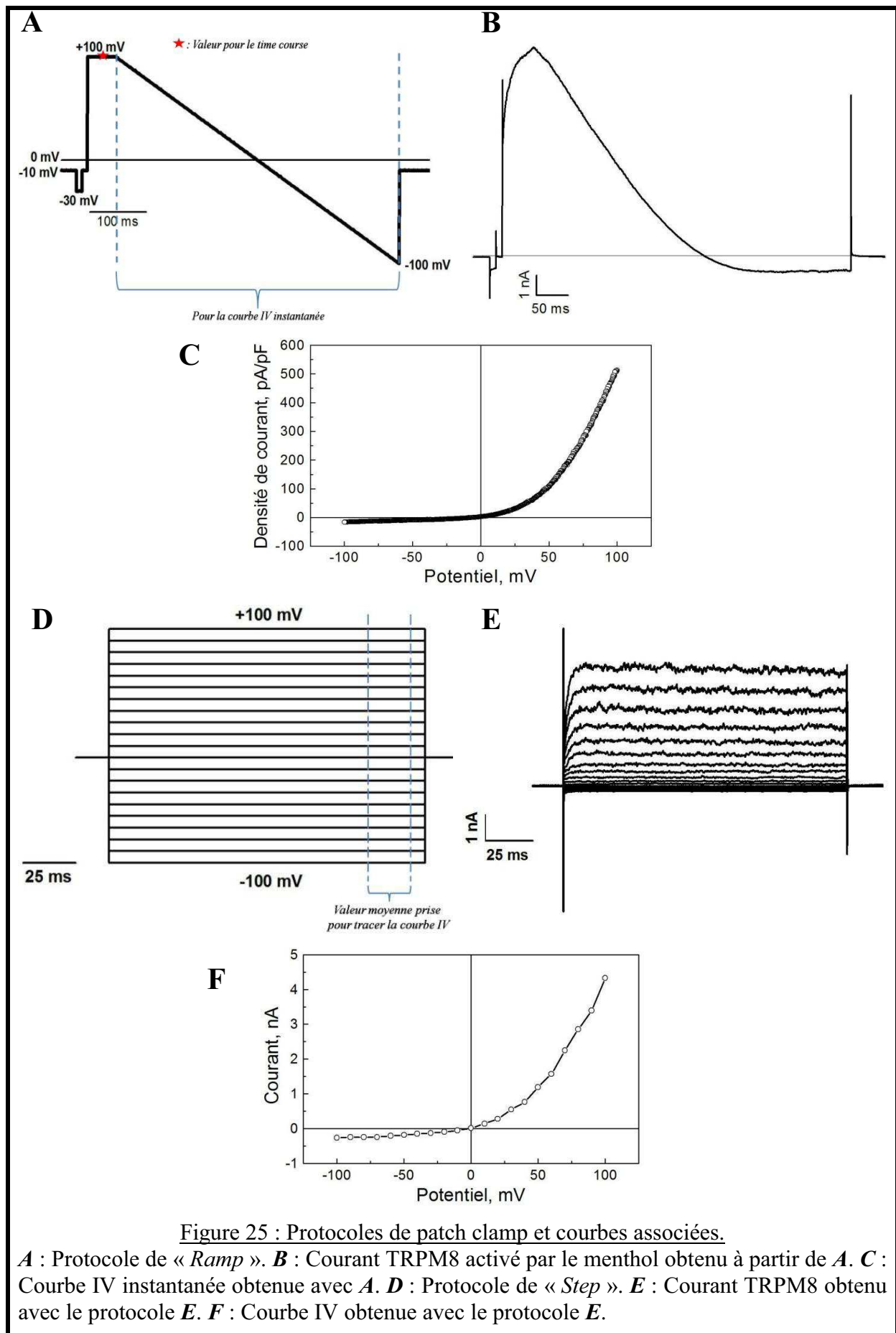


Figure 25 : Protocoles de patch clamp et courbes associées.

A : Protocole de « Ramp ». *B* : Courant TRPM8 activé par le menthol obtenu à partir de *A*. *C* : Courbe IV instantanée obtenue avec *A*. *D* : Protocole de « Step ». *E* : Courant TRPM8 obtenu avec le protocole *E*. *F* : Courbe IV obtenue avec le protocole *E*.

Le protocole de « *Ramp* » permet, grâce au plateau à +100 mV, de suivre l'évolution du courant en fonction du temps. Mais, grâce à la seconde partie du protocole, d'obtenir aussi une courbe IV (courant/potentiel) instantanée. Le protocole de « *step* » quant à lui nous donne une courbe IV plus précise car pour chacune des valeurs de potentiels appliquées à la cellule, on prend la valeur moyenne de courant lorsque ce dernier est arrivé, du point de vue de sa cinétique, à une phase plateau stable.

Comme on peut le constater sur les courbes de la figure 25, le courant TRPM8 présente les caractéristiques suivantes :

- Une rectification sortante traduisant le fait que la probabilité d'ouverture du canal est d'autant plus importante que l'on se déplace vers des potentiels de plus en plus positifs.
- Un potentiel d'inversion avoisinant la valeur de 0 mV traduisant son caractère cationique non sélectif.
- Une cinétique d'activation lente.

III. 2. Les expériences in vivo

III. 2. a) Les animaux

Les expériences *in vivo* présentées dans la partie résultat ont été réalisées sur des rats mâles de la souche Wistar (Janvier, France) ainsi que sur des souris mâles C57Bl/6J (Charles River, France) et transgéniques déficientes pour le gène *trpm8* (obtenues auprès du Professeur David Julius, University of San Francisco, USA).

Les animaux pèsent entre 150 et 200 g pour les rats et 20 à 24 g pour les souris. Ils sont placés en stabulation, pendant une semaine, par groupe de 4 par cage et maintenus dans un environnement thermorégulé à 22°C avec un cycle jour/nuit de 12 heures et un accès libre (*ad libitum*) à l'eau et à la nourriture.

Les expériences ont été réalisées en aveugle, avec randomisation des traitements et selon la méthode des blocs pour éliminer toute influence extérieure non maîtrisable et toute variation chronobiologique. De ce fait, toutes les manipulations sont effectuées dans une pièce calme, par le même expérimentateur en prenant soin de respecter les exigences réglementaires sur l'expérimentation animale (Zimmermann, 1983).

III. 2. b) Test de préférence de plaques (cold avoidance)

Ce test permet de réaliser des expériences sur des animaux non contraints, libres de choisir la zone qu'ils préfèrent entre 2 plaques à des températures différentes. On peut ainsi déterminer les seuils de nociception et étudier l'influence de certains gènes ou substances sur ces seuils.

Le dispositif se présente comme suit : deux plaques thermorégulées adjacentes forment une surface totale de 16,5 cm x 16,5 cm enfermée dans une chambre de plexiglas (34 cm x 17 cm x 25 cm) séparée longitudinalement en deux afin d'observer indépendamment deux animaux à la fois (figure 26, Biosed, France). La température de chacune des plaques peut être contrôlée individuellement sur une gamme de 3 à 65°C. L'une des plaques présente une température fixée à 25°C, la température de la seconde varie (25°C, 21°C, 19°C, 17°C, 15°C, et 12°C).



Figure 26 : Le dispositif du test de la préférence de plaques.

(Source : <http://www.bioseb.com/bioseb/francais/default/item.php?id=897>)

Les mouvements volontaires des animaux entre les deux plaques sont enregistrés pendant 3 minutes. Un cumul du temps passé sur chacune des zones thermiques est réalisé ainsi qu'un comptage du nombre de passages au niveau de l'inter-plaque. Cette deuxième donnée est une mesure générale du comportement exploratoire des animaux testés.

III. 2. c) Test d'immersion de la queue/patte dans un bain marie

Ce test permet de quantifier la sensibilité thermique des animaux (Janssen et al., 1963). Les animaux sont maintenus dans un chiffon et leur queue est immergée au tiers dans un bain marie thermostaté à différentes températures, comprises entre 6 et 48°C, jusqu'au retrait de

celle-ci ou jusqu'au « *cut off* » fixé à 30 secondes. Le test est réalisé trois fois pour chaque animal et la moyenne des deux valeurs les plus proches est effectuée.

I. Article 1

Testosterone is a key regulator of TRPM8–mediated cold perception

Alexis Bavencoffe^{*}, Dimitra Gkika^{*}, Jérôme Busserolles^{*}, Artem Kondratskyi, Alexander Zholos, Eric Chapuy, Monique Etienne, Alain Eschalier, Brigitte Mauroy, Yaroslav Shuba, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

Article soumis à Cell

^{*}: Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail

Dans cette étude nous avons pour la première fois mis en évidence des inhibiteurs physiologiques du canal TRPM8 : les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone). Nous y décrivons la voie de transduction non génomique mise à profit par ces hormones stéroïdiennes sexuelles mâles. Nous confirmons cet effet inhibiteur dans les neurones sensoriels de ganglions rachidiens dorsaux de rats. Nous démontrons enfin l'impact in vivo de cette voie non génomique de régulation de TRPM8 sur la sensibilité au froid des animaux.

De nombreuses études ont été publiées sur les modes d'activation du canal TRPM8 par la température ainsi que par ses agonistes chimiques synthétiques (iciline) ou naturel (menthol), mais aucune n'a encore révélé l'existence de régulateurs physiologiques de ce canal, autres que le froid. Or, des travaux reportent des altérations de certaines modalités sensorielles comme la perception de températures froides et chaudes en fonction du statut hormonal de l'individu ou lors d'altérations de ce statut (Doeland et al., 1989; Harju, 2002; Potkanowicz et al., 2003). Ceci suggère un rôle des hormones stéroïdiennes sexuelles sur l'activité du canal TRPM8 au niveau sensoriel.

Criblage de l'effet des hormones stéroïdiennes sexuelles sur l'activité du canal TRPM8

C'est dans cette optique que nous avons testé les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone), les hormones femelles (œstrogène et progestérone) ainsi que des précurseurs de ces deux catégories d'hormones (prégnénone, prégnanolone, androstènedione, 25-hydroxy-cholestérol). Par une approche électrophysiologique, nous nous sommes aperçus que seuls les androgènes exerçaient un effet, en l'occurrence inhibiteur, sur l'activité du canal TRPM8 activé par ses trois agonistes classiques (froid, iciline et menthol) dans le modèle d'étude HEK-293_{M8} (clone stable, décrit dans la partie matériels et méthodes). Cette inhibition présente une cinétique rapide et ne fait pas intervenir le récepteur aux androgènes classique intracellulaire. Nous en avons conclu que les androgènes régulent négativement l'activité du récepteur au froid TRPM8 par un mécanisme non génomique.

Effet des androgènes au niveau sensoriel *in vitro* et *in vivo*

Nous avons confirmé cet effet sur le courant TRPM8 au sein des neurones sensoriels de DRG fraîchement isolés de rat. Mais surtout, grâce à notre collaboration avec le Dr. Jérôme Buserrolles (INSERM UMR 766, Clermont-Ferrand, France), nous avons réalisé des expériences *in vivo* sur la sensibilité au froid de deux modèles animaux (rats et souris). Nous avons pratiqué deux types de tests, le test de préférence de plaques (*cold avoidance*) et celui d'immersion de la queue (*tail immersion*), sur quatre groupes d'animaux : des rats mâles subissant des injections intrathécales ou non de siARN anti-TRPM8 ainsi que des souris mâles sauvages ou KO pour le gène *trpm8* (TRPM8^{-/-}).

Nous avons observé que les animaux contrôles ayant subi une orchidectomie présentaient une diminution de la sensibilité aux températures modérément basses. Ces mêmes animaux retrouvaient une sensibilité normale suite à la pose d'implants sous cutanés de testostérone. Cette variation de sensibilité est détectable pour des températures comprises entre 16 et 20°C. Aucune différence n'est observée chez les animaux ayant subi une orchidectomie par rapport aux animaux contrôles pour des températures douloureuses comprises dans la gamme d'activité du canal TRPA1 (6°C), suggérant que ce dernier n'intervient pas dans le phénomène observé. Les rats traités avec les siARN anti-TRPM8 ou les souris TRPM8^{-/-} possèdent une sensibilité au froid diminuée par rapport aux animaux contrôles. L'ablation, chez ces animaux, des testicules ne restaure pas leur sensibilité ce qui démontre bien le rôle des androgènes sur le contrôle de la perception des basses températures dans une gamme modérée correspondant à celle de TRPM8.

Les androgènes induisent un décalage de la courbe d'activation voltage-dépendante de TRPM8

Après avoir confirmé l'effet androgénique inhibiteur à la fois sur les neurones sensoriels mais également *in vivo* sur les modèles d'étude animal, nous avons cherché à déterminer par quel mécanisme les androgènes inhibent TRPM8. Au moyen de la lignée HEK-293_{M8}, nous avons démontré que la testostérone entraînait un déplacement de la courbe d'activation voltage-dépendante du canal TRPM8 vers des potentiels plus dépolarisés. De ce fait, le canal est moins activable au potentiel de repos de la cellule expliquant ainsi l'inhibition de l'activité de TRPM8, observée précédemment.

Les androgènes agissent par la voie de signalisation intracellulaire Gi/adénylate cyclase/cAMP/PKA

Nous avons enfin décortiqué le mécanisme de transduction intracellulaire mis à profit par les androgènes afin d'influer sur l'activité de TRPM8 grâce au modèle cellulaire HEK-293_{M8}. Nous avons mis en évidence que ces stéroïdes mâles stimulent les protéines Gi qui vont à leur tour bloquer l'adénylate cyclase (AC), entraînant ainsi une chute de la concentration intracellulaire en cAMP qui va aboutir à la diminution de l'activité de la protéine kinase A (PKA) et à l'inhibition de TRPM8. Cette dernière peut être due à une diminution de l'état de phosphorylation par la PKA soit du canal TRPM8 lui-même, soit de celui d'une protéine partenaire intracellulaire nécessaire à l'activité de ce canal.

Conclusion :

Avec cette étude, nous avons démontré une nouvelle voie de régulation du récepteur au froid TRPM8. Les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone) inhibent spécifiquement TRPM8 par un mécanisme non génomique impliquant un récepteur membranaire couplé aux protéines Gi ainsi que l'inhibition de la voie de transduction intracellulaire adénylate cyclase(AC)/cAMP/protéine kinase A (PKA) en déplaçant la courbe d'activation voltage-dépendante du canal vers des potentiels dépolarisés. Nous avons vérifié la pertinence de cet effet androgénique sur l'activité du canal dans les neurones sensoriels de ganglions rachidiens dorsaux de rat. Des tests *in vivo* démontent que cette régulation non génomique de TRPM8 serait responsable de la variabilité interindividuelle de la sensibilité au froid.

II. Article 2

TRPM8 regulation by alpha2A adrenoreceptors

Alexis Bavencoffe, Dimitra Gkika, Artem Kondratskyi, Benjamin Beck, Anne-Sophie Borowiec, Gabriel Bidaux, Jérôme Busserolles, Alain Eschalier, Yaroslav Shuba, Brigitte Mauroy, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

Article en révision au sein de The Journal of Biological Chemistry (MS ID#: JBC/2009/069377)

Nous avons, avec ce travail, mis en évidence une seconde voie de régulation inhibitrice de TRPM8 par les récepteurs alpha2A adrénergiques, suite à leur stimulation par un de leurs agonistes, la clonidine. Comme pour notre premier article, la voie Gi/AC/cAMP/PKA est mise à profit. Nous y décortiquons le rôle de la PKA dans cette inhibition. Enfin nous confirmons nos observations dans un modèle physiologique, à savoir les neurones sensoriels de ganglions rachidiens dorsaux de rat.

Les données de la littérature décrivent abondamment le rôle de TRPM8 en tant que récepteur au froid au niveau des neurones sensoriels (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Plusieurs études se sont intéressées à expliciter les sites d'action ou les modes d'activation de la température, du menthol et de l'iciline pour ce canal (Bandell et al., 2006; Brauchi et al., 2006; Chuang et al., 2004; Voets et al., 2004a). Néanmoins jusqu'ici, aucun n'article ne décrit la régulation du canal TRPM8 par les récepteurs couplés aux protéines G ainsi que par des neuromodulateurs.

Dans cette étude nous nous sommes penchés sur la modulation de l'activité de ce canal par les récepteurs alpha2A adrénergiques. Nous avons choisi ce candidat pour plusieurs raisons :

- 1) Les données de la bibliographie sur l'allodynie au froid démontrent une surexpression, dans les neurones sensoriels de modèles de lésions de nerfs périphériques (modèle de rats CCI), du canal TRPM8 (Proudfoot et al., 2006; Xing et al., 2007) mais également du récepteur alpha2A adrénergique (Birder and Perl, 1999).
- 2) La clonidine, un agoniste (utilisé en clinique) des récepteurs adrénergiques alpha2A,

exerce une action analgésique (Eisenach et al., 1996).

- 3) Si les conséquences physiopathologiques de la surexpression de TRPM8 font débat (soit une hyperexcitabilité des neurones sensoriels à l'origine soit du phénomène d'allodynie au froid pour Xing *et coll.* soit une action analgésique pour Proudfoot *et coll.* (Proudfoot et al., 2006; Xing et al., 2007)), plusieurs travaux reportent un rôle important des récepteurs alpha2A adrénergiques dans l'analgésie suite à des lésions de nerfs. Cette classe de récepteurs est également impliquée dans la thermorégulation (Hocker et al., 2008).
- 4) Les récepteurs adrénergiques alpha2A sont couplés aux protéines Gi (Ramos et al., 2006). De ce fait, il était possible d'imaginer que leur activation aurait, tout comme dans le premier article, pour conséquence une inhibition de TRPM8, ce qui aurait pu expliquer le rôle analgésique de ces récepteurs au cours de l'allodynie au froid.

Au vu de toutes ces données, nous avons voulu savoir s'il existait une possible régulation de l'activité de TRPM8, au niveau sensoriel, par les récepteurs alpha2A adrénergiques.

L'activation des récepteurs alpha2A adrénergiques inhibe l'activité de TRPM8

Nous avons transfecté le modèle cellulaire HEK-293_{M8} avec l'adrénorécepteur alpha2A. Suite à la stimulation de ces récepteurs par la clonidine, nous avons enregistré une inhibition de l'activité du canal TRPM8 en présence de chacun des trois activateurs classiques de ce dernier (froid, menthol et iciline).

Les récepteurs alpha2A adrénergiques inhibent TRPM8 non pas par une voie Gq/PLC mais par une voie Gi/AC/cAMP/PKA

Les récepteurs alpha2A adrénergiques peuvent être couplés à la fois aux protéines Gi (Ramos et al., 2006) mais aussi aux protéines Gq (Conklin et al., 1992). Par l'utilisation d'outils pharmacologiques pour ces deux types de protéines G ainsi que de protéines Gi mutées afin d'être soit constitutivement actives soit constitutivement inactives, nous avons démontré que la stimulation par la clonidine de ces récepteurs entraîne l'inhibition de TRPM8 via l'activation de protéines Gi.

Nous avons ensuite utilisé la même approche pharmacologique que celle employée dans le premier article. Nous avons alors montré que l'inhibition de TRPM8 par la clonidine fait suite à l'activation des protéines Gi, l'inhibition de l'adénylate cyclase et, de part la diminution de la concentration intracellulaire en cAMP, la chute de l'activité de la PKA.

L'inhibition de TRPM8 est due à une diminution de sa phosphorylation PKA-dépendante

A ce stade, nous étions arrivé à la même conclusion que pour le premier article, à savoir que l'approche pharmacologique employée dans un premier temps ne permettait pas de discriminer entre deux possibles explications de l'effet inhibiteur de la clonidine sur TRPM8 : 1) le canal TRPM8 nécessite d'être phosphorylé en des sites précis par la PKA pour avoir une activité optimale ou 2) la PKA phosphoryle un partenaire intracellulaire qui, alors actif, régule positivement l'activité de TRPM8. Pour ce faire, nous avons tout d'abord déterminé, *in silico*, cinq sites putatifs de phosphorylation de TRPM8 par la PKA : Ser9 (Sérine), Thr17 (Thréonine), Thr32, Ser121 et Ser367. Nous avons ensuite adopté une stratégie de mutagenèse dirigée en créant, pour chacun des cinq sites, deux types de mutants :

- ✓ soit des protéines mutées constitutivement phosphorylées en substituant un acide aspartique en lieu et place de la sérine ou de la thréonine du site d'intérêt,
- ✓ soit des protéines mutées non phosphorylables en substituant, sur ce même site, une alanine.

Grâce à ces mutants, nous avons identifié deux sites de phosphorylation par la PKA sur TRPM8 importants pour l'activité du canal, à savoir les sites S9 et T17. Les deux mutants constitutivement phosphorylés en ces deux sites ne sont plus sensibles à la clonidine. Nous en avons déduit que la clonidine, en activant les récepteurs alpha2A adrénergiques, aboutit à l'inhibition de TRPM8 par, à la fois, une diminution de la phosphorylation du canal en S9 et T17 par la PKA alors inactive et par la déphosphorylation de celui-ci en ces sites par la PP2A (sérine/thréonine protéine phosphatase 2A).

Confirmation de l'effet inhibiteur de la clonidine par les récepteurs alpha2A adrénergiques au sein des neurones sensoriels

Nous avons également constaté cette inhibition de l'activité du récepteur au froid TRPM8 par la clonidine dans les neurones sensoriels fraîchement isolés de DRG de rat qui expriment de manière endogène ces récepteurs.

Conclusion :

Dans cet article nous avons mis en évidence une nouvelle voie de régulation du canal TRPM8 par les récepteurs alpha2A adrénergiques. Ces récepteurs étant couplés aux protéines Gi, nous démontrons que la clonidine en se fixant sur ces récepteurs entraîne l'arrêt de la voie de signalisation intracellulaire AC/cAMP/PKA et l'inhibition de l'activité du canal TRPM8. Nous démontrons également que la PKA phosphoryle TRPM8 en positions S9 et T17 afin que le canal soit actif. Nous avons enfin confirmé cette inhibition de TRPM8 par la voie alpha2A adrénergique dans les neurones sensoriels de DRG de rat.

Nos résultats, au vue des données de la bibliographie, suggèrent une explication de l'effet analgésique des adrénorécepteurs alpha2A et de leur agoniste clinique, la clonidine, lors de l'allodynie au froid suite à des lésions de nerfs périphériques comme observé dans le modèle CCI.

III. Article 3

Régulation du canal TRPM8 par les récepteurs muscariniques

Alexis Bavencoffe, Dimitra Gkika, Anne-Sophie Borowiec, Brigitte Mauroy, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

Article en préparation

Dans cette étude nous avons continué notre travail d'exploration des voies de transductions intracellulaires pouvant moduler l'activité de TRPM8 et impliquant des récepteurs membranaires aux neuromodulateurs, couplés aux protéines G. Nous montrons ici à la fois une nouvelle voie intracellulaire de régulation de TRPM8 ainsi qu'une nouvelle classe de modulateurs de ce canal, les agonistes des récepteurs muscariniques.

Dans les deux premiers articles de cette partie, nous avons démontré que le canal TRPM8 était régulé par les protéines Gi et la voie de transduction AC/cAMP/PKA à laquelle elles sont couplées négativement. Il est d'autre part connu que ce canal est également régulé par le PIP2 (donc par la voie Gq/PLC) (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005) ainsi que par la iPLA2 (Vanden Abeele et al., 2006). Nous étions donc intéressés par les modulations physiologiques de ces voies de régulation de TRPM8. De ce point de vue, la famille de récepteurs muscariniques s'est avérée intéressante à explorer du fait que les différents sous-types de cette famille de récepteurs sont couplés à différentes protéines G. La famille des récepteurs muscariniques comprend 5 sous-types nommés M1, M2, M3, M4 et M5 (pour revue (Caulfield and Birdsall, 1998)). Les sous-types M1/M3/M5 sont couplés aux protéines Gq alors que les M2 et M4 sont, quant à eux, couplés aux Gi (pour revue (Lanzafame et al., 2003)).

Au vue des données de la bibliographie, nous avons émis différentes hypothèses en ce qui concerne les mécanismes de régulation de TRPM8 par cette classe de récepteurs :

Hypothèse 1 : Comme les récepteurs M2 et M4 s'avèrent couplés aux protéines Gi (Sunahara et al., 1996), nous avons alors supposé que leur activation pourrait entraîner l'inhibition de l'activité de TRPM8 par la même voie que celle décrite pour les récepteurs alpha2A adrénergiques et la clonidine (Gi/AC/cAMP/PKA).

Hypothèse 2 : Puisque les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés à la voie Gq/PLC β (Exton, 1996) et en se basant sur le fait que :

- ✓ la stimulation de la PLC β par les protéines Gq a pour conséquence la dégradation du *pool* de PIP2 intracellulaire (Smrcka et al., 1991),
- ✓ le PIP2 est un régulateur intracytoplasmique de TRPM8 dont l'hydrolyse entraîne une diminution drastique de l'activité du canal (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005),

nous avons pensé que l'activation de ces trois sous-types de récepteurs muscariniques pourrait engendrer une inhibition du canal TRPM8.

Hypothèse 3 : Comme il a été montré que ces mêmes sous-types (M1, M3 et M5) peuvent être également couplés à la voie PLA2 (Conklin et al., 1988) et que :

- ✓ d'une part, d'autres études, dans les HEK-293 surexprimant le récepteur M3 ou dans les neurones des ganglions cervicaux supérieurs de rat exprimant le récepteur M1, démontrent que la stimulation de ce type de récepteurs a pour effet la production d'acide arachidonique (AA) par la PLA2 de type IV calcium-dépendante cytosolique (cPLA2) (Osterhout and Shuttleworth, 2000; Shuttleworth and Thompson, 1998),
- ✓ d'autre part, l'AA a été décrit comme un régulateur intracellulaire négatif de l'activité du canal TRPM8 (Andersson et al., 2007),

nous avons pensé que la stimulation de ces récepteurs, via l'activation de la cPLA2 et la production d'AA, ait pour conséquence l'inhibition de TRPM8.

Nous avons travaillé sur ces différentes possibilités en utilisant une approche pharmacologique couplée à une étude électrophysiologique dans les cellules HEK-293 surexprimant TRPM8.

Profil d'expression des récepteurs muscariniques dans la lignée HEK-293 surexprimant TRPM8

Une étude précédente réalisée par Takezawa et collaborateurs précisait que les cellules HEK-293 exprimaient différents sous-types de récepteurs muscariniques (Takezawa et al., 2004). Nous avons alors, par RT-PCR, regardé le profil d'expression de cette classe de protéines dans la lignée HEK-293 surexprimant TRPM8 (figure 27). Comme on peut le voir, mis à part le récepteur M2, les différents sous-types de récepteurs muscariniques sont représentés dans ce modèle cellulaire.

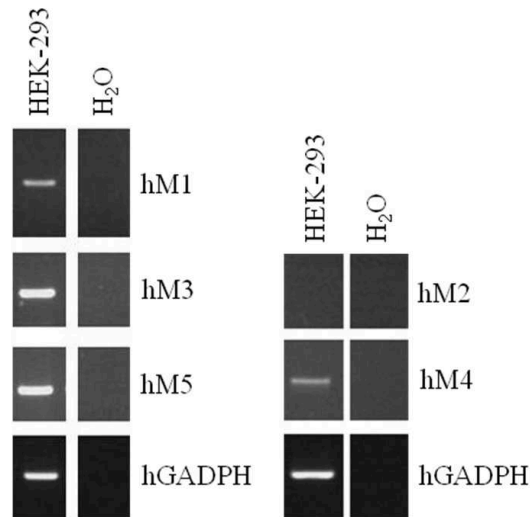


Figure 27 : Profil d'expression des récepteurs muscariniques dans la lignée HEK-293 surexprimant TRPM8.

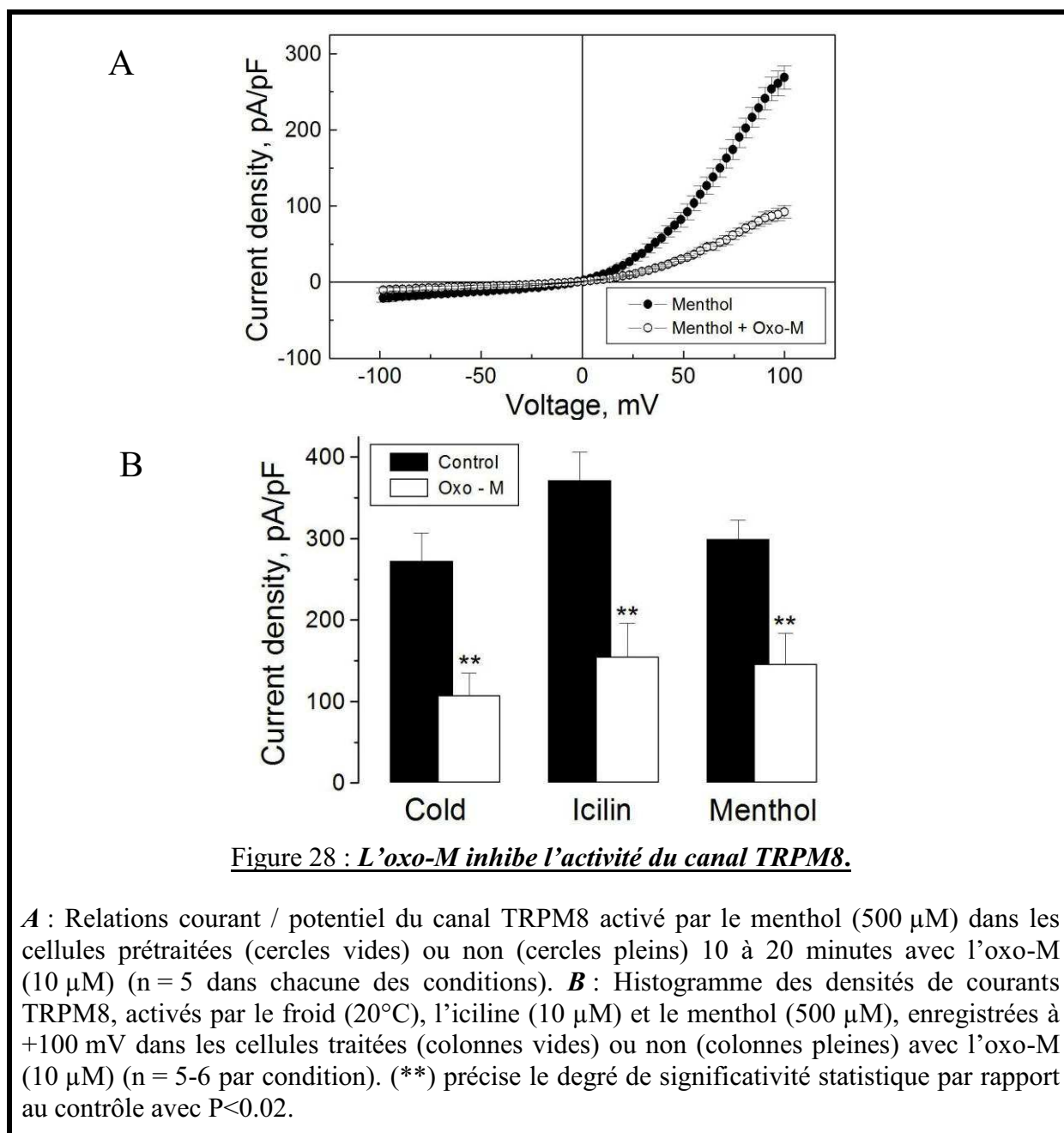
Analyse des résultats de RT-PCR des récepteurs muscariniques hM1, hM2, hM3, hM4 et hM5 (h : humain) dans la lignée HEK-293 surexprimant TRPM8. La hGADPH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase humaine) sert de contrôle.

La stimulation des récepteurs muscariniques entraîne une inhibition de TRPM8

Nous avons ensuite réalisé des prétraitements de 10 à 20 minutes avec de l'oxotrémorine méthiodide (10 μ M, oxo-M), un agoniste muscarinique qui ne discrimine pas entre les différents sous-types de récepteurs. De telles préincubations ont pour effet une diminution drastique aussi bien de l'activité du canal TRPM8 en présence de menthol (500 μ M) (figure 28A) que des courants TRPM8 induits par le froid (20°C) et l'iciline (10 μ M) (figure 28B).

Nous avons ensuite voulu démontrer que cet effet de l'oxo-M est bien porté par les récepteurs muscariniques. Il est connu que la stimulation des récepteurs couplés aux protéines Gq entraîne l'activation de la voie suivante : Gq \rightarrow PLC β \rightarrow production d'IP₃ \rightarrow activation du récepteur IP₃ réticulaire \rightarrow vidange des stocks calciques réticulaires \rightarrow activation des canaux SOC membranaires \rightarrow augmentation du calcium intracellulaire. La stimulation par l'acétylcholine des récepteurs muscariniques couplés aux protéines Gq ne déroge pas à ce schéma (Berridge, 1993). Nous avons donc, en imagerie calcique, appliqué l'oxo-M sur les cellules HEK-293 contrôles, exprimant ces récepteurs muscariniques, et observé effectivement une augmentation drastique et transitoire du calcium cytoplasmique (figure 29A). Cette élévation du calcium intracellulaire étant totalement annihilée en présence d'atropine (1 μ M), un inhibiteur des récepteurs muscariniques, nous en déduisons que l'oxo-M, dans ces cellules, remplit bien son rôle d'agoniste muscarinique. Nous n'avons pas réalisé

ce test sur les cellules HEK-293 surexprimant TRPM8 afin d'éviter toutes interactions possibles entre l'oxo-M et TRPM8.



Pour aller plus loin, nous montrons que l'atropine réverse totalement l'effet inhibiteur de l'oxo-M sur le courant TRPM8 induit par le menthol (figure 29B) dans les cellules HEK-293 surexprimant TRPM8. Nous en concluons donc que l'oxo-M inhibe le canal TRPM8 par stimulation des récepteurs muscariniques endogènes des cellules HEK-293 surexprimant TRPM8.

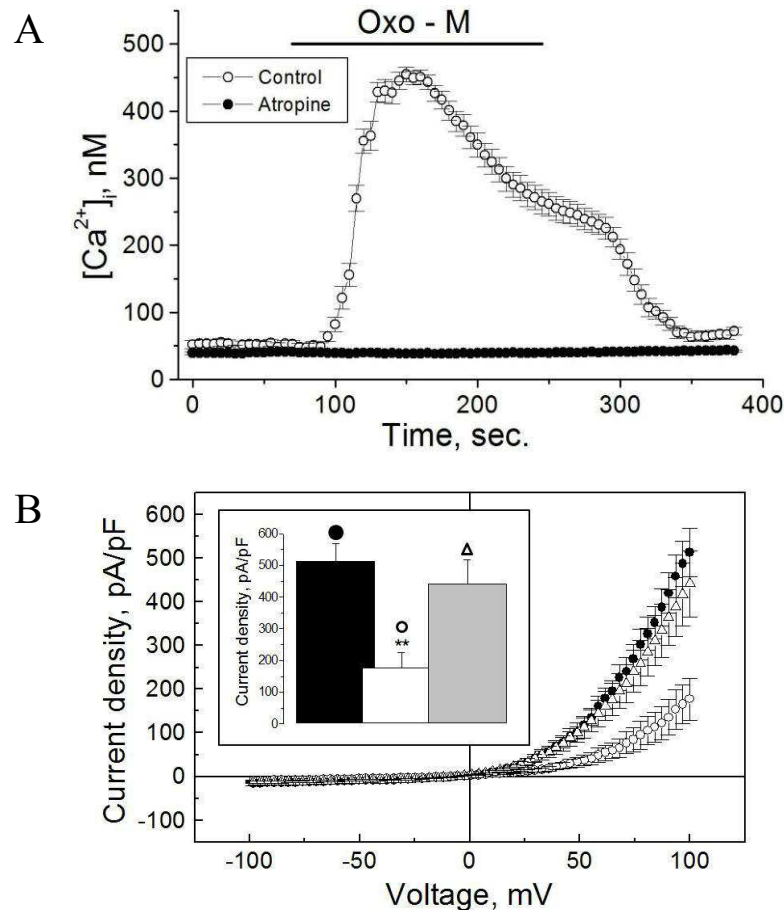


Figure 29 : L'inhibition de TRPM8 par l'oxo-M implique bien les récepteurs muscariniques.

A : Réponses calciques des cellules HEK-293 non transfectées avec TRPM8 suite à une stimulation avec l'oxo-M en présence (cercles pleins) ou non (cercles vides) d'atropine (1 μ M) (n = 20 dans chacune des conditions). **B** : Relations courant / potentiel du canal TRPM8 activé par le menthol dans les cellules HEK-293 surexprimant TRPM8 contrôles (cercles pleins) et traitées avec l'oxo-M en présence (triangles vides) ou non (cercles ouverts) d'atropine (1 μ M). Dans l'encart, l'histogramme des densités de courants à +100 mV correspondantes (n = 5-6 par condition). (**) précise le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec P<0.02.

L'inhibition de TRPM8 par l'oxo-M ne fait pas intervenir les récepteurs couplés aux protéines Gi

Nous avons ensuite tenté de déterminer par quel(s) mécanisme(s) cet agoniste muscarinique engendre une inhibition de l'activité du canal TRPM8 dans le modèle cellulaire HEK-293 surexprimant TRPM8. Nous avons tout d'abord envisagé l'hypothèse n°1 décrite précédemment. De la même manière que dans les deux premiers articles de la partie « Résultats », nous avons effectué des prétraitements sur la nuit avec la toxine pertussique

(500 ng/ml), un inhibiteur des protéines Gi. Cette dernière ne réverse en aucun cas l'inhibition exercée par l'oxo-M, comme l'illustre la figure 30, sur les courants induit par le menthol et la température. Les sous-types M2 et M4, couplés aux protéines Gi, ne semblent donc pas prendre part à cet effet inhibiteur de l'oxo-M sur l'activité de TRPM8.

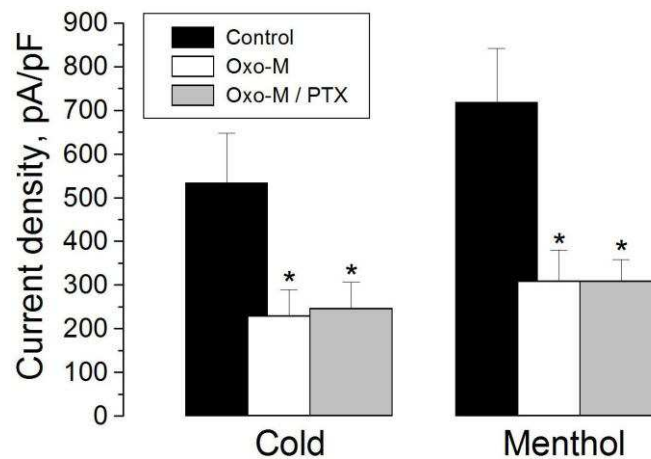


Figure 30 : *Le mécanisme de transduction de l'oxo-M aboutissant à l'inhibition de TRPM8 n'implique pas les protéines Gi.*

Quantification des densités de courants TRPM8, activé par le menthol et le froid, à +100 mV dans les cellules contrôles (colonnes pleines), traitées avec l'oxo-M seul (colonnes vides) ou ayant subies une pré-incubation supplémentaire sur la nuit avec la toxine pertussique (PTX, 500 ng/ml, colonnes grises) (n = 7 par condition). (*) précise le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec P<0.05.

La voie Gq/PLCβ n'est pas mise à contribution lors de l'inhibition de TRPM8 induite par l'oxo-M

Afin de savoir si la voie Gq/PLCβ est impliquée dans cet effet, nous avons réalisé de courtes préincubations des cellules traitées avec l'oxo-M avec un inhibiteur de la PLCβ, l'U73122 (1 μM). Comme on peut le constater sur la figure 31, l'U73122 n'a pas d'effet, quelque soit le type de courant TRPM8, sur le prétraitement avec l'agoniste muscarinique. L'hypothèse n°2 décrite au début de cet article n'est donc pas, non plus, envisageable.

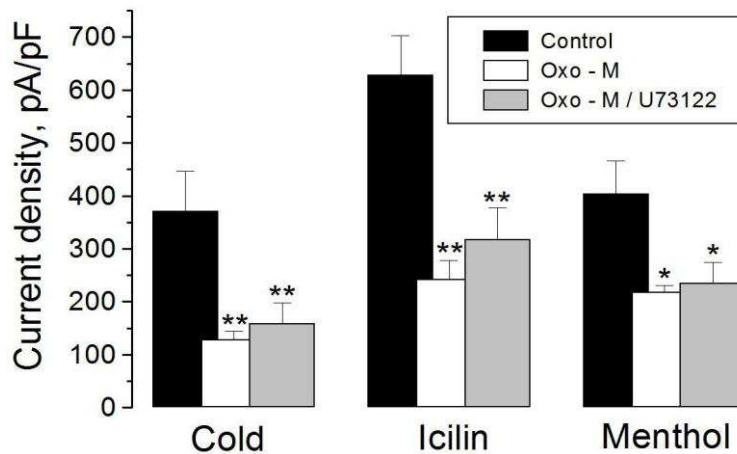


Figure 31 : *Les protéines Gq ne sont pas non plus impliquées dans l'inhibition de TRPM8 par l'oxo-M.*

Histogramme des densités de courants TRPM8, activés par le froid, l'iciline et le menthol, enregistrées à +100 mV dans les cellules contrôles (colonnes pleines), dans les cellules traitées avec l'oxo-M uniquement (colonnes vides) ou ayant subi une incubation supplémentaire de quelques minutes avec l'U73122 (1 μ M, colonnes grises) (n = 5-7 par condition). Pour chaque graphique (*), (**) précisent le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec $P < 0.05$ et $P < 0.02$ respectivement.

L'inhibition de l'activité de TRPM8 par l'oxo-M passe par une voie cPLA2/AA

Nous avons émis une dernière hypothèse qui impliquait une possible régulation muscarinique de TRPM8 via l'activation de la PLA2 et la production d'acide arachidonique. Dans cette optique nous avons tout d'abord vérifié que l'acide arachidonique (AA) inhibait le canal TRPM8 dans notre modèle cellulaire. Un prétraitement de 15 minutes avec l'AA (10 μ M) entraîne effectivement une diminution de $45 \pm 7\%$ du courant TRPM8 induit par le menthol (figure 32). Nous avons ensuite utilisé un inhibiteur de la PLA2, l'arachidonyl trifluorométhyl kétone (AACOCF3). Une pré-dialyse des cellules HEK-293 surexprimant TRPM8 avec la solution intrapipette contenant l'AACOCF3 (50 μ M) reverse l'inhibition oxo-M-dépendante du canal TRPM8 activé par le menthol et l'iciline (figure 33A). La dialyse d'AACOCF3 n'a pas d'effet sur le courant TRPM8 dans les cellules non traitées avec l'oxo-M (résultat non représenté).

L'AACOCF3 ne permet pas de discriminer totalement entre les différents types de PLA2. Certains travaux démontrent l'implication de la cPLA2 dans la production d'AA suite à une stimulation muscarinique (Liu et al., 2006; Osterhout and Shuttleworth, 2000; Shuttleworth and Thompson, 1998). Nous avons alors transfecté nos cellules avec soit des siARN anti-cPLA2 soit des siARN anti-fluoresceine (servant de contrôle). Comme le montre la figure

33B, les siARN anti-cPLA2 annulent totalement l'effet inhibiteur de l'oxo-M sur les courants TRPM8 activés par le froid, le menthol et l'iciline.

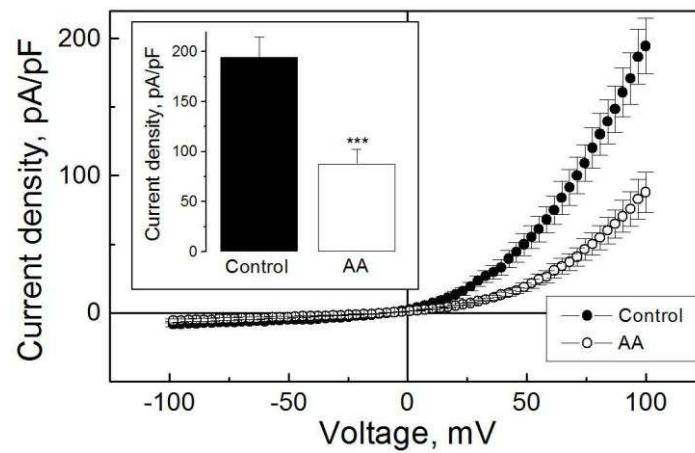


Figure 32 : *L'acide arachidonique inhibe TRPM8.*

Relations courant / potentiel du canal TRPM8 activé par le menthol dans les cellules contrôles (cercles pleins) ou préincubées 15 minutes avec l'AA (10 μ M, cercles vides). Dans l'encart, l'histogramme des densités de courant à +100 mV correspondantes (n = 8-9 par condition). (***) précise le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec $P < 0.01$.

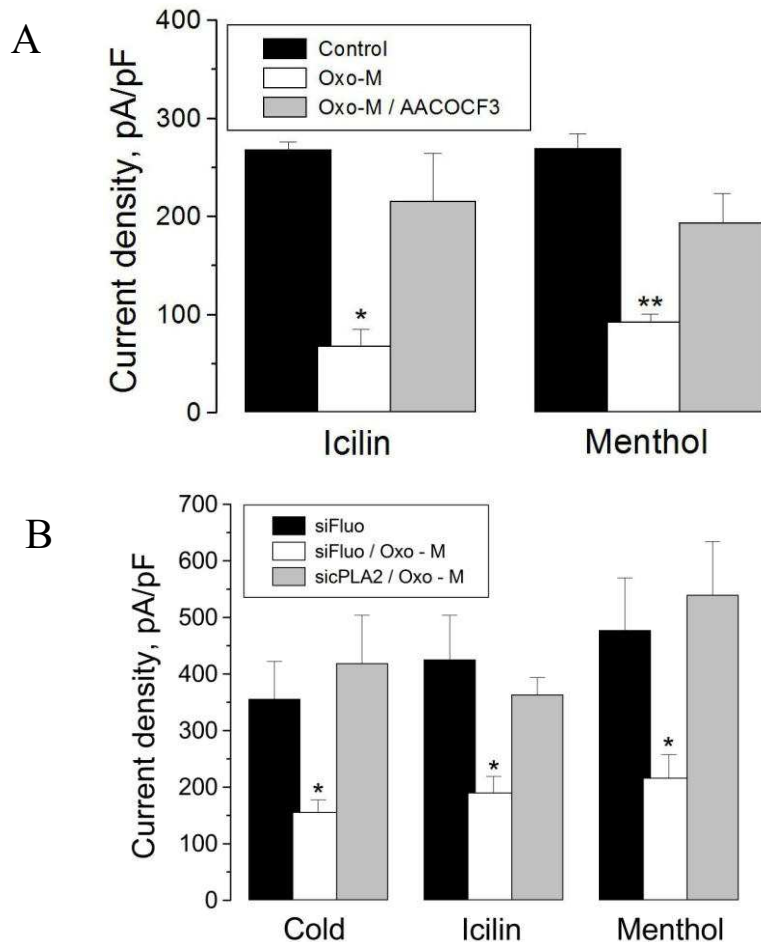


Figure 33 : *Le mécanisme de transduction de l'oxo-M aboutissant à l'inhibition de TRPM8 implique l'activation de la cPLA2.*

A : Histogramme des densités de courants TRPM8, activés par l'iciline et le menthol, enregistrées à +100 mV dans les cellules contrôles (colonnes pleines) dans les cellules traitées uniquement avec l'oxo-M (colonnes vides) ou étant dialysées en plus avec de l'AACOCF3 (50 μ M, colonnes grises) (n = 5 par condition). **B** : Quantification des densités de courants TRPM8, activés par le froid, le menthol et l'iciline, à +100 mV dans les cellules transfectées avec le siARN anti-fluoresceine (siFluo) traitées (colonnes vides) ou non (colonnes pleines) avec l'oxo-M et dans les cellules transfectées avec le siARN anti-cPLA2 (sicPLA2) et traitées avec l'oxo-M (colonnes grises) (n = 6-9 par condition). Pour chaque graphique (*), (**) et (***) précisent le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec $P < 0.05$, $P < 0.02$ and $P < 0.01$ respectivement.

Conclusion :

Nos résultats démontrent donc que l'effet de cet agoniste muscarinique, oxo-M, dans le modèle cellulaire HEK-293 surexprimant TRPM8, sur l'activité du canal est dû à l'activation de la cPLA2 et la production d'acide arachidonique indépendamment d'une voie Gi ou Gq/PLC β -dépendante.

IV. Article 4

Régulation complexe du canal cationique TRPM8 au sein des cellules épithéliales prostatiques : implication de ce canal ainsi que de sa régulation androgénique non génomique dans la migration cellulaire

Alexis Bavencoffe, Dimitra Gkika, Anne-Sophie Borowiec, Brigitte Mauroy, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

Article en préparation

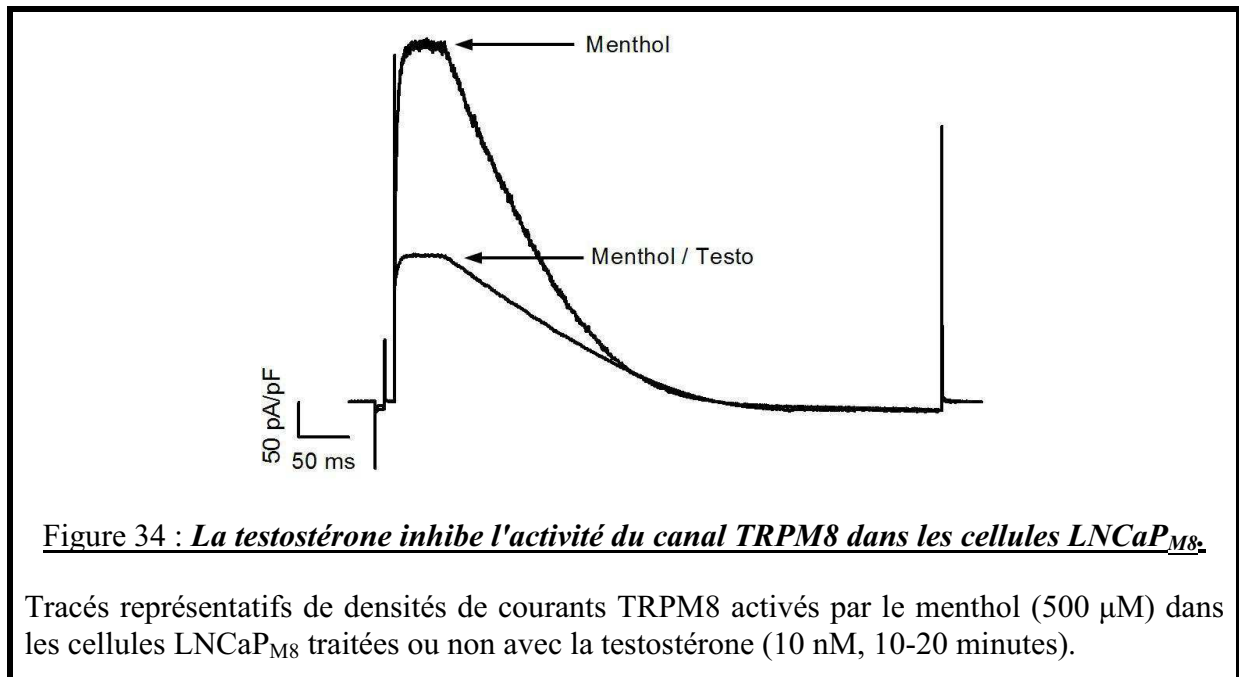
Ce quatrième travail propose une étude de l'impact des voies de modulation des récepteurs muscariniques, alpha2A adrénergiques et aux androgènes non génomiques sur l'activité du canal TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques. Le rôle de ces voies de régulation concernant la migration cellulaire est étudié dans les cellules cancéreuses prostatiques PC-3.

Comme décrit en introduction, le canal TRPM8 est exprimé dans les cellules épithéliales apicales prostatiques. Nous avons choisi, dans un premier temps, de travailler sur des cellules de lignées cancéreuses prostatiques exprimant ou non le récepteur aux androgènes, respectivement les lignées LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) et PC-3 (*Prostate Carcinoma*), toutes deux transfectées avec le gène *trpm8* (LNCaP_{M8} et PC-3_{M8}). Le modèle LNCaP_{M8} présentant au niveau plasmique et réticulaire le canal TRPM8 et exprimant le récepteur aux androgènes sera un modèle comparable avec les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes. Le modèle PC-3_{M8}, quant à lui, présentant la double localisation de TRPM8 sans le récepteur aux androgènes, sera un modèle adéquat pour étudier les effets non génomiques, indépendants de ce récepteur intracellulaire aux androgènes.

Les androgènes inhibent le canal TRPM8 dans les cellules LNCaP

Comme observé dans les cellules HEK-293_{M8}, un prétraitement de 10 à 20 minutes avec la testostérone (10 nM) entraîne une inhibition prononcée du courant TRPM8 induit par le menthol (500 µM) dans les cellules LNCaP_{M8} (figure 34). Partant du constat que l'effet rapide des androgènes sur l'activité de TRPM8, mis en évidence dans la premier chapitre, est

également présent dans les cellules prostatiques, nous avons ensuite souhaité savoir si la voie de transduction intracellulaire était la même que celle décrite plus tôt.



Dans cette optique, nous avons d'abord préincubé, sur la nuit, les cellules LNCaP_{M8} avec la toxine pertussique (500 ng/ml), un inhibiteur des protéines Gi/Go. Cette incubation à la PTX reverse effectivement l'inhibition testostérone-dépendante du courant TRPM8 induit par le menthol (figure 35). La voie des protéines Gi semble donc également mise à profit dans ce modèle cellulaire. Pour aller plus loin, nous avons regardé si des modulations de l'activité de l'adénylate cyclase, qui est inhibée par les protéines Gi, peuvent avoir un impact sur l'inhibition de TRPM8 par la testostérone. Un prétraitement de 15 minutes avec le SQ22536 (200 µM), un inhibiteur de l'adénylate cyclase, entraîne une inhibition de $63 \pm 6\%$ du courant menthol (figure 36A). Une préincubation avec la forskoline (10 µM), un activateur de l'adénylate cyclase reverse, quant à elle, totalement l'effet inhibiteur de la testostérone sur le canal TRPM8 activé par le menthol (figure 36B). De ces résultats nous en déduisons que les androgènes, comme dans les neurones sensoriels et les HEK-293_{M8}, inhibent le canal TRPM8 par la même voie Gi/adénylate cyclase.

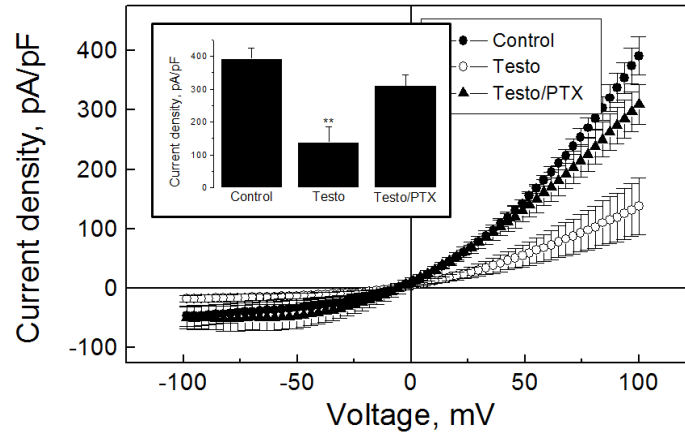


Figure 35 : Les protéines Gi sont bien impliquées dans l'inhibition non génomique de TRPM8 par la testostérone

Relations courant / potentiel du canal TRPM8 activé par le menthol dans les cellules LNCaP surexprimant TRPM8 contrôles (cercles pleins) et traitées avec la testostérone (10 nM) seule (cercles ouverts) ou ayant subi, en plus, une préincubation sur la nuit de toxine pertussique (500 ng/ml, triangles pleins). Dans l'encart, l'histogramme des densités de courants à +100 mV correspondantes (n = 5-7 par condition). (**) précise le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec P<0.02.

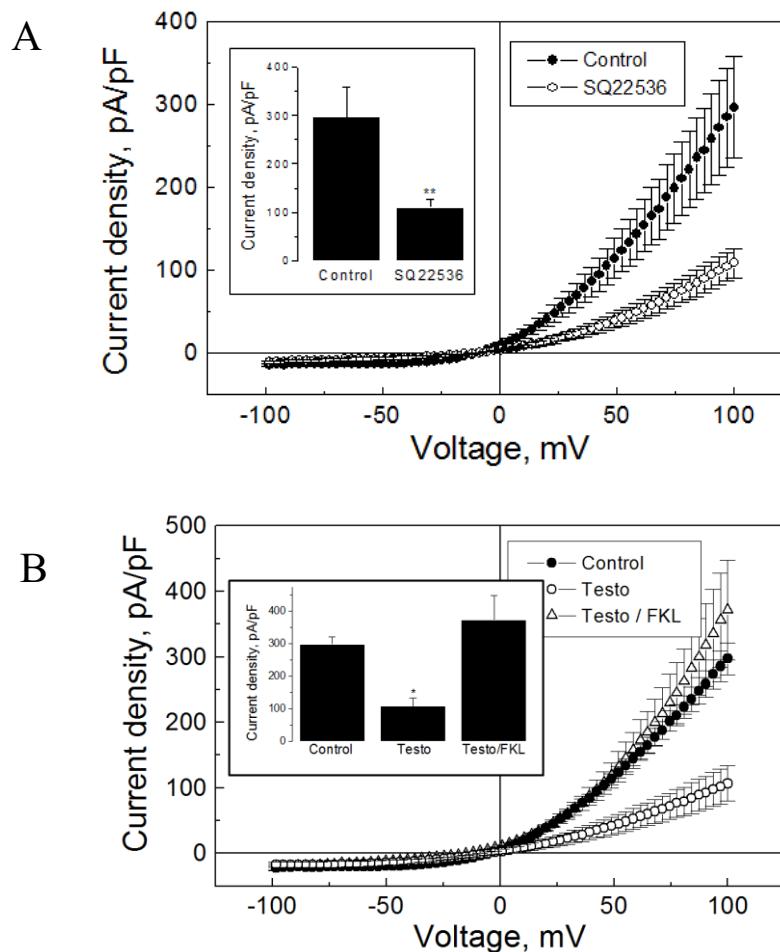


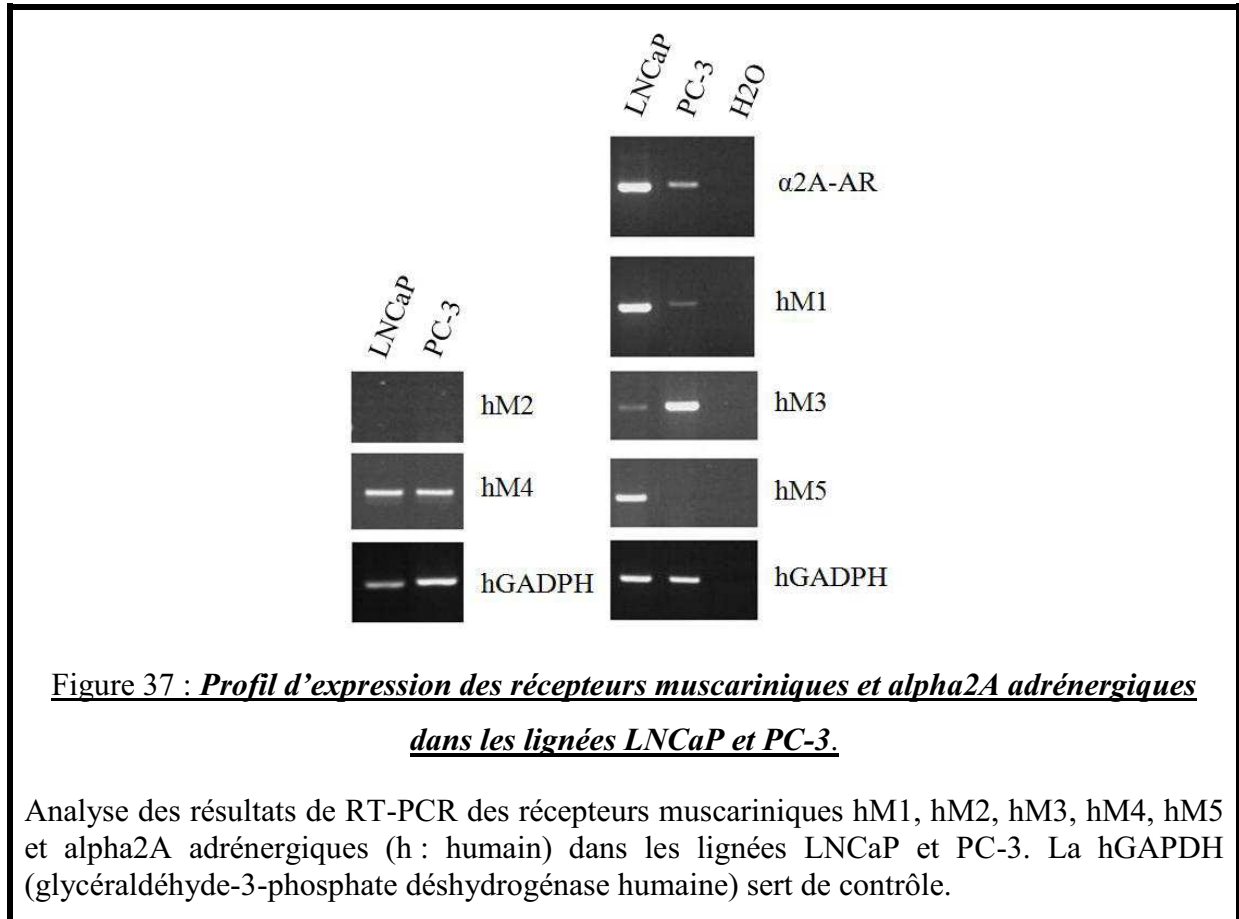
Figure 36 : L'inhibition de l'adénylate cyclase est mise à contribution dans la voie de modulation non génomique de TRPM8 par la testostérone

A: Courbes I/V moyennes enregistrées dans les cellules LNCaP_{M8} traitées (cercles pleins) ou non (cercles vides) avec le SQ22536 (200 μ M, 10 minutes). Dans l'encart, l'histogramme des densités de courants à +100 mV correspondantes (n = 5-6 par condition). **B:** Relations courant / potentiel du canal TRPM8 activé par le menthol dans les cellules contrôles (cercles pleins) et traitées avec la testostérone (10 nM) seule (cercles ouverts) ou avec la forskoline (10 μ M, triangles ouverts). Dans l'encart, l'histogramme des densités de courants à +100 mV correspondantes (n = 5-6 par condition). Pour chaque graphique, (*) et (**) précisent le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec P<0.05 et P<0.02 respectivement.

Le canal TRPM8 est régulé par les récepteurs aux protéines G

Nous avons ensuite désiré savoir si la clonidine, un agoniste des récepteurs α 2A-AR, et l'oxotrémorine-M (oxo-M), un agoniste des récepteurs muscariniques, conservaient leurs effets inhibiteurs sur le courant TRPM8 dans les cellules prostatiques. Nous avons alors, dans un premier temps, étudié le profil d'expression des récepteurs α 2A-AR et muscariniques dans les cellules des lignées prostatiques LNCaP et PC3. Les résultats des RT-PCR réalisées sur

ces deux modèles cellulaires présentés figure 37 montrent que, aussi bien dans les cellules LNCaP que PC-3, le récepteur α 2A-AR est exprimé. Parallèlement, si les récepteurs M1, M3 et M4 sont présents dans les deux lignées, le récepteur M5 n'est exprimé que dans les LNCaP et le récepteur M2 est absent de ces deux types cellulaires.



Les récepteurs α 2A-AR étant exprimés dans les LNCaP, nous avons prétraité les cellules LNCaP_{M8} avec la clonidine (10 μ M) pendant 10-20 minutes. Une telle incubation a bien pour effet une inhibition du canal TRPM8 activé par le froid, l'iciline et le menthol (figure 38A) respectivement de $60 \pm 6 \%$, $51 \pm 11 \%$ et $65 \pm 7 \%$ (figure 38B).

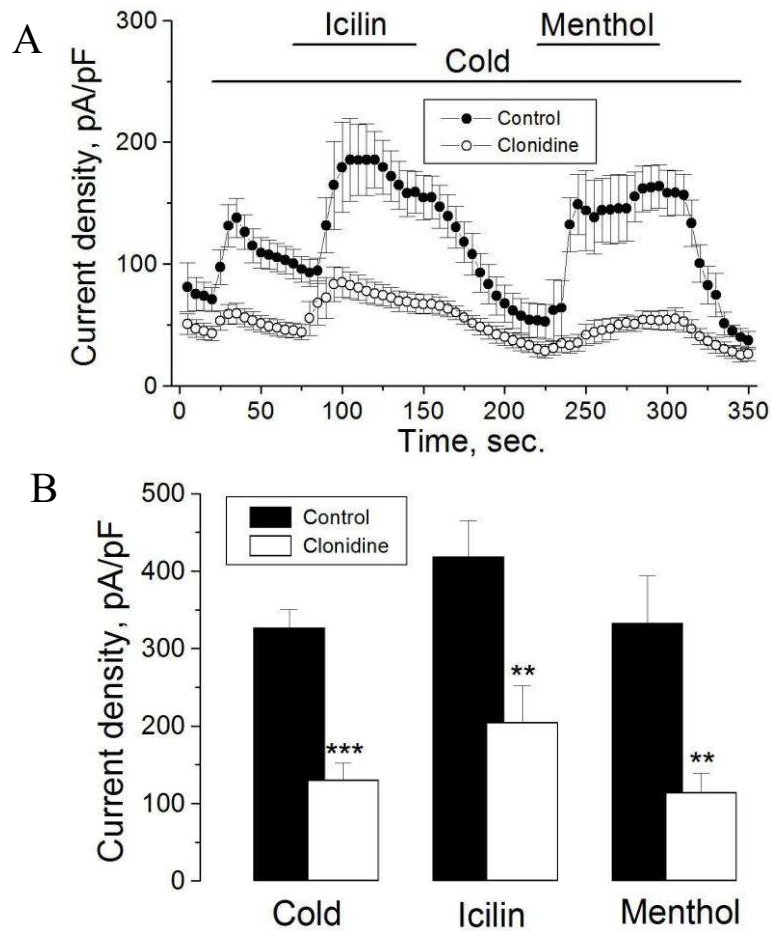


Figure 38 : *La voie alpha2A adrénergique module bien l'activité de TRPM8 dans les cellules prostatiques*

A : Variations en fonction du temps des densités de courants TRPM8 activé successivement par le froid (20°C), l'iciline (10 µM) et le menthol (500 µM) au sein des cellules LNCaP_{M8} contrôles (cercles pleins) ou prétraitées 10-20 minutes avec la clonidine (10 µM, cercles vides) (n = 5 par condition). **B** : Histogramme des densités de courants TRPM8, activés par le froid (20°C), l'iciline (10 µM) et le menthol (500 µM), enregistrées à +100 mV dans les cellules LNCaP_{M8} incubées (colonnes vides) ou non (colonnes pleines) avec la clonidine (10 µM) (n = 5-6 par condition). (**), (***) précisent le degré de significativité statistique par rapport au contrôle avec P<0.02 et P<0.01 respectivement.

Concernant les récepteurs muscariniques et l'impact de leur activation par l'oxo-M sur le canal TRPM8, une incubation des cellules PC-3_{M8} avec cet agoniste muscarinique entraîne bien une inhibition drastique du courant TRPM8 (figure 39).

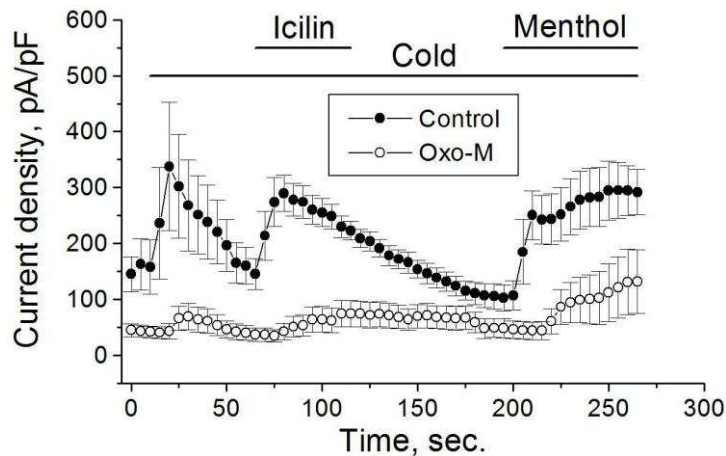


Figure 39 : La régulation muscarinique de TRPM8 est également confirmée dans les cellules prostatiques

Variations en fonction du temps des densités de courants TRPM8 activé successivement par le froid (20°C), l'iciline (10 μ M) et le menthol (500 μ M) au sein des cellules PC-3_{M8} contrôles (cercles pleins) ou prétraitées 10-20 minutes avec l'oxo-M (10 μ M, cercles vides) (n = 5 par condition).

Implication de la régulation androgénique de TRPM8 dans la migration des cellules prostatiques

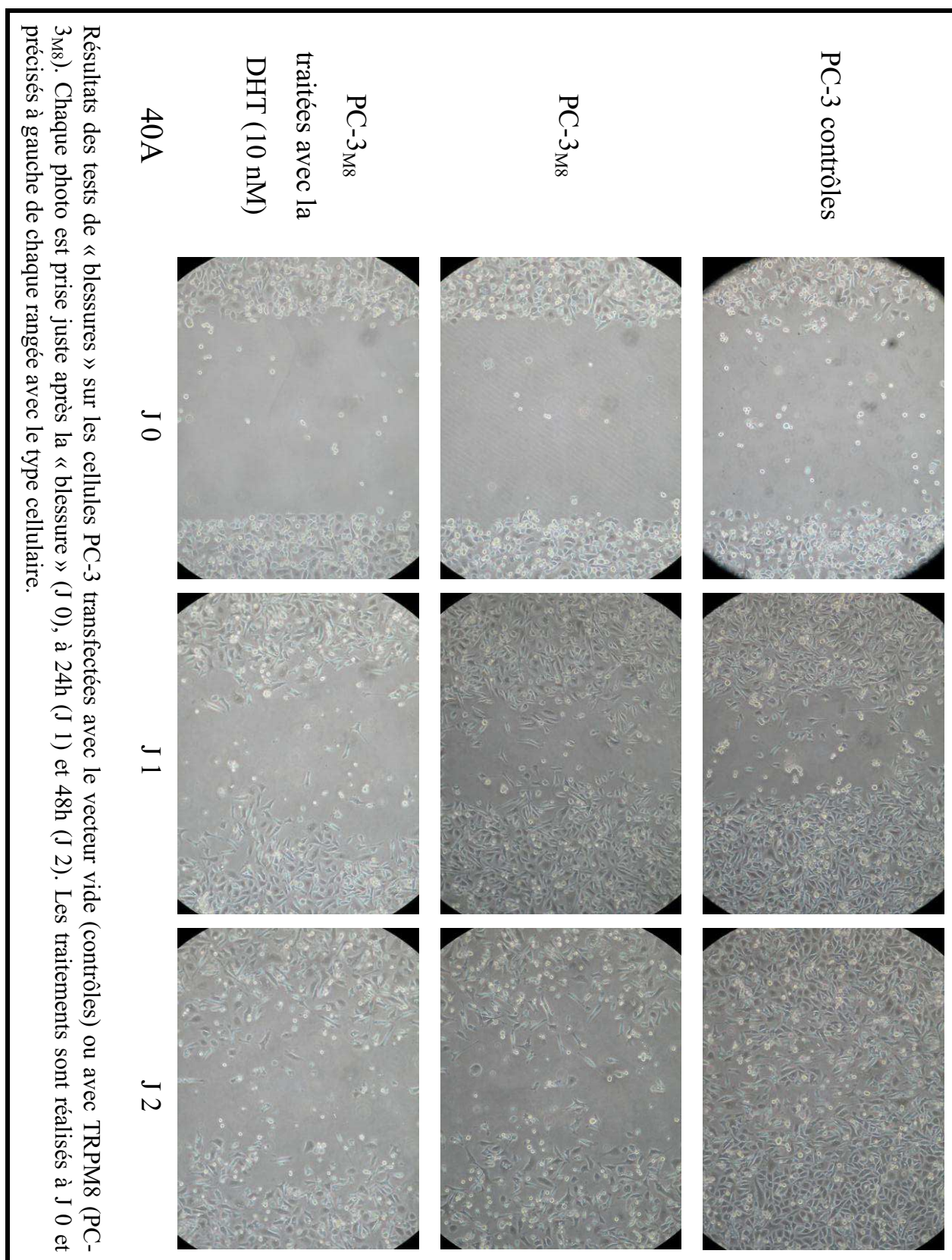
Une récente étude a montré que TRPM8 inhibait la migration des cellules PC-3 (Yang et al., 2009). Les cellules PC-3, lignée prostatique androgéno-indépendante, n'expriment pas le récepteur aux androgènes classique intracellulaire. De ce fait, ce modèle cellulaire s'avère très intéressant pour étudier le rôle de l'inhibition non génomique de l'activité de TRPM8 par les androgènes dans la migration des cellules prostatiques. Si TRPM8 inhibe cette migration, on peut supposer que les androgènes, par leur action non génomique, seraient susceptibles de stimuler cette migration.

Pour connaître l'impact des androgènes sur la migration des cellules PC-3_{M8}, nous avons réalisé des tests de « blessures » consistant à arracher une bande de cellules d'une monocouche cellulaire avec une pointe de cône de pipette P1000. Les cellules migrent alors pour combler la blessure et reconstituer une monocouche confluente. Des photos de l'avancement du retour à la confluence sont prises le jour de la blessure (J 0) ainsi que 24h (J 1) et 48h (J 2) après.

Nous avons dans un premier temps confirmé l'observation faite par Yang *et coll.* (Yang et al., 2009), à savoir que les cellules PC-3_{M8} présentent un taux de migration nettement inférieur à celui des PC-3 transfectées avec le plasmide vide (PC-3 contrôles) (figure 40A). En présence

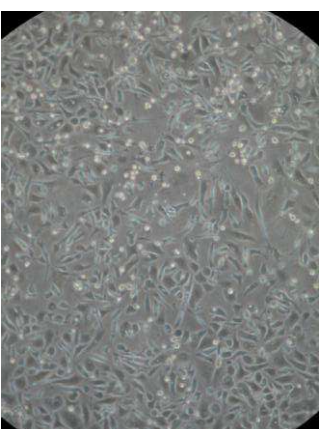
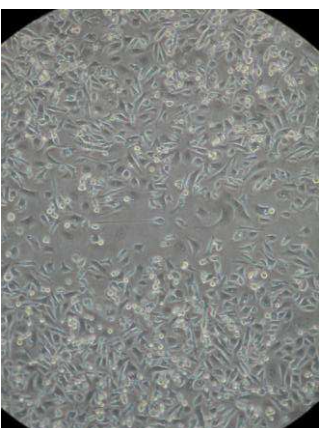
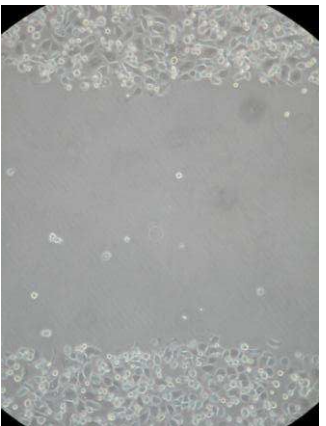
de DHT (10 nM), la migration des cellules PC-3_{M8} n'est pas modifiée par rapport aux cellules PC-3_{M8} non traitées (figure 40A). Par contre, en présence à la fois de DHT et d'iciline (10 µM), les cellules PC-3_{M8} voient leur taux de migration augmenter pour redevenir équivalent à celui observé dans les cellules PC-3 contrôles (transfectées avec le vecteur vide) (figure 40B). Enfin, les cellules PC-3 contrôles en présence de DHT ou d'iciline ne présentent aucune modification de leurs taux de migration par rapport à celles non traitées (figure 40B). Nous en déduisons donc que, comme proposé par les travaux de Yang *et coll.*, TRPM8 diminue bien la migration des cellules PC-3 (Yang et al., 2009). En revanche, le traitement DHT seul n'est pas suffisant pour réinduire une migration normale des cellules : il nécessite la présence d'iciline. Ces résultats seront confirmés par d'autres techniques telles que la technique dite de « *transwell* » reposant sur l'utilisation de chambres de culture poreuses. Des tests concernant une possible implication des récepteurs muscariniques (oxo-M) et/ou des récepteurs alpha2A adrénergiques (clonidine) dans la migration des cellules PC-3_{M8} sont en cours.

Figure 40 : Rôle de TRPM8 et de sa régulation androgénique non génomique dans la migration des cellules de la lignée PC-3.

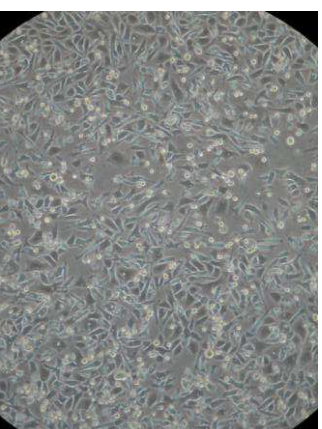
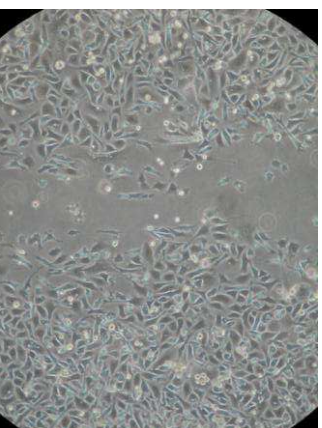
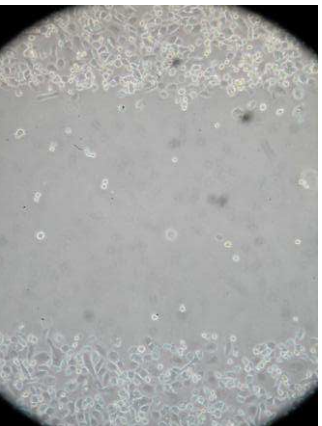


PC-3_{M8}

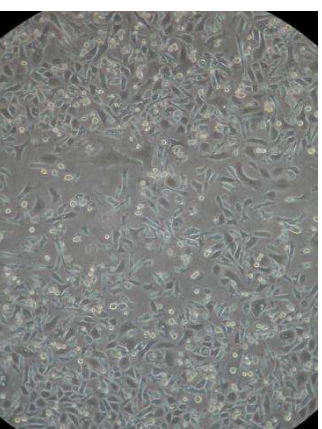
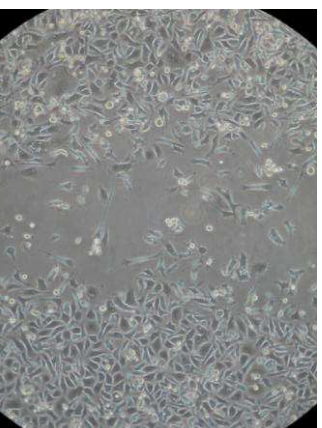
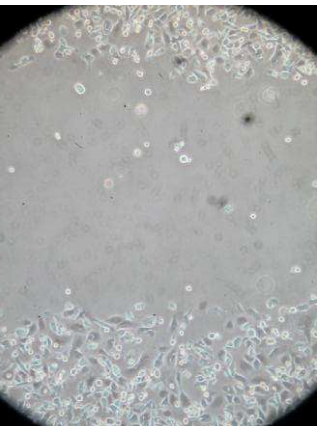
traitées avec la
DHT (10 nM et
l'iciline (10 µM)



PC-3 contrôles
traitées avec
l'iciline (10 µM)



PC-3 contrôles
traitées avec la
DHT (10 nM)



40B

J 0

J 1

J 2

Résultats des tests de « blessures » sur les cellules PC-3 transfectées avec le vecteur vide (contrôles) ou avec TRPM8 (PC-3_{M8}). Chaque photo est prise juste après la « blessure » (J 0), à 24h (J 1) et 48h (J 2). Les traitements sont réalisés à J 0 et précisés à gauche de chaque rangée avec le type cellulaire.

Conclusion :

Au sein des cellules épithéliales prostatiques coexistent trois voies de modulation de l'activité du canal TRPM8 : la voie non génomique des androgènes, la voie α 2A adrénergique ainsi que la voie muscarinique. Le degré d'activité du canal sera donc, à ce niveau, le résultat de toutes ces influences. La régulation du canal TRPM8 au niveau des cellules épithéliales prostatiques s'avère donc un phénomène complexe. Une des applications de ces voies de modulation de TRPM8 a été mise en évidence dans cette étude dans le cadre de la migration des cellules prostatiques. La présence, dans ces dernières, de TRPM8 fait chuter le taux de migration. De nos tests de « blessures » nous observons que la DHT, lorsque le canal a été activé par de l'iciline, permet de restaurer une migration normale par une voie indépendante du récepteur classique intracellulaire aux androgènes.

Au début de ce travail de thèse, les connaissances sur le canal TRPM8 en étaient à leurs débuts. En 2001, Tsavaler *et coll* avaient détecté l'expression de *trp-p8* dans le tissu prostatique humain (Tsavaler et al., 2001). L'année suivante, les groupes de Julius et de Patapoutian ont démontré que TRPM8 était exprimé dans les neurones sensoriels de la moelle épinière où il fonctionnait comme un récepteur au froid (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002a). Ces travaux ont démontré que le canal TRPM8 est activé par la diminution de température (< 28°C) ainsi que par des molécules réfrigérantes telles que le menthol, l'iciline et l'eucalyptol. Du point de vue des modes de régulation de ce canal, seules cinq données étaient publiées :

- l'acidification du pH intracellulaire abolit l'activation iciline- et température-dépendante du canal (Andersson et al., 2004),
- le froid et le menthol activent TRPM8 par déplacement de la courbe d'activation du canal vers des potentiels physiologiques (Voets et al., 2004a),
- le calcium intra- et extracellulaire désensibilise le canal (Chuang et al., 2004; Rohacs et al., 2005; Thut et al., 2003),
- le PIP2 a été identifié en tant que régulateur intracytoplasmique indispensable à l'activité de TRPM8 (Liu and Qin, 2005; Rohacs et al., 2005),
- et l'activation de la PKC, paradoxalement, entraîne une déphosphorylation de TRPM8 diminuant ainsi l'activité de ce dernier (Abe et al., 2006; Premkumar et al., 2005).

De ce fait, au départ de cette thèse aucune information sur l'existence de modulateurs physiologiques de TRPM8, autres que le froid, aussi bien prostatiques que neuronaux n'était disponible.

La stratégie employée a été dans un premier temps de rechercher et d'identifier de nouveaux modulateurs de ce canal ainsi que de décortiquer leurs mécanismes d'action grâce au modèle d'études mécanistiques, la lignée HEK-293_{M8}. Ensuite, nous avons étudié la pertinence des résultats obtenus dans le modèle mécanistique aussi bien dans les neurones sensoriels fraîchement isolés de ganglions rachidiens dorsaux de rat que dans des lignées prostatiques (LNCaP et PC-3).

I. Régulation non génomique de TRPM8 par les androgènes

Partant du constat que plusieurs études ont reporté l'existence d'une variabilité inter-individuelle ainsi que des différences dues à l'âge, au sexe ou à l'hormonothérapie vis-à-vis

de la perception du froid, nous avons émis l'hypothèse que les hormones stéroïdiennes pouvaient avoir un impact sur l'activité du récepteur au froid TRPM8.

Nous avons alors testé en patch-clamp et à des concentrations physiologiques différents stéroïdes et précurseurs. Nous montrons que les androgènes (testostérone et dihydrotestostérone) inhibent l'activité du canal TRPM8 à des concentrations physiologiques (10 nM). Du fait de la rapidité de cet effet, nous nous sommes aiguillés vers une voie « non génomique » de régulation de l'activité de TRPM8 par les androgènes. Nous avons confirmé cet effet aussi bien dans les neurones sensoriels que dans les cellules de la lignée prostatique LNCaP.

Notre étude s'inscrit dans une longue lignée de travaux sur les effets non génomiques des hormones stéroïdiennes. Traditionnellement, ce type d'hormones hydrophobes a pour but de réguler la transcription de gènes. Elles agissent par fixation sur leurs récepteurs intracellulaires. Le couple hormone-récepteur se dimérise, est transloqué dans le noyau et va se fixer sur un élément de réponse au niveau du promoteur du gène cible afin d'en moduler positivement ou négativement l'expression. On parle alors d'effets génomiques des hormones stéroïdiennes (pour revue (Beato et al., 1996)). Ces effets génomiques sont observables au niveau protéique, de ce fait ils ont une cinétique lente, demandant plusieurs heures après stimulation. Il est néanmoins possible de détecter de tels changements dans l'expression de gènes, dans le cas de l'aldostérone, une heure après stimulation (Verrey, 1998).

Parallèlement au développement de cette notion et au clonage des récepteurs intracellulaires aux hormones stéroïdiennes, de très anciennes études reportaient des actions rapides (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes) de ces hormones. La première fut celle de Hans Selye en 1941 qui a observé une réponse anesthésique rapide après injection intrapéritonéale de progestérone (Selye, 1941). Depuis, de plus en plus d'articles paraissent pour décrire de nouveaux effets rapides pour tous les types d'hormones stéroïdiennes.

Un cas bien documenté sur l'influence de ce type d'hormones sur l'activité de canaux ioniques est celui, au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses, de la vasodilatation (figure 41). En effet, au sein des cellules endothéliales, les œstrogènes en se fixant sur leurs récepteurs membranaires ER α activent la voie PI3kinase/Akt qui, elle-même, stimule la production de NO par la eNOS (NO synthase endothéliale). Le NO par diffusion stimule la production de cGMP par la guanylate cyclase des cellules musculaires lisses. Le cGMP à son tour active les canaux potassiques à large conductance BK(Ca) via leur phosphorylation par la PKG (Pour revue (Simoncini and Genazzani, 2003; Simoncini et al., 2004)). D'un autre côté, les œstrogènes activent directement les canaux Maxi-K de la

membrane des cellules musculaires lisses, en interagissant avec la sous-unité β régulatrice de cette classe de canaux potassiques (Valverde et al., 1999). Toujours au niveau de ces cellules musculaires lisses, la progestérone ainsi que les œstrogènes inhibent l'activité des canaux calciques voltage-dépendants de type L alors que la testostérone à la fois inhibe les canaux calciques de type L et active les canaux potassique BK(Ca). A terme, l'activation des canaux potassiques BK(Ca) et Maxi-K et l'inhibition concomitante des canaux calciques voltage-dépendants de type L auront pour effet une vasodilatation (pour revue (Simoncini and Genazzani, 2003)). Cet exemple démontre bien que les hormones stéroïdiennes sont susceptibles de réguler l'activité de canaux ioniques par des voies rapides, non génomiques. Notre étude de l'effet des androgènes sur l'activité du canal TRPM8 s'inscrit dans la même optique.

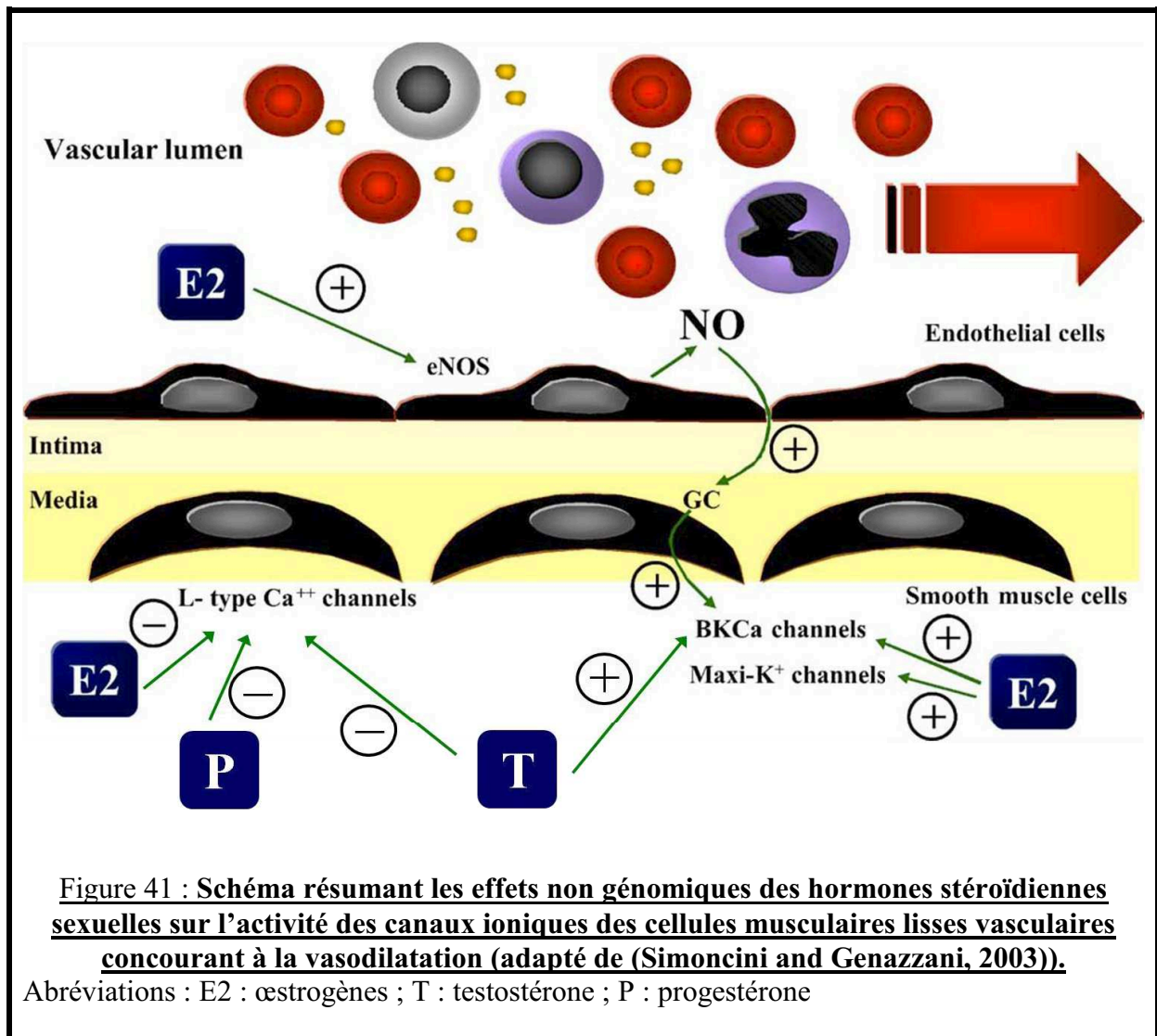


Figure 41 : Schéma résumant les effets non génomiques des hormones stéroïdiennes sexuelles sur l'activité des canaux ioniques des cellules musculaires lisses vasculaires concourant à la vasodilatation (adapté de (Simoncini and Genazzani, 2003)).

Abréviations : E2 : œstrogènes ; T : testostérone ; P : progestérone

Cette action non génomique des hormones stéroïdiennes a également été observée pour trois autres canaux TRP : TRPM3, TRPM6 et TRPV5. Le canal TRPM3, au niveau des cellules β pancréatiques productrices d'insuline, est activé directement par la prégnénone sulfate (Wagner et al., 2008). Cette activation des canaux TRPM3 membranaires augmenterait la sécrétion d'insuline par ces cellules. TRPM6, un canal chanzyme impliqué dans la régulation de l'homéostasie du magnésium, est régulé par les œstrogènes. Ce canal est inhibé par la fixation sur son domaine alpha kinase de la protéine REA (*repressor of estrogen receptor activity*). Un court prétraitement avec les œstrogènes décroche cette protéine REA du canal, activant ainsi TRPM6 (Cao et al., 2009). Enfin, TRPV5 est rapidement activé (< 5min) par les œstrogènes et entraîne la réabsorption du calcium dans le cytoplasme des cellules de l'épithélium rénal (Irnatén et al., 2009).

I. 1. Adéquation de notre effet avec les critères définissant un effet non génomique :

I. 1. a) Les critères

Les effets non génomiques répondent, classiquement, à différents critères (Foradori et al., 2008) :

- Ils sont observés pour des temps de latence incompatibles avec la régulation de l'expression génique (< 1h).
- Ils perdurent en présence d'inhibiteurs de la transcription ou de la synthèse protéique.
- Ils se produisent, tout comme les effets génomiques, pour des concentrations physiologiques de l'hormone d'intérêt. L'application de doses importantes en hormones stéroïdiennes peut perturber la fluidité de la membrane plasmique, engendrer des contraintes physiques à ce niveau et ainsi entraîner l'activation de canaux mécanosensibles de manière non spécifique.
- leurs actions sont circonscrites à la membrane plasmique, c'est-à-dire que les hormones stéroïdiennes interagissent avec des récepteurs enchâssés dans cette membrane. De plus, leurs effets doivent être maintenus lors de l'utilisation de l'hormone d'intérêt couplée à une molécule non perméante afin d'éviter toute action intracellulaire (cytoplasmique et/ou nucléaire) de l'hormone. Un exemple de ce type

d'outil classiquement utilisé dans l'étude des effets non génomiques des androgènes est la testostérone couplée à la BSA (*bovine serum albumine*).

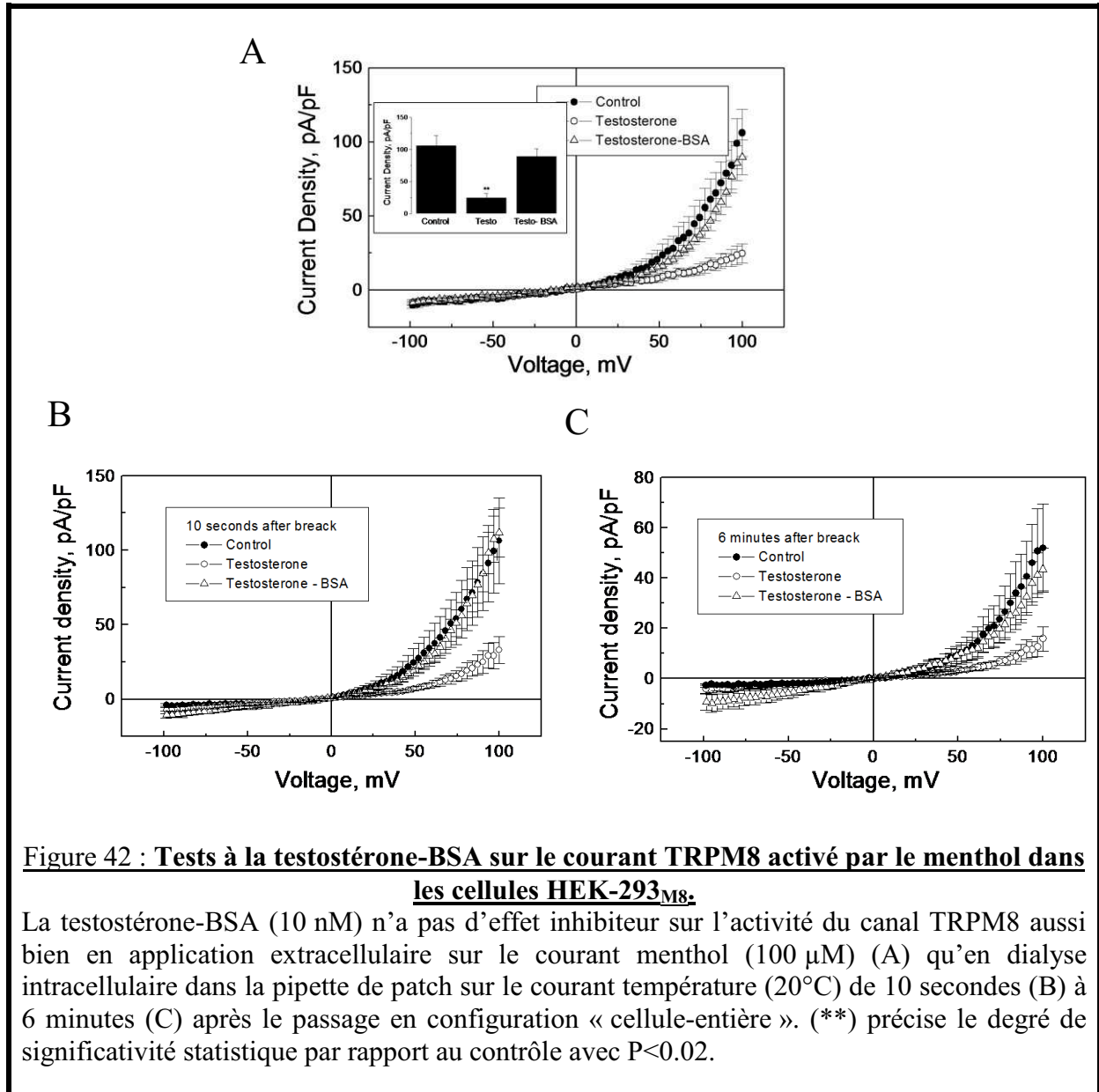
I. 1. b) Concernant les trois premiers critères

Dans le cas de notre étude, l'effet inhibiteur des androgènes est détecté en application directe de testostérone ainsi qu'en prétraitement de 10 minutes ce qui est en tous points compatible avec le premier critère. Nous n'avons pas testé d'inhibiteurs de la synthèse protéique. Néanmoins, nous avons montré qu'au niveau des neurones sensoriels de DRG, l'orchidectomie ainsi que la greffe d'implants de testostérone n'influencent pas la transcription de TRPM8. L'expression de TRPM8 dans ces cellules nerveuses, à la différence des cellules épithéliales prostatiques (Bidaux et al., 2005; Henshall et al., 2003; Zhang and Barritt, 2004), n'est pas soumise à une régulation génomique conditionnée par les androgènes et leur récepteur intracellulaire. Cette seconde donnée nous permet de satisfaire la seconde condition pour qualifier notre effet de non génomique. Nous avons observé cet effet des androgènes à des doses physiologiques de testostérone et dihydrotestostérone (10 nM).

I. 1. c) Le quatrième critère : existe-t-il un récepteur aux androgènes membranaires ?

Nos résultats sur la voie de signalisation mise à profit par les androgènes pour inhiber le canal TRPM8 ont abouti à la mise en évidence de l'implication des protéines Gi. La question d'un récepteur aux androgènes membranaire s'est tout de suite posée. Celle-ci fait depuis plusieurs années l'objet de multiples débats et recherches. Nous avons, dans la même lignée que les travaux qui nous ont précédés sur l'étude des effets non génomiques, voulu vérifier que l'inhibition des canaux TRPM8 par la testostérone était maintenue lors d'une application de la testostérone-BSA (non perméante). Une telle stratégie avait été employée par Lyng *et coll.* dans les cellules LNCaP. Cette équipe avait constaté que l'application de testostérone (10 nM) sur ces cellules entraînait une augmentation rapide du calcium cytoplasmique. Afin de prouver l'existence d'un récepteur membranaire à la testostérone responsable des effets qu'ils enregistraient, les auteurs ont utilisé la testostérone-BSA (10 nM) et observé le même phénomène (Lyng et al., 2000). Dans le cas de notre étude, l'utilisation de cette testostérone-BSA ne s'est pas avérée, dans un premier temps, aussi fructueuse que pour les autres équipes. Nous n'avons observé aucun effet de la testostérone-BSA sur les cellules HEK-293_{M8} par application extracellulaire (figure 42A). Nous avons alors supposé que le récepteur que nous

recherchions possédait un site de fixation intracellulaire. Malheureusement, si la testostérone en dialyse intracellulaire dans la pipette de patch-clamp possède toujours son action inhibitrice sur le canal, la testostérone-BSA n'a aucun effet sur TRPM8 (figure 42B et 42C).



La conclusion première de cette absence d'effet en présence de testostérone-BSA aurait été qu'il n'existe pas de récepteur membranaire aux androgènes impliqué dans l'inhibition de TRPM8 induite par la testostérone. Face à ce résultat surprenant, du fait de l'implication de protéines Gi dans la voie de transduction, nous avons alors persisté et réalisé en collaboration avec le Docteur Sylvie Deloof (Laboratoire de Physiologie Adaptative et de Neurosciences,

UPRES EA 4052, USTL Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France) des expériences de « *binding* » avec de la testostérone radioactive marquée au tritium.

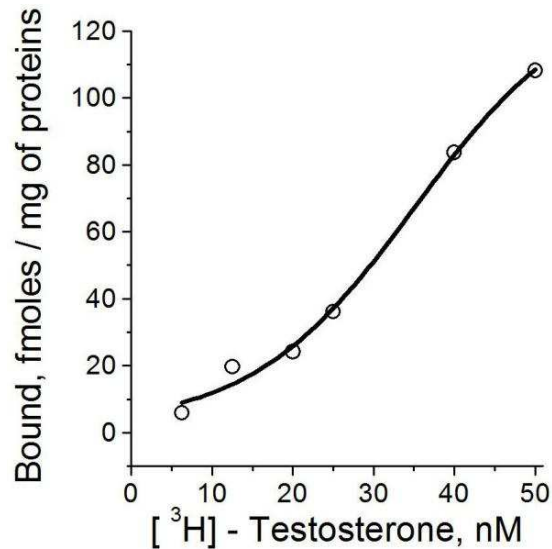


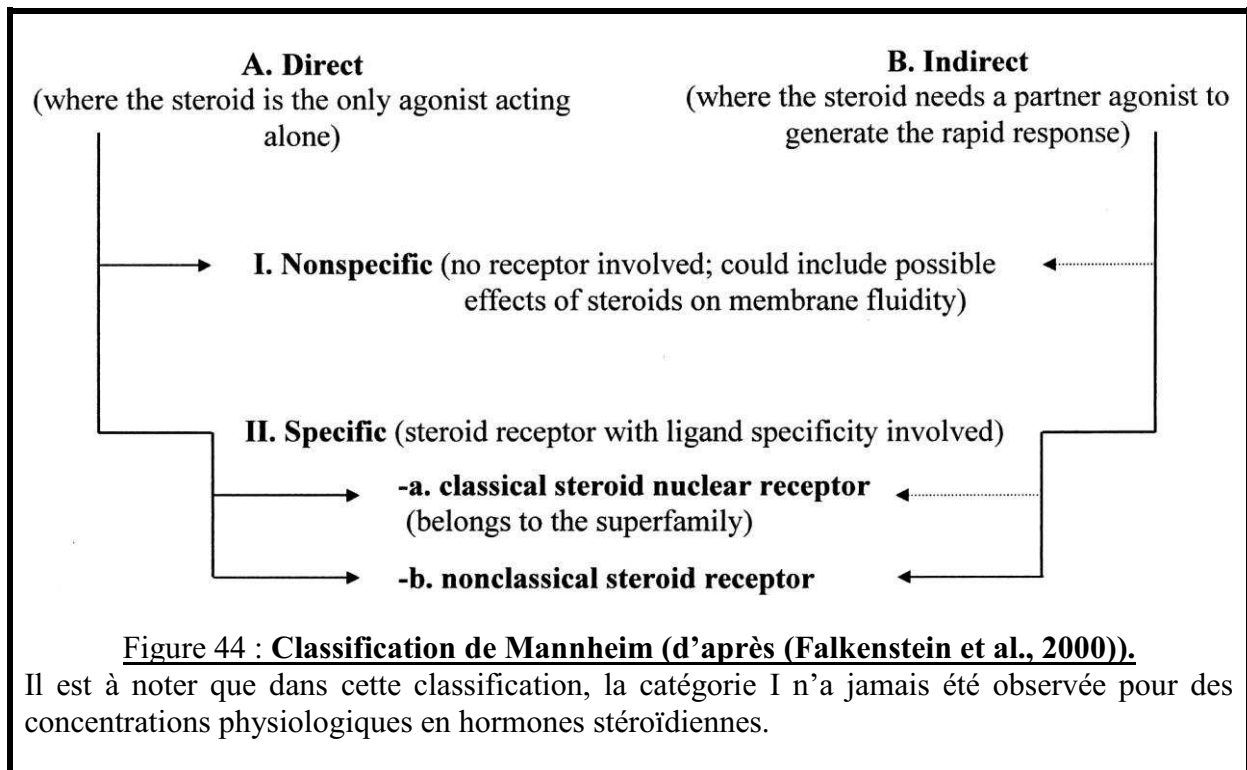
Figure 43 : résultat de « *binding* » de fractions membranaires de cellules HEK-293_{M8} incubées en présence de testostérone tritiée.

Le résultat d'une telle expérience (figure 43) montre que la testostérone radioactive, sur les fractions de membrane plasmique des cellules de notre modèle HEK-293_{M8} se fixe sur une structure membranaire. Il existerait donc bien un récepteur aux androgènes au niveau de la membrane plasmique de ces cellules.

Un fait paradoxal est que nous n'observons ce « *binding* » que dans les cellules HEK-293_{M8} dont l'expression de TRPM8 a été induite. Aucune fixation spécifique n'étant détectée dans les cellules HEK-293_{M8} non induites par la tétracycline. Deux interprétations d'une telle situation sont possibles : soit la testostérone se fixe directement sur TRPM8, soit le récepteur que nous recherchons n'est acheminé à la membrane que suite à l'induction de l'expression de TRPM8. Du fait de la grande spécificité de l'effet que nous observons (seuls les androgènes inhibent l'activité de TRPM8), qu'il implique les protéines Gi et l'inhibition de la voie de transduction intracellulaire AC/cAMP/PKA, nous penchons plus pour l'existence d'un récepteur aux androgènes enchâssé dans la membrane plasmique de ces cellules.

I. 2. Identification du récepteur membranaire aux androgènes

La question maintenant est d'identifier ce récepteur. Lors de la découverte des effets non génomiques, différents mécanismes d'action ont été proposés. La classification dite de Mannheim (figure 44) proposée lors du *First International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones* (Mannheim, Allemagne, 1998) rassemble ces différentes hypothèses.



L'effet des androgènes sur TRPM8 ne nécessitant pas de coactivateurs mais impliquant une voie de transduction intracellulaire comprenant, entre autre, l'activation des protéines Gi, notre étude appartiendrait à la catégorie « AII » de cette classification. Deux possibilités s'offrent donc à nous : soit les androgènes interagissent avec leur récepteur classique cytoplasmique transloqué à la membrane, soit ils se fixent sur un récepteur aux androgènes différent et encore non identifié. Ces deux cas de figure font actuellement l'objet de nombreux débats.

I. 2. a) Cas de figure « AII a »

Différentes études ont reporté des effets non génomiques des androgènes médiés par le récepteur classique aux androgènes transloqué à la membrane plasmique. Ces études se basent sur deux preuves expérimentales : 1) l'effet observé perdure en présence de testostérone-BSA

et 2) des inhibiteurs du récepteur aux androgènes tels que l'hydroxyflutamide reversent cet effet. Le cas de la cellule de Sertoli illustre parfaitement cette possibilité. L'application de testostérone dans des concentrations physiologiques entraîne une augmentation rapide et soutenue du calcium intracellulaire des cellules de Sertoli (Gorczyńska and Handelsman, 1995). Cette augmentation du calcium cytoplasmique est maintenue lors d'applications de testostérone-BSA. La testostérone se fixe sur son récepteur classique situé à la membrane des cellules de Sertoli. Dans ce modèle, ce récepteur semble être couplé à la voie Gq/PLC. La stimulation de cette voie entraîne une dépolarisation de la membrane plasmique par inhibition des canaux potassiques K_{ATP} et ainsi l'activation des canaux calciques voltage-dépendants de type L. Ces effets sont annulés en présence d'inhibiteurs du récepteur aux androgènes ainsi que de siARN anti-récepteur aux androgènes classique (pour revue (Rahman and Christian, 2007)).

Dans notre étude, nous avons utilisé le Casodex (bicalutamide). Le bicalutamide, tout comme l'hydroxyflutamide, est un anti-androgène non stéroïdien dépourvu de toute autre activité endocrinienne. Il se fixe compétitivement sur le site liaison du récepteur aux androgènes intracellulaire. Cette molécule est, dans nos expériences, est sans effet sur l'inhibition testostérone-dépendante de TRPM8 ce qui élimine donc l'hypothèse d'une implication du récepteur aux androgènes classique.

I. 2. b) Cas de figure « A II b »

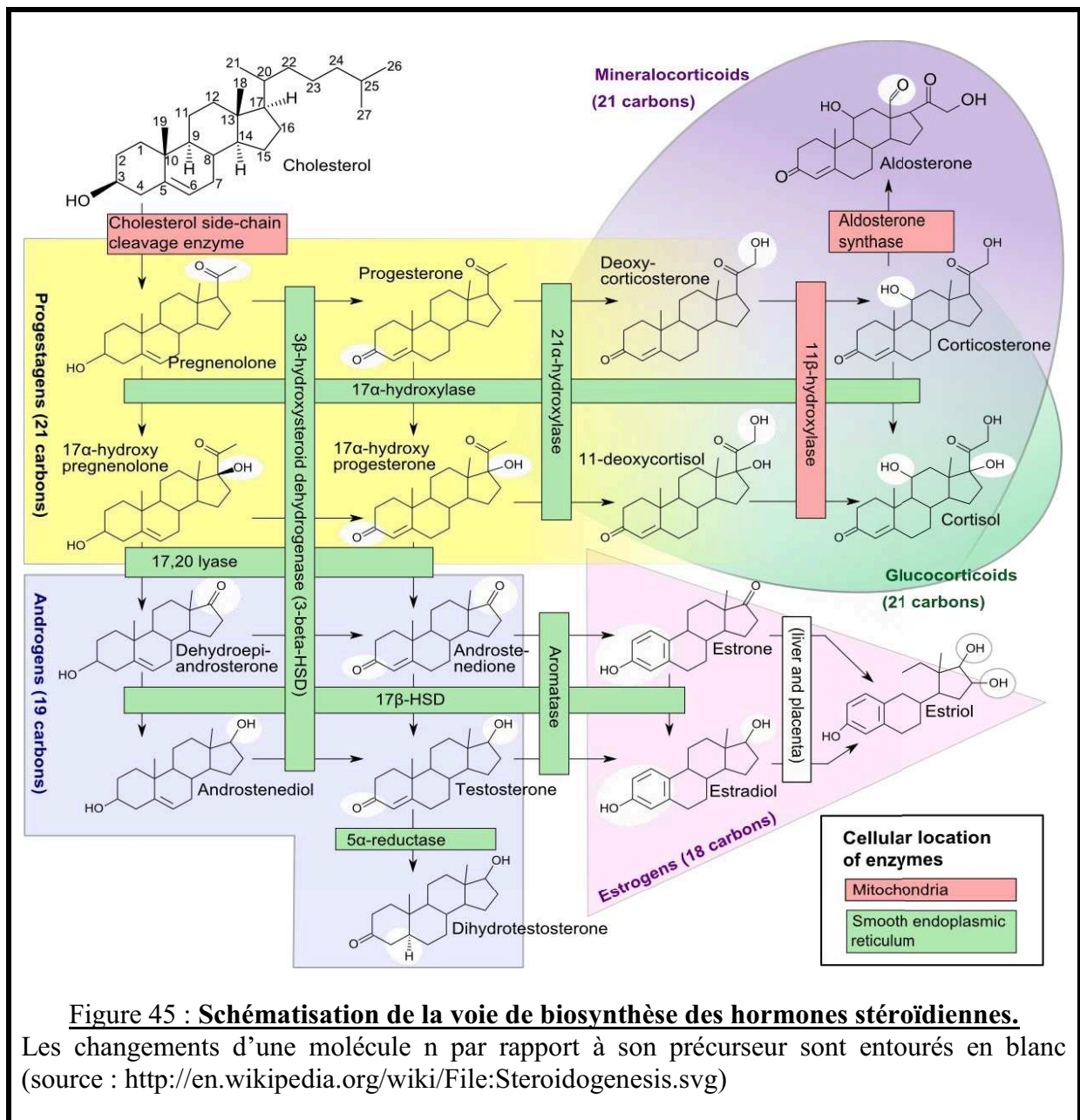
Si le cas de la cellule de Sertoli est un exemple d'effets non génomiques médiés par le récepteur classique aux androgènes, de plus en plus d'études, dans de nombreux modèles cellulaires, montrent des effets non génomiques de ces hormones mâles par des récepteurs membranaires aux androgènes différents du récepteur classique (pour revue (Rahman and Christian, 2007)). Parmi ces travaux, l'équipe de Wunderlich a décrit que l'augmentation du calcium cytoplasmique suite à l'application de testostérone sur les macrophages n'est pas due au récepteur classique aux androgènes. Les auteurs s'appuient sur le fait que

- ✓ les macrophages présentent un très faible taux d'expression du récepteur intracellulaire aux androgènes,
- ✓ leur effet est maintenu en présence d'antagonistes du récepteur classique (hydroxyflutamide),
- ✓ la testostérone-BSA induit également une augmentation du calcium cytoplasmique.

Ces données expérimentales traduisent bien l'existence, dans ce modèle, d'un récepteur aux androgènes membranaire différent du récepteur classique. Ce récepteur serait couplé aux protéines G et couplé positivement à la voie PLC (Wunderlich et al., 2002). Au vu de l'absence d'effet du Casodex sur l'inhibition testostérone-dépendante de TRPM8, nous penchons plus pour ce second cas de figure.

1. 3. Origine de la spécificité androgénique

En testant différents stéroïdes, nous avons montré que seuls les androgènes exerçaient un effet sur l'activité de TRPM8. Lorsque l'on regarde de plus près les différentes formules des stéroïdes et que l'on compare les androgènes avec les œstrogènes ou leur précurseur commun, l'androstènedione (figure 45), les différences fondamentales entre ces molécules reposent sur les groupements en 3 et 17. L'inversion, sur la molécule de testostérone, des groupements en ces deux positions (androstérone) ou le blocage respectivement en position 3 par un O-carboxyméthyl oxime (Testostérone-CMO) ou en position 17 par un acétate (testostérone-acétate) de ces deux groupements annihile tout effet inhibiteur. Nous en avons déduit que ces deux groupements sont à l'origine de la spécificité androgénique de l'effet que nous observons sur TRPM8.



Ce résultat, outre de nous avoir permis d'expliquer l'origine du caractère purement androgénique de l'effet que nous étudions, montre pourquoi la testostérone-BSA n'a aucun effet dans nos expériences. Cette donnée souligne également le fait que cette molécule peut s'avérer être un mauvais outil d'étude des effets non génomiques des androgènes.

La molécule de testostérone-BSA (ou testostérone 3-(O-carboxyméthyl)oxime : BSA) est le résultat de la greffe en position 3 d'un groupement 3-(O-carboxyméthyl)oxime : BSA. Or, nous avons démontré que, sur la molécule de testostérone, la cétone en position 3 est importante pour la reconnaissance avec le récepteur aux androgènes responsable de l'effet sur TRPM8. Ce groupement étant alors masqué, il est maintenant logique que la testostérone-

BSA n'inhibe pas TRPM8. Nos résultats démontrent donc que cette molécule de testostérone non perméante est à utiliser avec précautions pour ce type d'étude car son absence d'effet n'indique pas forcément une absence de récepteur membranaire aux androgènes. Il convient donc de coupler les tests réalisés avec cette molécule à des expériences de « *binding* ».

I. 4. Voie de signalisation intracellulaire des androgènes

Grâce à une approche pharmacologique et l'utilisation de protéines Gi mutées, nous avons démontré que ce récepteur aux androgènes membranaire était couplé aux protéines Gi. Les différentes études qui nous ont précédé sur le thème d'un récepteur aux androgènes membranaire ont mis en évidence un couplage avec une voie incluant des protéines G et la PLC (pour revue (Rahman and Christian, 2007)). Jusqu'ici, aucune étude n'a mis en évidence, pour les androgènes, un récepteur membranaire couplé aux protéines Gi et bloquant la voie AC/cAMP/PKA.

Néanmoins ce type de signalisation a été en parti décrit pour le récepteur membranaire à la progestérone cloné à partir d'ovaires de truites de mer. Ce récepteur membranaire à la progestérone (mPR) est à l'origine d'effets non génomiques impliqués dans la maturation des oocytes. Exprimé dans des cellules humaines de la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-231, la stimulation de ce récepteur inhibe l'adénylate cyclase et la production de cAMP via l'activation des protéines Gi sensibles à la toxine pertussique dans un délai de 5 minutes (Zhu et al., 2003).

Notre étude démontre donc pour la première fois, pour les androgènes, l'existence d'un récepteur membranaire, différent du récepteur intracellulaire classique, couplé aux protéines Gi, inhibant la voie AC/cAMP/PKA et dont l'activation module l'activité d'un canal ionique de la superfamille TRP, TRPM8.

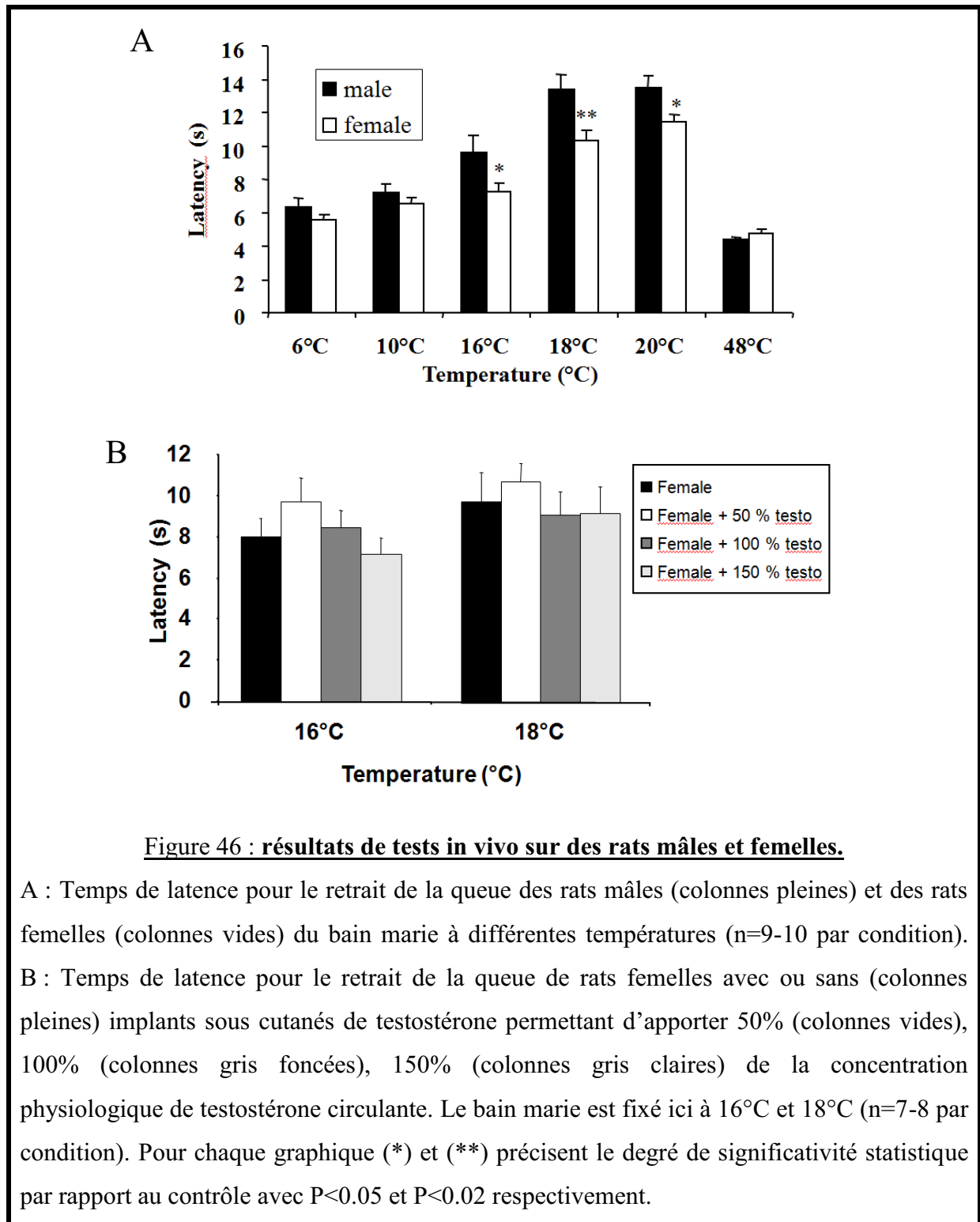
I. 5. Rôle de cette régulation non génomique au niveau sensoriel

Grâce à notre collaboration avec le Dr. Jérôme Busserolles (UMR 766 Inserm/UdA, Clermont-Ferrand, France) pour la réalisation de tests *in vivo* sur des rats et souris (test de l'immersion de la queue de l'animal et de préférence de plaques), nous avons mis en évidence que l'inhibition non génomique exercée par les androgènes sur le récepteur au froid TRPM8 modulait bien la perception des basses températures chez ces animaux. Ce mécanisme pourrait expliquer les disparités de sensibilité au froid interindividuelles, entre individus de

sexes différents et dues à l'âge (Doeland et al., 1989; Harju, 2002; Potkanowicz et al., 2003). Plus encore, ce résultat pourrait expliquer un des mécanismes d'adaptation en réponse au stress. Il a été reporté une augmentation de la concentration plasmatique en testostérone immédiatement après une stimulation stressante (Gatenbeck et al., 1987; Stahl et al., 1984). Cette augmentation de la concentration plasmatique en androgènes lors d'un stress, d'une agression ou d'une activité physique pourrait diminuer la perception au froid environnant afin que l'organisme se concentre sur la réponse comportementale à élaborer.

Dans l'article 1 de la partie « Résultats » n'ont été présentés que les données obtenues pour les animaux mâles. Mais nous avons également réalisé des expériences avec les animaux femelles et observé une différence de sensibilité au froid entre les deux sexes. Les rats femelles sont plus sensibles aux basses températures que les mâles (figure 46A). Les équipes travaillant sur les souris KO TRPM8 n'avaient pas détecté cette différence de sensibilité. Ils ont alors compulsé toutes leurs données indépendamment du sexe de l'animal testé. L'absence de cette observation dans leurs travaux peut s'expliquer. D'une part, les auteurs ne s'intéressaient qu'à montrer l'impact de TRPM8 dans la perception des basses températures. Le dimorphisme sexuel n'était pas dans leurs préoccupations. D'autre part, les différences de sensibilité que nous observons sont petites, elles n'ont peut être pas retenu l'attention de ces trois équipes.

Ce résultat est néanmoins tout à fait en adéquation avec ce que nous pouvions attendre au vue du rôle des androgènes dans la régulation du récepteur au froid TRPM8. Malheureusement, la pose d'implants de testostérone sous la peau des rats femelles n'altère en rien leur sensibilité au froid (figure 46B). Ce résultat suggère donc l'existence, chez les animaux femelles, d'une autre voie de régulation du canal TRPM8 à rechercher.



II. Régulation du canal TRPM8 par les récepteurs alpha2A adrénergiques

Notre première étude démontrait l'existence d'une régulation du canal TRPM8 par les androgènes. Ces hormones stéroïdiennes mâles empruntent une voie non génomique impliquant un récepteur couplé aux protéines Gi. Dans la continuité de ce travail nous sommes intéressés à d'autres neuromédiateurs dont les effets sont médiés par des récepteurs aux protéines G aussi bien exprimés au niveau sensoriel que prostatique. L'un de ces récepteurs a attiré notre attention du fait de son implication dans la nociception, le récepteur alpha2A adrénergique ($\alpha 2A$ -AR).

Comme indiqué dans l'introduction, le canal TRPM8 semble être impliqué dans l'allodynie au froid (*cold allodynia*). Une surexpression de ce récepteur au froid est en effet constatée suite à des lésions/constrictions de nerfs périphériques (modèle CCI) connues pour générer cette pathologie (Frederick et al., 2007; Proudfoot et al., 2006; Xing et al., 2007). Cette surexpression est à l'origine soit d'une hyperexcitabilité des neurones sensoriels des DRG conférant une hypersensibilité aux basses températures (Xing et al., 2007), soit d'une voie analgésique impliquant TRPM8 et un rétrocontrôle glutaminergique contre ces symptômes douloureux (Proudfoot et al., 2006).

Parallèlement aux études concernant le rôle de TRPM8 dans cette pathologie, d'autres travaux mettent en évidence l'implication du récepteur alpha2A adrénergique dans ce type de douleur neuropathique. Ces récepteurs sont décrits comme prenant part à la fois au phénomène d'analgésie lors de douleurs neuropathiques (Bantel et al., 2005) et dans la thermorégulation (Hocker et al., 2008). Le rôle des récepteurs $\alpha 2A$ -AR dans l'analgésie a été confirmé par des tests *in vivo* sur des souris KO pour ce sous-type de récepteur adrénergique (Hunter et al., 1997). Suite à une lésion/constriction de nerfs périphériques induisant l'allodynie, on assiste à une surexpression des ARNm $\alpha 2A$ -AR au sein des neurones sensoriels des DRG (Birder and Perl, 1999). L'effet analgésique qui suit l'activation des $\alpha 2A$ -AR par leur agoniste clonidine, utilisé en clinique, est donc plus prononcé dans les modèles de douleurs neuropathiques (Bantel et al., 2005).

Cet ensemble de données sur TRPM8 et les récepteurs $\alpha 2A$ -AR dans la nociception et le fait que les récepteurs $\alpha 2A$ -AR sont à la fois exprimés, tout comme TRPM8, au niveau des neurones sensoriels des DRG et au niveau prostatique (Michel and Vrydag, 2006) nous ont fait supposer une possible relation entre ces deux entités.

II. 1. Inhibition du canal TRPM8 par les récepteurs alpha2A adrénergiques couplés aux protéines Gi et voie de transduction associée

Aussi bien pour les neurones sensoriels fraîchement isolés de DRG de rat que pour le modèle d'études HEK-293_{M8} transfecté avec le récepteur α 2A-AR (HEK-293_{M8- α 2A-AR}), l'application de clonidine inhibe le canal TRPM8. Comme dans notre premier travail, nous avons adopté une approche pharmacologique pour examiner la voie de transduction intracellulaire responsable de cette inhibition de l'activité de TRPM8 par la clonidine. Nous avons démontré que le récepteur, dans le modèle d'études mécanistiques HEK-293_{M8}, est couplé positivement aux protéines Gi, ce qui est en adéquation avec la littérature (Ramos et al., 2006). La stimulation de cette classe de récepteurs entraîne le blocage, par les protéines Gi, de la voie de signalisation AC/cAMP/PKA. A ce stade, nous démontrions exactement la même voie de régulation de TRPM8 que celle empruntée par les androgènes. De ce fait, seul le récepteur diffère entre nos deux premières études. Il est donc tout à fait envisageable que la stimulation de tout récepteur couplé aux protéines Gi génère la même modulation de l'activité de TRPM8.

Au cours de cette deuxième étude, nous avons poussé plus loin l'étude de la voie de signalisation intracellulaire. En effet, nous n'avions pas explicité le lien entre l'inhibition de la PKA et celle de TRPM8. Il persistait deux hypothèses de régulation de l'activité de TRPM8 par la PKA. Cette kinase, pour maintenir une activité optimale du canal TRPM8, peut phosphoryler soit un partenaire intracellulaire, soit directement le canal. Nous avons utilisé la pharmacologie de la sérine/thréonine kinase PKA et de sa phosphatase associée PP2A (Protéine Phosphatase 2A) ainsi que des formes mutées constitutivement phosphorylées ou non du canal en des sites putatifs de phosphorylation par la PKA. Par cette stratégie nous démontrons que TRPM8 est directement phosphorylé par la PKA en deux sites, S9 et T17. La clonidine, en activant les récepteurs alpha2A adrénergiques, inhibe la PKA ce qui aboutit à une déphosphorylation du canal par la PP2A, en particulier en ces deux sites, aboutissant à la diminution d'activité de TRPM8. Notre étude démontre donc pour la première fois que TRPM8, afin d'être actif, doit être phosphorylé par la PKA particulièrement en deux sites, S9 et T17.

Jusqu'à ce travail, aucun article n'a été publié sur une possible régulation d'un canal TRP par les récepteurs alpha2A adrénergiques. Il est connu, par contre, que cette classe de récepteurs régule l'activité des canaux cardiaques *pacemakers* activés par l'hyperpolarisation HCN (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide*). Ces canaux sont directement inhibés par la

clonidine (Knaus et al., 2007). Cet agoniste adrénergique induit un déplacement de la courbe d'activation de ces canaux vers des potentiels plus hyperpolarisés (Knaus et al., 2007) et nécessite l'activation de la voie de signalisation PLC/PKC (Carr et al., 2007).

Si aucune donnée n'était disponible sur la régulation des canaux TRP par les récepteurs α 2A-AR, très peu des membres de cette superfamille ont également été décrits comme modulés par les protéines Gi. Les canaux TRPC4 sont activés par les protéines Gi couplées aux sous-types de récepteurs muscariniques M2 stimulés par le carbachol dans les cellules musculaires lisses du tissu viscéral (Jeon et al., 2008). Deux isoformes de TRPC4, exprimées dans les cellules musculaires lisses et endothéliales vasculaires, TRPC4 α and TRPC4 β , sont également activées par les protéines Gi (Otsuguro et al., 2008). Enfin, les canaux TRPM7 sont, quant à eux, inhibés suite à la stimulation de sous-types de récepteurs muscariniques couplés aux protéines Gi (Takezawa et al., 2004).

Du point de vue de la régulation AC/cAMP/PKA-dépendante, différents canaux TRP ont été montrés comme modulés par cette voie de transduction intracellulaire. TRPV1, dans les neurones sensoriels de DRG, est régulé positivement par la voie AC/cAMP/PKA suite à la stimulation des récepteurs prostaglandines E(2) (PGE(2)) auxquels elle est couplée (Schnizler et al., 2008). Le canal TRPML1, à la différence de nos résultats pour TRPM8, est inhibé par la voie AC/cAMP/PKA qui le phosphoryle directement sur deux résidus sérine (Vergarajauregui et al., 2008). Le canal TRPV4 est, quant à lui, sensibilisé par la phosphorylation d'une sérine en position 824 par la PKA (Fan et al., 2009). La probabilité d'ouverture de TRPV5 est augmentée par la voie AC/cAMP/PKA et par sa phosphorylation sur la thréonine 709 (de Groot et al., 2009). La PKA associée à une protéine kinase A adaptatrice (*acetylcoenzyme A binding domain protein*) module l'activité des canaux TRPV2 (Stokes et al., 2004). Enfin, TRPV6 est régulé par la voie AC/cAMP/PKA/calmoduline A qui contrôle la formation du complexe annexine2/S100A10. L'association de TRPV6 avec ce complexe module de manière différentielle l'activité de TRPV6 en fonction du modèle cellulaire, à savoir l'épithélium respiratoire ou intestinale (Borthwick et al., 2008).

Nous avons enfin démontré que la stimulation, par l'isoproterenol, de la voie β -adrénergique couplée aux protéines Gs, elles-mêmes couplées positivement à l'adénylate cyclase, contrecarre l'inhibition de TRPM8 par la clonidine en restaurant l'activité de la PKA. TRPM8 est donc au carrefour de deux mécanismes de transduction intracellulaire mettant en jeu les protéines Gi et Gs. Un tel cas de figure a également été décrit pour le canal TRPM7 (Takezawa et al., 2004). Mais, si l'activité du canal TRPM7 est potentialisée par la

stimulation des récepteurs β -adrénergiques couplés aux protéines Gs, nous n'observons pas de potentialisation du courant TRPM8 en présence d'isoproterenol.

Notre étude ajoute donc TRPM8 dans les courtes listes des canaux TRP régulés par les protéines Gi d'une part et par la voie AC/cAMP/PKA d'autre part.

II. 2. Rôle de la régulation α 2A adrénergique de TRPM8 au niveau sensoriel : l'allodynie au froid

Au vue des données de la bibliographie sur l'implication de TRPM8 et des récepteurs α 2A-AR dans le phénomène d'allodynie au froid, nous pensons que l'inhibition de l'activité du récepteur au froid par la clonidine peut avoir un impact sur la nociception. Lors d'une lésion/constriction de nerfs périphériques induisant l'allodynie au froid (modèle CCI), on assiste à une surexpression à la fois du canal TRPM8 responsable de l'hypersensibilité au froid (Xing et al., 2007) mais aussi des récepteurs α 2A-AR dans les neurones sensoriels des DRG. Nous émettons l'hypothèse que cette augmentation d'expression des récepteurs α 2A-AR est un mécanisme potentiel de protection contre les symptômes douloureux de l'allodynie au froid.

Ce travail s'intègre dans une lignée d'études sur l'impact de TRPM8 dans l'allodynie au froid. Mais le rôle de ce canal dans cette pathologie fait débat :

- Xing *et coll.* décrivent que sa surexpression dans le modèle CCI est à l'origine de l'hypersensibilité au froid caractéristique de l'allodynie (Xing et al., 2007).
- Proudfoot *et coll.* penchent plutôt pour un rôle analgésique de TRPM8 par un mécanisme de rétrocontrôle glutaminergique des neurones thermosensibles sur les neurones nociceptifs. (Proudfoot et al., 2006).
- Caspani *et coll.*, non contents de ne pas abonder dans le sens de l'un des deux premiers camps, ont récemment publié que ni TRPM8 ni TRPA1 ne sont impliqués dans l'allodynie au froid. De plus, ils observent suite à la lésion de nerfs périphériques en adéquation avec le modèle CCI, une diminution de l'expression de ces deux canaux et aucun changement du nombre de neurones sensibles au menthol (Caspani et al., 2009).

Notre étude, dans sa filiation, se rapprocherait plus de celle de Xing *et coll.* Néanmoins, de plus amples investigations doivent être réalisées, et particulièrement des tests *in vivo*, afin de connaître la pertinence de nos résultats chez l'animal et déterminer le rôle de TRPM8 dans cette pathologie.

II. 3. La voie de transduction intracellulaire Gi/AC/cAMP/PKA : une nouvelle voie de régulation physiologique de TRPM8

Un second prolongement de notre travail se dessine depuis la publication dans la revue *Nature Cell Biology* par Konstantinos Lefkimiatis *et coll.* d'une nouvelle voie de signalisation dénommée SOcAMPS (*Store-Operated cAMP Signalling*). Au vue de nos résultats, nous pensons que toutes voies affectant l'activité de l'adénylate cyclase, et donc de la PKA, peuvent moduler l'activité de TRPM8. Par exemple, la stimulation de récepteurs couplés aux protéines Gi ou de récepteurs couplés aux protéines Gs module respectivement négativement ou positivement l'activité de cette enzyme intracellulaire productrice de cAMP. Cet article de Lefkimiatis *et coll.* décrit que la vidange des stocks calciques réticulaires, indépendamment du calcium cytoplasmique, recrute l'adénylate cyclase, entraîne une augmentation de la concentration cytoplasmique en cAMP et stimule l'activité de la PKA. Ce recrutement fait intervenir les protéines, enchâssées dans la membrane réticulaires, *calcium sensor* STIM1 (Lefkimiatis *et al.*, 2009). Cette nouvelle voie, SOcAMPS, représente potentiellement un nouveau mécanisme physiologique d'activation du canal TRPM8 par la vidange des stocks calciques réticulaires dans des tissus non soumis aux variations de température exprimant TRPM8, tels que la prostate. Elle vient s'ajouter à la voie iPLA2/lysophospholipides qui avait été précédemment décrite par notre équipe (Vanden Abeele *et al.*, 2006).

III. Régulation du canal TRPM8 par les récepteurs muscariniques

Les récepteurs muscariniques forment une famille de récepteurs couplés à la fois aux protéines Gi et Gq (pour revue (Lanzafame et al., 2003)). Exprimés aussi bien au niveau sensoriel (Tata et al., 2000) que prostatique (Avellar et al., 2009), ils entrent tout à fait dans notre liste de voies à explorer dans le cadre de la régulation de l'activité de TRPM8 par des neuromodulateurs. L'étude que nous avons présentée est purement mécanistique et a été réalisée sur des cellules HEK-293 surexprimant le canal TRPM8. Ces dernières expriment de manière endogène les sous-types de récepteurs muscariniques M1, M3, M4 et M5. Sachant que les formes M1/3 et 5 sont couplées aux protéines Gq et la forme M4 aux protéines Gi, on pouvait espérer retrouver TRPM8 au carrefour de différentes voies de transduction intracellulaire (Gi/AC/cAMP/PKA, Gq/PLC, cPLA2). En nous inspirant de l'article publié par Liu *et coll.* dans *The Journal of Neuroscience* (Liu et al., 2006), nous avons utilisé l'oxotrémorine-M (oxo-M) comme agoniste muscarinique. Notre approche a été de voir quel(s) effet(s) était (étaient) généré(s) par la stimulation muscarinique et de décortiquer ensuite, au moyen de la pharmacologie et des techniques de biologie moléculaire, la ou les voie(s) de transduction intracellulaire impliquée(s).

III. 1. Inhibition de l'activité de TRPM8 par un agoniste muscarinique : l'oxotrémorine-M

Un court prétraitement avec l'oxo-M (10 μ M) inhibe de 51 à 60 % le canal TRPM8 activé aussi bien par le froid que par l'iciline ou le menthol. Nous avons démontré, au moyen de l'atropine, un inhibiteur des récepteurs muscariniques, que cette inhibition passe bien par cette famille de récepteurs.

III. 1. a) Détermination de la ou des voie(s) de transduction mise(s) en jeu

L'étude de la (les) voie(s) impliquée(s) dans cette inhibition a donné des résultats pour le moins intrigants. En effet, si l'inhibiteur de la PLC (U73122) ne reverse pas l'action de l'oxo-M supposant que la voie Gq/PLC n'entre pas en jeu, le traitement à la PTX n'annule pas, non plus, l'inhibition par l'oxo-M. Ce résultat suggère que la voie des protéines Gi n'est pas mise à contribution pour bloquer l'activité du canal TRPM8 même si des récepteurs muscariniques couplés à cette classe de protéines G sont exprimés dans ce modèle cellulaire. Cette conclusion va à l'encontre de celles que nous avons émises précédemment sur le fait que la

stimulation de n'importe quel récepteur couplé aux protéines Gi, s'il est coexprimé avec TRPM8, aboutirait à l'inhibition de l'activité du canal.

Puisque les voies Gq/PLC et Gi/AC/cAMP/PKA ne sont pas concernées par l'effet que nous étudions, nous avons exploré une dernière possibilité, la PLA2 de type IV calcium-dépendante cytosolique (cPLA2). En effet, les trois sous-types de récepteurs M1, M3 et M5 couplés aux protéines Gq peuvent être également couplés à la voie productrice d'acide arachidonique : la PLA2 (Conklin et al., 1988) et plus précisément à la cPLA2 pour M1 et M3 (Osterhout and Shuttleworth, 2000; Shuttleworth and Thompson, 1998). Nous montrons que l'acide arachidonique, produit de catalyse de la cPLA2, inhibe bien TRPM8 comme décrit par Andersson *et coll.* (Andersson et al., 2007). L'utilisation en dialyse intrapipette d'un inhibiteur de cette phospholipase A2, le AACOCF3 (50 μ M), reverse l'action de l'oxo-M. Au vu de la bibliographie sur la PLA2 et TRPM8, on pouvait supposer plutôt un rôle de la iPLA2 (Andersson et al., 2007). Nous avons confirmé par une stratégie d'ARN interférence que c'est bien la cPLA2 et non la iPLA2 qui est impliquée dans l'inhibition de TRPM8 par l'oxo-M. Cette étude mécanistique de la régulation de TRPM8 par les récepteurs muscariniques n'est pas complète. Nous avons certes montré que l'oxo-M semble activer les récepteurs M1 et/ou M3 exprimés dans notre modèle et décrits comme couplés à la cPLA2. Mais nous n'avons pas encore décrit le mécanisme emprunté par la stimulation muscarinique pour activer la cPLA2.

III. 1. b) Mécanismes d'activation possibles de la cPLA2

Différentes possibilités de voies d'activation de la cPLA2 par les récepteurs muscariniques ont été publiées :

- 1) Une augmentation du calcium cytoplasmique en provenance du compartiment extracellulaire permet la translocation de la cPLA2 à la membrane afin de l'amener au contact de son substrat (pour revue (Rosa and Rapoport, 2009)). La phosphorylation par la PKC, indépendamment de l'activation de la PLC, permet de stimuler son activité (Shuttleworth and Thompson, 1998).
- 2) La stimulation des récepteurs muscariniques M3 permet la production d'acide arachidonique par la voie de transduction Gq/PLC β /PKC/ERK1/2/cPLA2 et la phosphorylation de la cPLA2 en position Ser⁵⁰⁵ (Zhou et al., 2003). Dans le cas du récepteur à la vasopressine, cette voie fait intervenir la p42 MAP-kinase en lieu et place de ERK1/2 (Chen and Chen, 1999).

- 3) Un mécanisme indépendant de l'augmentation du calcium cytoplasmique et de la PLC a été proposé suite à l'application de carbachol sur les cellules de la lignée astrocytaire 1321N1. Cette voie ferait intervenir les protéines G ainsi que la PKC pour phosphoryler et ainsi activer la cPLA2 (Bayon et al., 1997).
- 4) Une dernière voie a été décrite impliquant le récepteur M2 dont l'activation des protéines Gi sensibles à la toxine pertussique entraîne la signalisation suivante : Gβγi/PI3-kinase/Cdc42/Rac1/p21-activated kinase (PAK1)/p38 MAP-kinase/cPLA2 (Zhou et al., 2003).
- 5) Pour des faibles concentrations en agoniste muscarinique, il y aurait production d'acide arachidonique par phosphorylation, et donc activation, du faible pool de cPLA2 situé à la membrane plasmique. Ceci se produirait indépendamment d'une élévation du calcium intracellulaire et de la voie PLC/PKC (Osterhout and Shuttleworth, 2000).

Au vu des résultats présentés ici, les mécanismes proposés en 2 et en 4 peuvent être d'ores et déjà mis à l'écart puisque nous montrons bien que l'effet de l'oxo-M sur TRPM8 ne fait intervenir ni la PLC ni les protéines Gi sensibles à la toxine pertussique. Il conviendra donc d'explorer, dans un premier temps, une possible implication de la PKC dans la voie de transduction que nous cherchons à expliciter. Dans un second temps, des expériences en absence de calcium extracellulaire et en chélatant le calcium intracellulaire permettraient de savoir si notre effet nécessite une élévation du calcium intracytoplasmique. Enfin, si ni la PKC, ni le calcium ne s'avéraient nécessaires à l'oxo-M pour induire la production d'acide arachidonique, il faudrait alors envisager la cinquième possibilité énoncée précédemment et regarder si l'oxo-M à faible concentration est susceptible d'inhiber TRPM8 par une voie PKC/calcium-indépendante.

Je tiens néanmoins à indiquer une contradiction au sein de mes propres résultats. Le test du prétraitement à la PTX pour mettre en évidence une possible régulation par les récepteurs couplés aux protéines Gi (M4) est un résultat obtenu au cours de la rédaction de cette thèse et n'a pas été réalisé plusieurs fois. Aucune tentative avec la forskoline (activateur de l'adénylate cyclase) ou avec l'isoprotérénol (agoniste des récepteurs β adrénergiques couplés positivement, via les protéines Gs, à l'adénylate cyclase) n'a été tentée dans le but de s'assurer de la véracité de ce résultat. Les deux études précédentes démontrant que la stimulation de deux récepteurs différents couplés aux protéines Gi aboutie à l'inhibition de TRPM8, il est fort curieux que cela n'ait pas fonctionné ici. Donc, malgré ce premier résultat expérimental, je conserve cette option d'une possible implication des récepteurs M4. Si après plusieurs

investigations cette éventualité s'avère vérifiée, l'hypothèse 4) de voie d'activation de la cPLA2 devra alors être à nouveau prise en compte.

Notre travail n'est pas le premier décrivant un rôle de la cPLA2 dans la régulation de l'activité d'un canal de la superfamille des canaux TRP. Effectivement, un article propose l'activation des canaux TRPC6 par une voie de transduction impliquant la cPLA2 au sein de myocytes aortiques de la lignée A7r5 (Inoue et al., 2009a). Notre étude crée donc une nouvelle liste de canaux TRP régulés par la cPLA2 qui inclut donc jusqu'ici TRPM8 et TRPC6.

III. 1. c) Qu'en est-il des lysophospholipides ? De la iPLA2 ?

Deux précédentes études ont démontré que l'activation de la iPLA2 permettait la dégradation de phospholipides membranaires et la production de lysophospholipides et d'acide arachidonique. Paradoxalement, les deux produits du catabolisme exercé par la iPLA2 produisent sur TRPM8 des effets contraires. Les lysophospholipides activent le canal alors que l'acide arachidonique l'inhibe (Andersson et al., 2007; Vanden Abeele et al., 2006). Andersson et *coll.* ont résolu ce paradoxe : à concentrations égales, l'effet des lysophospholipides l'emporte sur celui de l'acide arachidonique (Andersson et al., 2007). Deux questions se posent face à nos résultats avec la cPLA2 :

- ✓ la cPLA2 produisant également des lysophospholipides, comme la iPLA2, qu'en est-il de la place des lysophospholipides dans cette voie de régulation muscarinique que nous mettons en évidence ?
- ✓ la iPLA2 produit également l'acide arachidonique. Peut-elle prendre place dans la voie de régulation de TRPM8 par les récepteurs muscariniques ?

Aucune revue ne décrit une activation de la iPLA2 par les récepteurs muscariniques. De plus, nos résultats avec les si ARN anti-cPLA2 démontrent bien que seule la cPLA2 est impliquée dans cet effet inhibiteur de l'oxo-M sur TRPM8.

La iPLA2 est décrite comme la PLA2 productrice de lysophospholipides, pour le remodelage de la membrane plasmique. La cPLA2, quant à elle, est une PLA2 majoritairement productrice d'acide arachidonique (pour revue (Rosa and Rapoport, 2009)). On peut donc imaginer que, à la différence de la iPLA2, la stimulation de cette cPLA2 par l'activation de récepteurs muscariniques produira majoritairement de l'acide arachidonique. La balance des concentrations en lysophospholipides et acide arachidonique étant cette fois-ci en faveur de l'acide arachidonique, on assiste donc à une inhibition du canal TRPM8.

III. 2. Implication des récepteurs muscariniques dans la nociception

Les récepteurs muscariniques sont exprimés, tout comme TRPM8, au niveau des neurones sensoriels de petits et moyens diamètres des DRG (Tata et al., 2000). Ils sont localisés notamment dans les terminaisons libres des fibres sensorielles nociceptives de type C, ce qui laisserait supposer un rôle de cette famille de récepteurs dans la modulation du phénomène nociceptif (Steen and Reeh, 1993).

Des études tendent à faire un lien entre l'allodynie au froid et les récepteurs muscariniques:

- Une première équipe a effectué sur des rats ayant subi des ligatures de nerfs (modèle CCI), des tests d'application d'acétone (générant au niveau cutané une sensation de froid intense) sur la patte de ces animaux. Ce test permet, d'un point de vue comportemental, d'étudier l'allodynie au froid en observant les mouvements de retraits de la patte stimulée. Les animaux souffrant d'allodynie réagissent par des retraits vifs de la patte. L'administration à ces animaux de physostigmine, un inhibiteur réversible de l'acétylcholinestérase, permet d'augmenter la concentration locale d'acétylcholine et par là même la stimulation des récepteurs muscariniques. La physostigmine, dans leur modèle, engendre une analgésie des symptômes de l'allodynie au froid ainsi que de l'allodynie mécanique de manière dose-dépendante. Cette observation conférerait donc un rôle analgésique à la stimulation de cette famille de récepteurs dans le cadre des douleurs neuropathiques (Poyhia et al., 1999).
- Un autre travail sur l'électroacupuncture (avec une fréquence de 2 Hz) démontre que cette méthode possède un effet analgésique pour des douleurs neuropathiques (allodynie au froid et allodynie mécanique) chez des rats du modèle CCI (Hwang et al., 2002; Kim et al., 2005). Les auteurs de l'étude sur l'allodynie au froid mettaient en évidence, dans un premier temps, l'importance des récepteurs alpha2-adrénergiques dans ce phénomène analgésique engendré par l'électroacupuncture (Kim et al., 2005). Dans un second article, la même équipe a montré que l'effet analgésique antiallodynique exercé par l'électroacupuncture, dans le cadre de l'allodynie au froid, est médié par la stimulation des récepteurs muscariniques chez les rats du modèle de douleurs neuropathiques CCI. Les auteurs proposent un rôle prépondérant du récepteur M1 dans ce phénomène (Park et al., 2009).

Au vu de ces travaux, il semblerait effectivement qu'il y ait une implication des récepteurs muscariniques dans l'analgésie lors de l'allodynie au froid. De la même manière que notre

étude sur les récepteurs alpha_{2A} adrénergiques, il sera donc très intéressant de tester la pertinence de cet effet de l'oxotrémorine-M d'une part sur l'activité de TRPM8 au sein des neurones sensoriels des DRG fraîchement isolés de rats et d'autre part sur les souris KO pour TRPM8 *versus* sauvages ayant subi des lésions/constrictions de nerfs. A terme une telle étude pourrait expliquer le mécanisme par lequel une stimulation des récepteurs muscariniques est susceptible d'atténuer les symptômes douloureux de l'allodynie au froid consécutifs à des lésions de nerfs périphériques.

La prostate est innervée par des projections cholinergiques du système nerveux autonome parasympathique (Ruggieri et al., 1995; Witte et al., 2008). Cette innervation ainsi que les récepteurs muscariniques exprimés par les cellules épithéliales prostatiques humaines ont été décrites comme prenant part à la croissance et au processus sécrétoire de la glande (Witte et al., 2008). TRPM8 étant régulé par la voie muscarinique, nous pouvons donc supposer que ce canal puisse jouer un rôle dans ces processus physiologiques fondamentaux pour la prostate.

IV. Régulation complexe de TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques

IV. 1. Régulation génomique et non génomique de TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques

Les travaux de Henshall *et coll* et de Zhang *et coll* démontraient l'androgéno-dépendance de l'expression de TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques (Henshall et al., 2003; Zhang and Barritt, 2004). Notre équipe avait également précisé que l'expression du gène *trpm8* est régulée par la voie génomique classique impliquant le récepteur aux androgènes intracellulaire (Bidaux et al., 2005). Du travail effectué sur les cellules HEK-293_{M8} et confirmé dans les cellules LNCaP_{M8}, nous montrons que les androgènes par une voie non génomique inhibent l'activité du canal TRPM8.

IV. 1. a) Quel est récepteur non génomique aux androgènes dans les cellules prostatiques ?

Ce mécanisme fait intervenir un récepteur membranaire. Dans le cadre de la thèse, nous n'avons pas utilisé la testostérone-BSA sur les cellules LNCaP_{M8}. Il nous est donc impossible de dire pour le moment si le récepteur membranaire aux androgènes, responsable des effets non génomiques observés, est le même que celui dont nous avons détecté l'existence dans les HEK-293_{M8}. Nous n'avons pas non plus testé le Casodex sur ces cellules. Donc, au niveau prostatique, trois possibilités demeurent :

- ✓ soit le récepteur classique intracellulaire, transloqué à la membrane plasmique,
- ✓ soit le récepteur aux androgènes membranaire, différent du récepteur classique, décrit au sein de la cellule de Sertoli et couplé aux protéines Gq (pour revue (Rahman and Christian, 2007)),
- ✓ soit un autre récepteur aux androgènes membranaire différent des deux précédents.

Du fait que la toxine pertussique, inhibiteur des protéines Gi, reverse l'effet des androgènes sur l'activité de TRPM8, nous pouvons néanmoins éliminer la seconde possibilité. Nos résultats démontrent que la testostérone emprunte, comme dans les HEK-293_{M8}, la voie Gi/AC/cAMP/PKA pour réguler l'activité du canal TRPM8. Ce récepteur membranaire non génomique est donc couplé aux protéines Gi.

Ce récepteur étant couplé aux protéines Gi et négativement à la voie AC/cAMP/PKA, outre TRPM8 il est possible que la stimulation de ce récepteur par les androgènes puisse réguler d'autres canaux ainsi que d'autres processus sensibles aux protéines Gi et/ou à la PKA. Les canaux calciques voltage-dépendants de type T (Ca_v3.2) sont impliqués dans la sécrétion des

cellules épithéliales prostatiques cancéreuses (Gackiere et al., 2008). Ces canaux sont régulés positivement par la PKA (Kim et al., 2006). La voie non génomique que nous décrivons pourrait potentiellement avoir un impact sur leur activité. Cette hypothèse se retrouve renforcée par une étude de Guido Michels *et coll.* montrant une inhibition non génomique dans les cardiomyocytes des canaux $Ca_v3.2$ par la testostérone et impliquant un récepteur différent de celui intracellulaire classiquement décrit car insensible au flutamide (Michels et al., 2006). La modulation par la testostérone de l'activité des canaux calciques de type T via cette nouvelle voie non génomique aurait donc éventuellement un impact sur la sécrétion des cellules épithéliales prostatiques. Avec cet exemple, il paraît donc vraisemblable que ce récepteur non génomique membranaire aux androgènes puisse avoir un rôle important dans la physiologie prostatique. Il convient donc de l'identifier et de le caractériser.

IV. 1. b) Rôle du canal TRPM8 au niveau prostatique

IV. 1. b). i. TRPM8 et l'homéostasie calcique

La perméabilité au calcium du canal TRPM8 étant supérieure à celle au sodium, TRPM8 pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie calcique cellulaire. Le calcium est un second messager universel et son rôle dans des processus vitaux pour la cellule tels que la prolifération, la sécrétion, la transcription et l'apoptose est largement reconnu. Le signal calcique est très finement régulé suivant trois paramètres : la durée, l'amplitude et la localisation du signal. Cette régulation fine mais complexe est nécessaire pour obtenir une signature calcique spécifique induisant un effet biologique précis. Il est connu, par exemple, que des entrées transitoires de calcium en provenance du milieu extracellulaire sont à l'origine de phénomènes physiologiques tels que la prolifération et la sécrétion alors qu'une augmentation soutenue de calcium est à l'origine du déclenchement du processus apoptotique (Berridge et al., 1998).

IV. 1. b). ii. Double localisation de TRPM8

Comme décrit en introduction, les cellules épithéliales prostatiques saines et cancéreuses au stade androgéno-dépendant, présentent deux formes du canal ainsi qu'une double localisation de celui-ci :

- ✓ la forme normale, entière, androgéno-dépendante, du canal est retrouvée au niveau plasmique et réticulaire (elle disparaît dans les cancers androgéno-indépendants),
- ✓ une isoforme androgéno-indépendante fonctionnelle mais tronquée uniquement réticulaire (Bidaux et al., 2007).

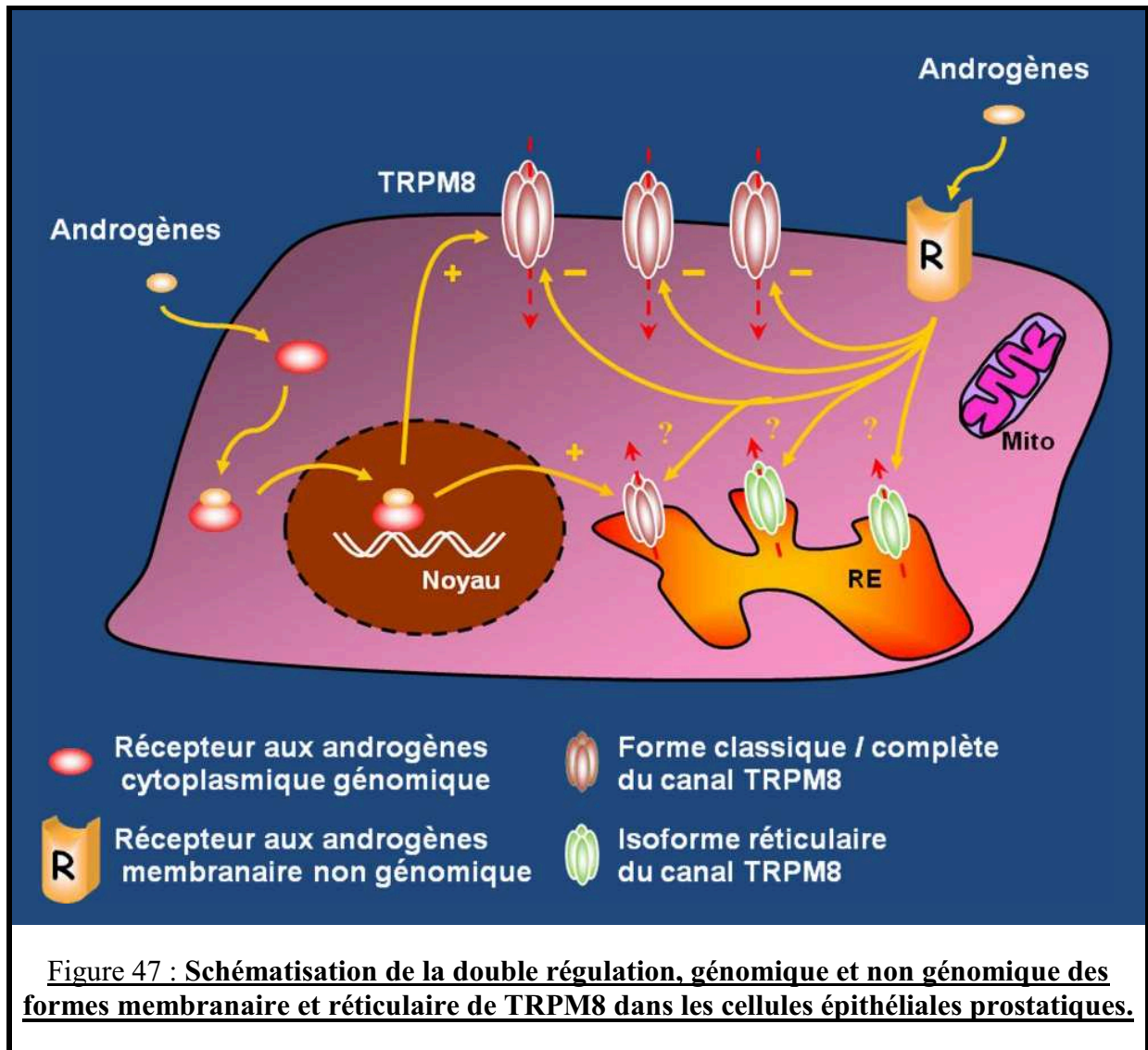
Au vu des connaissances sur l'homéostasie et la signature calcique ainsi que grâce aux données publiées par le laboratoire, nous supposons que :

- ✓ la forme normale du canal TRPM8, enchâssée dans la membrane plasmique, en permettant l'entrée du calcium extracellulaire serait impliquée dans la prolifération et la sécrétion des cellules épithéliales prostatiques.
- ✓ l'isoforme réticulaire permettrait la vidange calcique du réticulum endoplasmique et l'activation des canaux SOC membranaires. La vidange du calcium réticulaire ainsi que l'entrée capacitive de calcium par les canaux SOC sont connues pour induire un arrêt de la croissance et le déclenchement de l'apoptose des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses (Prevarskaya et al., 2004; Skryma et al., 2000). De ce fait, cette isoforme pourrait donc contrôler la croissance des cellules prostatiques et d'autant plus dans les cellules cancéreuses androgéno-indépendantes où elle devient l'unique isoforme de TRPM8.

Les cellules épithéliales prostatiques apicales, qui expriment TRPM8, sont des cellules mûres, différenciées, sécrétrices. De ce fait, ces cellules meurent et sont renouvelées par la couche basale de l'épithélium. Elles doivent donc posséder des machineries pro-apoptotiques et de sécrétions développées. TRPM8 pourrait donc être un acteur de ces deux machineries.

IV. 1. c) Rôle de la double régulation de TRPM8, génomique et non génomique, dans les cellules épithéliales prostatiques

Les cellules de notre modèle LNCaP_{M8} expriment le récepteur intracellulaire aux androgènes (Horoszewicz et al., 1983). De ce fait, à la différence des cellules HEK-293_{M8}, les deux voies, génomique et non génomique, coexistent dans ce modèle : les androgènes, d'une part, stimulent l'expression de *trpm8* et, d'autre part, limitent l'activité du canal (figure 47).



A la lumière de ces faits, les effets génomiques et non génomiques des androgènes sur l'expression et l'activité du canal TRPM8 apparaissent comme strictement opposés, mais pas incompatibles. L'action génomique de la testostérone est un effet dit à long terme contrairement au mode non génomique qui peut induire des changements rapides de l'activité du canal. D'autre part, la régulation transcriptionnelle tout comme la régulation de l'activité d'un canal sont deux mécanismes complexes soumis à des réseaux de régulateurs. Ainsi, à concentration constante de testostérone dans la prostate, les cellules pourraient dans un premier temps synthétiser la protéine TRPM8 tout en maintenant son activité limitée, puis dans un second temps, sous l'action d'un stimulus, la transcription du gène *trpm8* serait modulée alors que l'activité des canaux pré-synthétisés augmenterait sous l'influence d'autres réseaux de régulation. Cette double régulation pourrait alors permettre à TRPM8 de jouer un

rôle constitutif dans la cellule, tout en ayant la possibilité d'optimiser ce rôle ou même d'acquérir une nouvelle fonction sous l'action d'un stimulus.

IV. 1. c) i. Rôle de la voie génomique de régulation de TRPM8

Les travaux de Zhang et Barritt sur l'implication de TRPM8 dans la survie des cellules prostatiques LNCaP démontrent que l'extinction du gène *trpm8* entraîne l'apoptose des cellules prostatiques (Zhang and Barritt, 2004). Ainsi, l'expression de ce canal, semble requise pour la survie des cellules épithéliales prostatiques androgéno-dépendantes. Les androgènes par la voie génomique seraient donc impliqués dans la survie des cellules prostatiques androgéno-dépendantes.

IV. 1. c) ii. Rôle de la voie non génomique de régulation de l'activité de TRPM8

Concernant la localisation plasmique de TRPM8 : Dans le paragraphe IV. b) ii), nous avons supposé que le canal TRPM8, à ce niveau, était impliqué dans la sécrétion et la prolifération des cellules épithéliales prostatiques saines et androgéno-dépendantes. Les androgènes, en fonction de leurs taux circulant et par leur voie d'action non génomique, pourraient venir moduler finement ces deux processus. Pour la sécrétion des cellules prostatiques, nous allons étudier au laboratoire l'influence de la DHT sur la sécrétion de PAP (Prostatic Acid Phosphatase, facteur prostatique sécrété par les cellules LNCaP (Gackiere et al., 2008)) des cellules LNCaP_{M8}.

Concernant la localisation réticulaire de TRPM8 : Dans le même paragraphe, nous avons supposé que le canal TRPM8, au niveau réticulaire, pouvait induire l'apoptose. Les résultats de Zhang et Barritt sur les cellules LNCaP, qui ne présentent que la forme réticulaire de TRPM8, démontrent qu'une stimulation continue du canal TRPM8 induit la mort cellulaire (Zhang and Barritt, 2004). Ainsi, ces cellules semblent avoir besoin de maintenir l'expression d'un canal TRPM8 possédant une activité de base réduite. Les androgènes, de part la double régulation, génomique et non génomique, qu'ils exercent sur TRPM8 pourraient donc avoir un rôle protecteur contre l'apoptose pour les cellules épithéliales prostatiques en permettant de stimuler l'expression tout en limitant l'activité de ce canal. Afin de vérifier cette hypothèse, nous allons tester l'impact de la voie non génomique sur l'activité de l'isoforme du canal TRPM8 enchâssée dans la membrane réticulaire.

Un tel effet paradoxal de la testostérone vis-à-vis d'un canal ionique a déjà été montré pour les canaux calciques voltage-dépendants de type T ($Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$) et de type L dans les cardiomyocytes néonataux de rat (Michels et al., 2006). Dans ces cellules, la testostérone stimule également l'expression de ces canaux par la voie génomique à long terme sensible au flutamide (inhibiteur du récepteur intracellulaire aux androgènes). Mais, à court terme, elle inhibe l'activité de ces canaux par une voie non génomique insensible au flutamide. La testostérone permettrait, de manière chronique, une activité basale de ces canaux impliqués dans l'activité pacemaker. Pour les canaux calciques voltage-dépendants de type T, des modifications dynamiques des taux d'androgènes circulants sont alors susceptibles de moduler rapidement l'activité de ces canaux (Michels et al., 2006). Pour les canaux de type L, les effets rapides abolissent totalement les effets génomiques. De ce fait, tout déplacement de la balance entre les effets rapides ou chroniques des androgènes, lors de modifications des concentrations hormonales plasmatiques, aura une incidence sur la contractibilité de ces cellules pouvant conduire à des arythmies cardiaques (Er et al., 2007).

IV. 1. d) Rôle de TRPM8 et de sa régulation non génomique dans la migration des cellules prostatiques

Nos tests de migration par la méthode des « blessures » sur les cellules PC-3_{M8} ont tout d'abord confirmé les résultats publiés par Yang *et coll.* (Yang et al., 2009), à savoir que TRPM8 diminue la migration cellulaire. Nous avons ensuite réalisé différentes conditions de traitements et nous avons observé qu'un cotraitement de dihydrotestostérone et d'iciline stimulait la migration des cellules PC-3_{M8} au point que le taux de migration de ces cellules devienne comparable à celui des cellules non transfectées. Curieusement, la DHT seule est sans effet. L'inhibition seule par la DHT de l'activité de TRPM8 n'est pas capable de stimuler la migration des PC-3_{M8}. Comment expliquer que seule la combinaison iciline/DHT ait un effet ? Le travail publié par Kühn *et coll.* montre que si l'iciline active TRPM8 à court terme, à long terme cet agoniste désensibilise le canal le rendant insensible alors au menthol ou au froid (Kuhn et al., 2009). Il est alors possible d'imaginer que, pour stimuler la migration cellulaire, il faille au préalable une entrée transitoire de calcium par TRPM8 et ensuite son inhibition par les androgènes. Du fait de l'absence de récepteur aux androgènes classique intracellulaire dans les cellules PC-3, seule la régulation non génomique entre en jeu dans ce résultat.

IV. 2. Rôle de la modulation de l'activité de TRPM8 par la voie alpha2A adrénergique dans les cellules prostatiques

Si l'expression du récepteur alpha2A adrénergique a été détectée dans les cellules épithéliales prostatiques (Slater et al., 2000), son rôle dans la physiologie de ces cellules n'est pas décrit. Tout comme pour le récepteur non génomique aux androgènes, les récepteurs alpha2A adrénergiques sont couplés aux protéines Gi et négativement à la voie AC/cAMP/PKA. Il convient donc d'étudier le rôle de la régulation adrénergique de TRPM8 dans ces cellules et de son impact sur leur physiologie. Mais il ne faudra pas oublier que la stimulation des récepteurs alpha2A adrénergiques peut également avoir un impact sur l'activité d'autres canaux, exprimés dans ces cellules, sensibles à la voie Gi et/ou AC/cAMP/PKA tels que les canaux Ca_v3.2.

IV. 3. Rôle de la modulation de l'activité de TRPM8 par la voie muscarinique dans les cellules prostatiques

Tout comme pour les récepteurs alpha2A adrénergiques, leur expression a été détectée au sein des cellules épithéliales prostatiques (pour revue Avellar et al., 2009). Leur activation a été décrite, chez le rat, comme impliquée dans la sécrétion de la glande prostatique (Wang et al., 1991). De plus, la stimulation de ces récepteurs muscariniques induit la prolifération de nombreuses lignées de cellules épithéliales prostatiques telles que les LNCaP (Rayford et al., 1997). Il est donc intéressant d'étudier le rôle de TRPM8 et de sa régulation par les récepteurs muscariniques dans la physiologie des cellules épithéliales prostatiques.

Néanmoins, il n'existe à ce jour aucun rôle connu de TRPM8 au niveau prostatique. Nous ne pouvons émettre que des hypothèses sur le rôle de ce canal dans la physiologie prostatique.

La sécrétion, la prolifération ou encore la migration cellulaire étant régulés par les neuromodulateurs, il est tout à fait envisageable que ces voies influent sur ces processus physiologiques en modulant l'activité de TRPM8.

Il faut ajouter à cela que nos études ne se sont intéressées qu'à la forme membranaire et complète de TRPM8. Il existe également diverses isoformes de ce canal dont la régulation par les androgènes et les neuromodulateurs reste encore inconnue. L'isoforme tronquée réticulaire décrite en introduction présentant une expression androgéno-indépendante, on peut supposer

que dans les cancers tardifs, les voies de modulation que nous avons décrites puissent continuer à jouer un rôle en régulant les isoformes de TRPM8.

IV. 4. TRPM8 est il alors bon ou mauvais pour la prostate ?

Du fait de l'augmentation de l'expression de *trpm8* au cours de la phase androgéno-dépendante de la cancérogenèse prostatique (Tsavaler et al., 2001), il était envisageable de conférer à la présence du canal TRPM8 au niveau de cet organe un aspect négatif. De plus, les travaux de Zhang et Barritt viennent appuyer cette première impression. Leurs conclusions montraient l'importance de TRPM8 dans la survie des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses (Zhang and Barritt, 2004). Mais nos données viennent remettre en cause cette hypothèse :

- L'expression et la limitation de l'activité de ce canal, conditions permettant la survie de ces cellules, sont sous la dépendance des voies de régulations génomiques et non génomiques des androgènes.
- Les cellules PC-3_{M8} présentent un taux de migration nettement diminué par rapport aux cellules PC-3 non transfectées (Yang et al., 2009). TRPM8 limite donc la migration des cellules. Mais un traitement DHT/iciline restaure, par la voie non génomique, un taux normal de migration.

Donc si TRPM8 est important pour la survie des cellules cancéreuses prostatiques, il limite néanmoins la migration de ces cellules. Par contre, les androgènes diminuent leur apoptose et stimulent leur migration, deux conditions primordiales pour une cellule cancéreuse métastatique. C'est donc plutôt, pour les cellules cancéreuses prostatiques, non pas TRPM8 lui-même mais sa double régulation androgénique et le récepteur non génomique membranaire aux androgènes de ces cellules qui confèrent à TRPM8 son caractère négatif pour la physiopathologie prostatique.

Mais nos résultats ont été obtenus en travaillant uniquement sur la forme classique (longue) et plasmique de TRPM8. Il convient donc de tester les régulations non génomiques par les androgènes, les modulations par les récepteurs alpha2A adrénergiques et muscariniques sur les isoformes de TRPM8 telles que l'isoforme réticulaire. Cela s'avère important pour les cellules prostatiques cancéreuses androgéno-indépendantes qui ne possèdent que l'isoforme réticulaire de TRPM8.

Cette thèse portait sur l'étude et la recherche des modulateurs physiologiques et voies de régulation du canal TRPM8 aussi bien au niveau sensoriel que prostatique. Je vais dans cette partie donner les axes de recherches qui vont être développés afin de continuer et compléter les résultats que j'ai obtenus au cours de ces quatre années.

I. Recherche du récepteur aux androgènes membranaire impliqué dans l'inhibition non génomique de TRPM8

Aussi bien au niveau sensoriel que prostatique, nous avons mis en évidence une régulation non génomique de TRPM8 par une voie de transduction impliquant les protéines G_i et bloquant la signalisation AC/cAMP/PKA. Il convient maintenant de rechercher, identifier et caractériser le récepteur membranaire à l'origine de cet effet. Du fait que lors des expériences de « *binding* » nous n'avions observé de signal que pour les fractions membranaires de cellules HEK-293_{M8} induites, il serait intéressant de comparer par une approche de balayage, par puces d'ADN, les ARNm des récepteurs couplés aux protéines G présents dans les cellules HEK-293_{M8} induites versus non induites. De cette comparaison pourrait ressortir des candidats uniquement présents à la membrane des cellules HEK-293_{M8} induites. Il suffirait alors par une stratégie d'ARN interférence de tester chacun de ces candidats afin d'identifier celui responsable de l'inhibition testostérone-dépendante de TRPM8.

Si une telle théorie se vérifie, suite à l'identification du récepteur, il conviendra de déterminer sa capacité de liaison (B_{max}) ainsi que sa constante de dissociation à l'équilibre (K_d). Ce nouveau récepteur ainsi caractérisé dans les cellules HEK-293_{M8}, il faudra ensuite vérifier que celui responsable de l'inhibition testostérone-dépendante de TRPM8 dans les neurones sensoriels de DRG et dans les cellules épithéliales prostatiques est bien le même.

Il sera également intéressant de réaliser des injections de siARN contre ce récepteur afin d'étudier la pertinence de celui-ci *in vivo* dans la sensibilité au froid des rats mâles.

II. Origine du dimorphisme sexuel vis-à-vis de la sensibilité au froid

Nous n'avons pas mis en évidence dans les cellules HEK-293_{M8} d'effet des œstrogènes sur le canal TRPM8. Or, nous avons observé une différence *in vivo* de sensibilité au froid entre mâles et femelles qui n'est pas altérée par l'ajout de testostérone. Ces observations suggèrent un autre mécanisme de régulation de TRPM8 chez les animaux femelles.

Un récent article, publié par une équipe ukrainienne, auquel nous n'avons pas accès au moment de l'écriture de ce manuscrit semble décrire un dimorphisme sexuel pour cette

modalité sensorielle. Ils ont observé une plus grande sensibilité au froid chez les femelles. Ils enregistrent également une potentialisation de l'activité de TRPM8 par un décalage de la courbe d'activation du canal vers des potentiels plus physiologiques (hyperpolarisés) par l'application d'œstrogènes sur les neurones sensoriels fraîchement isolés de ces rats femelles (*noms des auteurs non communiqués*, (2009)). Cette étude semble donc supposer l'existence d'un effet non génomique des œstrogènes sur l'activité de TRPM8 uniquement au sein des neurones sensoriels de rats femelles. Il est donc possible qu'il existe un récepteur aux œstrogènes membranaire exprimé dans les neurones des femelles et absent des cellules HEK-293_{M8}. Un candidat possible de récepteur non génomique membranaire couplé aux protéines G affin pour les œstrogènes est le récepteur GPR30 (Carmeci et al., 1997; O'Dowd et al., 1998). Ce récepteur aux protéines G membranaire semble être couplé positivement à l'adénylate cyclase et de ce fait, en stimulant la production de cAMP, active la PKA (Filardo et al., 2002). Nous avons démontré que le canal TRPM8, afin d'avoir une activité optimale, nécessite d'être phosphorylé par la PKA. La stimulation de GPR30 pourrait donc potentialiser l'activité de TRPM8 en assurant sa phosphorylation par la PKA. Ce candidat semble donc intéressant à étudier pour enfin expliciter le dimorphisme sexuel existant concernant la sensibilité au froid.

III. Rôle des voies de régulation PKA dépendante sur l'activité d'autres canaux TRP sensibles à cette kinase intracellulaire

Nos résultats ont démontré pour la première fois une régulation de TRPM8 par la voie Gi/AC/cAMP/PKA. D'autres canaux TRP ont été décrits comme modulés par la PKA : TRPV1 (Schnitzler et al., 2008), TRPML1 (Vergarajauregui et al., 2008), TRPV6 (Borthwick et al., 2008), TRPV2 (Stokes et al., 2004), TRPV5 (de Groot et al., 2009) et TRPV4 (Fan et al., 2009). Jusqu'ici aucun canal TRP n'a été démontré comme modulé ni par une voie alpha2A adrénergique ni par une voie non génomique impliquant les androgènes. Il serait donc intéressant de tester la stimulation de ces deux types de récepteurs sur l'activité de ces canaux TRP sensibles à la PKA. Une telle étude permettrait de mettre en évidence de nouveaux modes de régulation de ces canaux.

IV. Implication des voies de régulation non génomique, alpha2A adrénergique et muscarinique dans la douleur

IV. 1. L'hyperalgésie au chaud

TRPV1 et TRPV4 sont tous deux des thermorécepteurs activés par de hautes températures (pour revue (Caterina et al., 1997; Guler et al., 2002)). Ils sont également impliqués dans la nociception. En effet, TRPV1 est activé par des stimuli douloureux tels que des températures supérieures à 43°C, la capsaïcine (extrait du piment) et un pH acide (<5.9) (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). La sensibilité à l'hyperalgésie thermique est fortement diminuée chez les souris TRPV1^{-/-} (Davis et al., 2000). TRPV4 est activé pour des températures chaudes supérieures à 27°C (Guler et al., 2002) mais aussi par des pH acides (Suzuki et al., 2003a). Les souris TRPV4^{-/-} sont moins sensibles à l'inflammation et à l'hyperalgésie thermique induites par la capsaïcine (Todaka et al., 2004).

Ces canaux étant tous deux sensibilisés par la phosphorylation par PKA. La stimulation des voies alpha2A adrénergique, muscarinique (M2 et M4) et androgénique non génomique qui modulent la PKA peut donc avoir un impact sur l'activité de TRPV1 et TRPV4. Tester cette hypothèse permettrait de mettre en évidence de nouveaux modulateurs, tels que les androgènes et neuromédiateurs, et mécanismes de régulation des canaux TRPV1 et TRPV4. A terme, si la voie non génomique testostérone-dépendante est valable pour ces canaux et, comme on peut l'imaginer, inhibe leur activité, cela apporterait une première explication du dimorphisme sexuel face à la douleur, où les sujets mâles sont moins sensibles que les femelles (Mogil et al., 2000).

IV. 2. L'allodynie au froid et le modèle de lésions/constrictions de nerfs sensitifs (CCI)

Les stimulations des voies muscariniques et alpha2-adrénergiques ont été impliquées dans l'analgésie dans le cadre de l'allodynie au froid (Kim et al., 2005; Park et al., 2009; Poyhia et al., 1999). Nous avons démontré que la clonidine et l'oxotrémorine-M, respectivement agonistes des récepteurs alpha2A adrénergiques et muscariniques, inhibent le canal TRPM8. Les effets anti-nociceptifs constatés pour ces deux voies peuvent donc être dus à la diminution d'activité du récepteur au froid. Nos travaux apporteraient donc une explication de l'analgésie alpha2A adrénergique- et muscarinique-dépendante lors de l'allodynie au froid. Néanmoins, le rôle de TRPM8 dans ce phénomène de douleurs neuropathiques reste controversé. Il conviendrait donc dans un premier temps de réaliser des tests *in vivo*

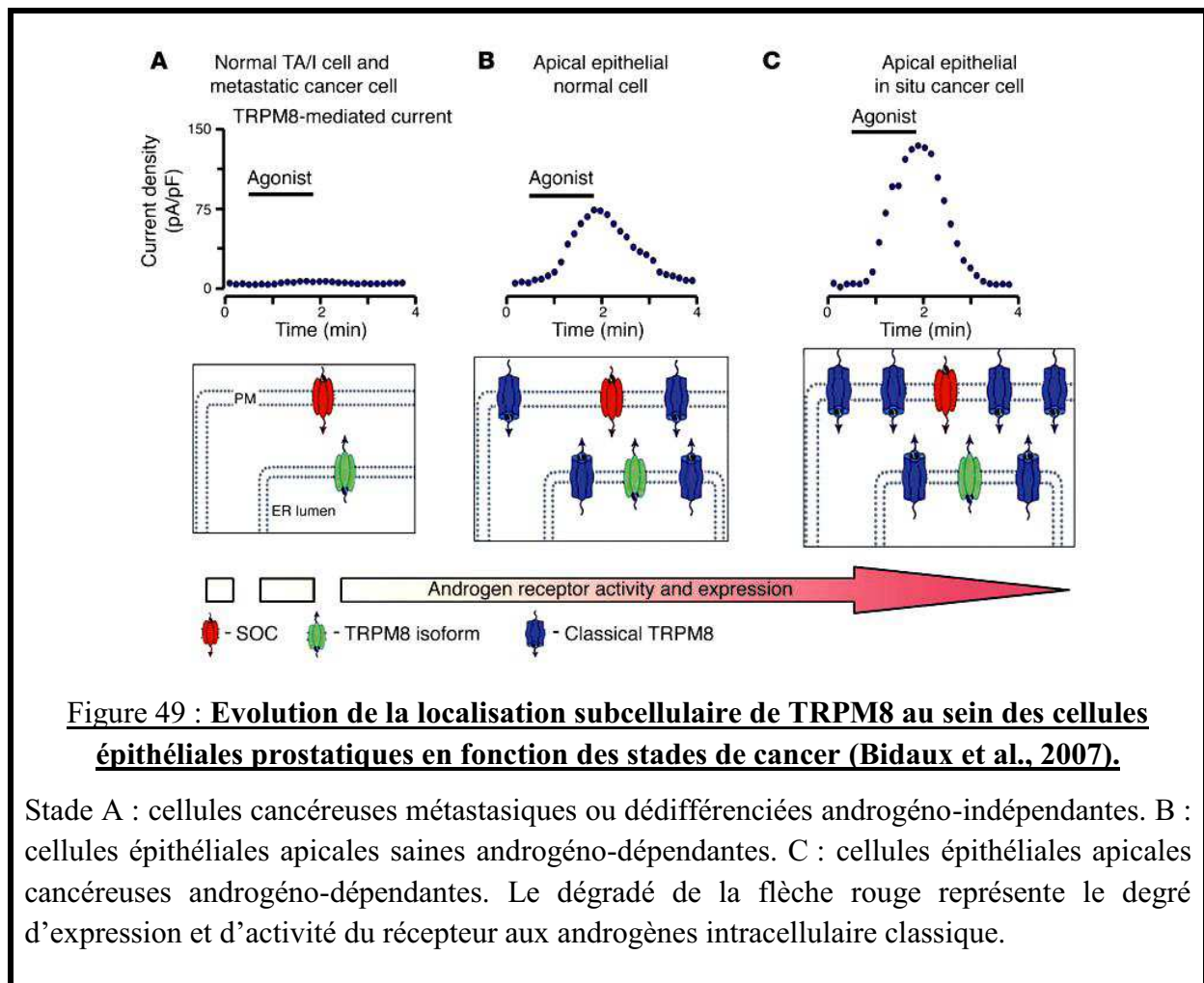
(application d'acétone sur la plante d'une patte, test d'immersion de la queue et test de préférence de plaques) sur les souris KO pour TRPM8 ayant subies ou non une lésion ou constriction de nerf (CCI). Cette première étape a pour but de déterminer si le canal TRPM8 est bien impliqué dans l'allodynie au froid et si oui de connaître si ce canal est responsable de l'hypersensibilité au froid (théorie de (Xing et al., 2007)) ou de l'analgésie (théorie de (Proudfoot et al., 2006)). Si il s'avère, comme nous le pensons, que TRPM8 est bien impliqué dans l'hypersensibilité douloureuse constatée lors de l'allodynie au froid, par des injections de clonidine ou d'oxotrémorine-M chez les souris KO TRPM8 *versus* souris sauvages, nous tenterons de démontrer que le rôle des voies alpha2A adrénergiques et muscariniques dans l'analgésie passe bien par l'inhibition de TRPM8.

La modulation non génomique testostérone-dépendante de TRPM8 aboutit également à l'inhibition du récepteur au froid. De ce fait, cette voie peut potentiellement être impliquée dans l'analgésie lors de l'allodynie au froid. A l'aide d'injections de siARN anti récepteur membranaire aux androgènes et en adoptant la même démarche que celle décrite ci-dessus, nous tenterons de connaître l'implication possible des androgènes, via leur mode d'action non génomique et leur récepteur membranaire, dans l'analgésie. Cette étude permettrait alors d'expliquer également dimorphisme sexuel face à la douleur.

V. Perspectives pour la physiopathologie prostatique

Le premier impératif sera d'identifier le récepteur membranaire aux androgènes responsable des effets non génomiques de la testostérone sur TRPM8. Parallèlement, nous allons continuer les travaux sur l'implication de la voie non génomique dans la migration des cellules prostatiques. Nous testerons également l'hypothèse que nous avons décrite dans la discussion sur le quatrième article, à savoir si les androgènes protégeaient les cellules cancéreuses prostatiques de l'apoptose. De ces investigations nous espérons montrer le rôle de la régulation non génomique de TRPM8, et par conséquent du récepteur membranaire aux androgènes, dans la physiologie des cellules cancéreuses prostatiques.

Toutes nos investigations ont été réalisées sur la forme classique (entière) et plasmique du canal TRPM8. Or, comme décrit en introduction, au cours du développement du cancer de la prostate, il existe une évolution de la localisation subcellulaire de TRPM8 (figure 49).



Stade A : cellules cancéreuses métastatiques ou dédifférenciées androgéno-indépendantes. B : cellules épithéliales apicales saines androgéno-dépendantes. C : cellules épithéliales apicales cancéreuses androgéno-dépendantes. Le dégradé de la flèche rouge représente le degré d'expression et d'activité du récepteur aux androgènes intracellulaire classique.

Dans les cellules épithéliales prostatiques il existe donc, comme représenté sur la figure 49, au moins deux formes de TRPM8 dont la localisation évolue en fonction des stades de cancer :

- La forme classique qui est présente à la membrane réticulaire et plasmique des cellules saines et cancéreuses androgéno-dépendantes. Cette forme est surexprimée à la membrane plasmique des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes mais disparaît aussi bien au niveau plasmique que réticulaire dans les cellules cancéreuses androgéno-indépendantes (Bidaux et al., 2007).
- L'isoforme réticulaire qui est présente à la membrane du réticulum endoplasmique dans les trois stades (Bidaux et al., 2007).

Nous connaissons donc l'effet de la régulation non génomique de la testostérone sur la forme classique membranaire. Nous devons maintenant étudier l'impact de cette voie androgénique de modulation non génomique sur l'activité de l'isoforme réticulaire de TRPM8. Si un effet

non génomique des androgènes est détecté sur l'activité de cette isoforme, ceci va ouvrir la voie à de très intéressantes investigations sur le rôle du récepteur aux androgènes membranaire, *via* son impact sur l'activité de la forme classique et de l'isoforme réticulaire de TRPM8, sur la physiologie des cellules prostatiques cancéreuses androgéno-dépendantes et androgéno-indépendantes.

La voie non génomique d'inhibition de TRPM8 semble fonctionner sur la migration des cellules PC-3_{M8}. Ces cellules sont dépourvues de récepteur aux androgènes intracellulaire. De ce fait, nous pensons que la régulation non génomique de TRPM8 dans les cellules épithéliales prostatiques ne passe pas par le récepteur aux androgènes classique transloqué à la membrane mais par un nouveau récepteur membranaire couplé aux protéines Gi. Des tests avec le Casodex, un inhibiteur classique du récepteur intracellulaire, et des siARN anti-récepteur aux androgènes classique, nous permettront de vérifier cette hypothèse. Si notre théorie s'avère correcte, les expériences concernant le rôle de ce nouveau récepteur dans la physiologie des cellules prostatiques androgéno-dépendantes et androgéno-indépendantes devront être réalisées en présence de Casodex pour discriminer entre les effets génomiques et non génomiques sur la physiologie de ces cellules. De tels travaux pourraient permettre, à terme, de proposer ce nouveau récepteur membranaire comme cible thérapeutique et d'élaborer de nouvelles stratégies visant ce récepteur non génomique différentes de celles connues jusqu'ici et qui se focalisent uniquement sur le récepteur intracellulaire classique.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence de nouvelles voies physiologiques de régulations de TRPM8 aussi bien au niveau sensoriel que prostatique. Nous avons également détecté l'existence d'un récepteur membranaire couplé aux protéines Gi, spécifique aux androgènes, à l'origine d'effets non génomiques, et différent de ceux proposés dans la littérature.

Nos données alliées à celles de la littérature montre que le canal TRPM8 est donc un canal polymodal au carrefour de plusieurs voies de régulation impliquant des récepteurs (alpha2A adrénergiques, bêta adrénergiques, muscariniques et aux androgènes non génomique) couplés aux protéines G (Gi, Gs, Gq), des partenaires intracellulaires (PIP2) et des enzymes telles que des kinases (PKA, PKC) et phospholipases (PLC, iPLA2 et cPLA2).

Ces résultats, même s'ils sont encore fondamentaux, permettront je l'espère d'apporter du point de vue de l'expression sensorielle de TRPM8 une explication à plusieurs phénomènes décrits dans la littérature. Nos données sur la régulation non génomique de TRPM8 par les androgènes pourraient expliquer les variabilités inter-individuelles ainsi que les différences dues à l'âge, au sexe, ou à l'hormonothérapie vis-à-vis de la perception du froid. Nous proposons aussi que la modulation de l'activité de TRPM8 par la stimulation des récepteurs alpha2A adrénergiques par la clonidine ou des récepteurs muscariniques par l'oxotrémorine-M soit impliquée dans l'analgésie lors de l'allodynie au froid.

Au niveau de la prostate, nous avons démontré que la forme classique et plasmique de TRPM8 est bien régulée par les trois voies que nous avons mises en évidence. Nous avons démontré que la régulation non génomique par la testostérone de TRPM8 stimule la migration des cellules cancéreuses prostatiques. L'identification du récepteur non génomique s'avère donc primordial car, au vue de nos résultats, il peut être une cible intéressante pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques différentes de celles connues pour le récepteur intracellulaire classique.

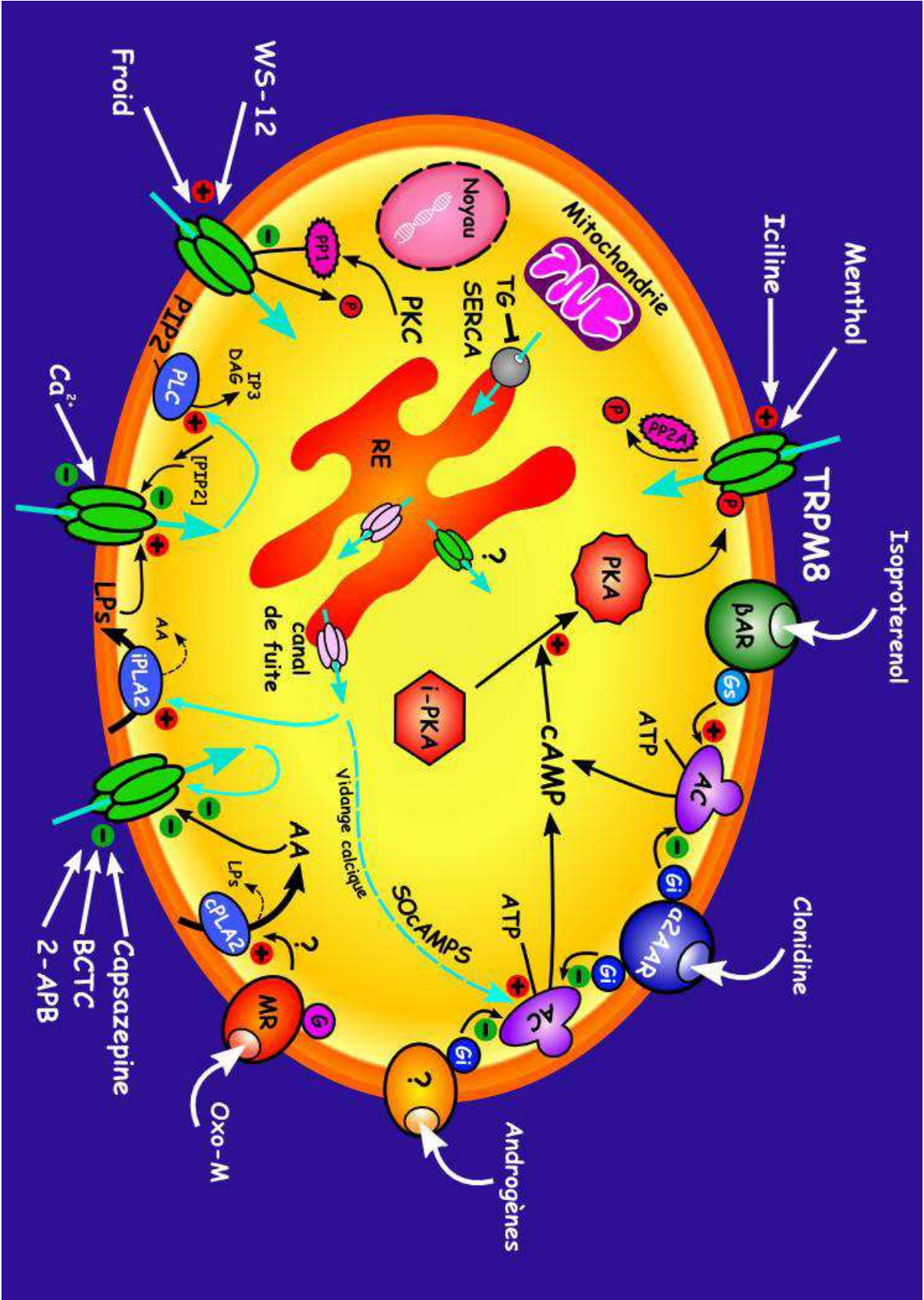
SCHEMA RECAPITULATIF FINAL

Figure 50: Schéma récapitulatif des voies de modulation de TRPM8 connues et mises en évidence dans ce travail.

Abréviations : TG : thapsigargine ; SERCA : Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase ; P : phosphate ; PP2A / PP1 : protéine phosphatase 2A et 1 ; RE : réticulum endoplasmique ; PKC : protein kinase C ; β AR : récepteur β adrénergique ; AC : adénylate cyclase ; PKA : protéine kinase A ; i-PKA : PKA inactive ; α 2AAR : alpha2A adrénorécepteurs ; ATP : adénosine triphosphate ; cAMP : adénosine monophosphate cyclique ; LPs : lysophospholipides ; AA : acide arachidonique ; PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PLC : phospholipase C ; iPLA2 : phospholipase A2 calcium-indépendante ; cPLA2 : phospholipase A2 calcium-dépendante ; IP3 : inositol triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; MR : récepteur muscarinique ; WS-12 : 2-isopropyl-5-methyl-cyclohexanecarboxylic acid (4-methoxy-phenyl)-amide ; 2-APB : 2-aminoethoxydiphenyl borate ; BCTC : *N*-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl) tetrahydropyrazine-1(2*H*)-carboxamide. Les mouvements de calcium sont représentés par les flèches de couleur cyan.

« ? » Parties non élucidées de ce schéma, à savoir :

- ✓ la nature moléculaire du récepteur membranaire aux androgènes,
- ✓ le mécanisme d'activation de la cPLA2 par les récepteurs muscariniques
- ✓ et l'impact des ces voies de modulation sur les canaux TRPM8 (forme normale et isoforme réticulaire) enchâssés dans la membrane du réticulum endoplasmique.



Bavencoffe, A., Gkika, D., Kondratskyi, A., Beck, B., Borowiec, A., Bidaux, G., Busserolles, J., Eschalier, A., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2009) TRPM8 regulation by Alpha2A adrenoreceptors. *Journal of Biological Chemistry*, en revision.

Bavencoffe*, A., Gkika*, D., Busserolles*, J., Kondratskyi, A., Zholos, A., Chapuy, E., Etienne, M., Eschalier, A., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2009) Testosterone is a key regulator of TRPM8-mediated cold perception. *Cell*, en révision (*: coauteurs).

Beck, B., Bidaux, G., Bavencoffe, A., Lemonnier, L., Thebault, S., Shuba, Y., Barrit, G., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2006). Prospects for prostate cancer imaging and therapy using highaffinity TRPM8 activators. *Cell Calcium*, **41**, 285 - 294.

Gackière, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Tran Van Chuoi-Mariot, M., Mauroy, B., Prevarskaya, N., Mariot, P. (2008) CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 10162-10173.

Lallet*, H., Roudbaraki*, M., Bavencoffe, A., Mariot, P., Gackière, F., Bidaux, G., Urbain, R., Gosset, P., Delcourt, P., Slomianny, C., Dewailly, E., Mauroy, B., Bonnal, JL., Skryma, R., Prevarskaya, N. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IK_{Ca1}) regulate human prostate cancer cells proliferation *via* a close control of calcium entry. *Oncogene*, **28**, 1792-1806 (*: coauteurs).

Thebault*, S., Lemonnier*, L., Bidaux*, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R., Prevarskaya, N. (2005) Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 39423-39435 (*: coauteurs).

- (2009). [Gender differences in cold sensitivity: role of hormonal regulation of TRPM8 channel]. *Fiziol Zh* **55**, 91-9.
- Abe, J., Hosokawa, H., Okazawa, M., Kandachi, M., Sawada, Y., Yamanaka, K., Matsumura, K. and Kobayashi, S.** (2005). TRPM8 protein localization in trigeminal ganglion and taste papillae. *Brain Res Mol Brain Res* **136**, 91-8.
- Abe, J., Hosokawa, H., Sawada, Y., Matsumura, K. and Kobayashi, S.** (2006). Ca²⁺-dependent PKC activation mediates menthol-induced desensitization of transient receptor potential M8. *Neurosci Lett* **397**, 140-4.
- Abriel, H.** (2009). Cardiac sodium channel Na(v)1.5 and interacting proteins: Physiology and pathophysiology. *J Mol Cell Cardiol*.
- Adams, P. J., Garcia, E., David, L. S., Mulatz, K. J., Spacey, S. D. and Snutch, T. P.** (2009). Ca(V)2.1 P/Q-type calcium channel alternative splicing affects the functional impact of familial hemiplegic migraine mutations: implications for calcium channelopathies. *Channels (Austin)* **3**, 110-21.
- Anderson, P. A. and Greenberg, R. M.** (2001). Phylogeny of ion channels: clues to structure and function. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **129**, 17-28.
- Andersson, D. A., Chase, H. W. and Bevan, S.** (2004). TRPM8 activation by menthol, icilin, and cold is differentially modulated by intracellular pH. *J Neurosci* **24**, 5364-9.
- Andersson, D. A., Nash, M. and Bevan, S.** (2007). Modulation of the cold-activated channel TRPM8 by lysophospholipids and polyunsaturated fatty acids. *J Neurosci* **27**, 3347-55.
- Ashcroft, F. M.** (2006). From molecule to malady. *Nature* **440**, 440-7.
- Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., William C. Hall, P. D., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., Mooney, R. D., Platt, M. L., Purves, D., Simon, S. A., White, L. E. et al.** (2001). Neuroscience.
- Avellar, M. C., Lazari, M. F. and Porto, C. S.** (2009). Expression and function of G-protein-coupled receptors in the male reproductive tract. *An Acad Bras Cienc* **81**, 321-44.
- Babes, A., Zorzon, D. and Reid, G.** (2004). Two populations of cold-sensitive neurons in rat dorsal root ganglia and their modulation by nerve growth factor. *Eur J Neurosci* **20**, 2276-82.
- Babes, A., Zorzon, D. and Reid, G.** (2006). A novel type of cold-sensitive neuron in rat dorsal root ganglia with rapid adaptation to cooling stimuli. *Eur J Neurosci* **24**, 691-8.
- Bandell, M., Dubin, A. E., Petrus, M. J., Orth, A., Mathur, J., Hwang, S. W. and Patapoutian, A.** (2006). High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci* **9**, 493-500.
- Bantel, C., Eisenach, J. C., Duflo, F., Tobin, J. R. and Childers, S. R.** (2005). Spinal nerve ligation increases alpha2-adrenergic receptor G-protein coupling in the spinal cord. *Brain Res* **1038**, 76-82.
- Baroudi, G., Acharfi, S., Larouche, C. and Chahine, M.** (2002). Expression and intracellular localization of an SCN5A double mutant R1232W/T1620M implicated in Brugada syndrome. *Circ Res* **90**, E11-6.
- Baroudi, G., Pouliot, V., Denjoy, I., Guicheney, P., Shrier, A. and Chahine, M.** (2001). Novel mechanism for Brugada syndrome: defective surface localization of an SCN5A mutant (R1432G). *Circ Res* **88**, E78-83.
- Bartoshuk, L. M., Rennert, K., Rodin, J. and Stevens, J. C.** (1982). Effects of temperature on the perceived sweetness of sucrose. *Physiol Behav* **28**, 905-10.

- Bassi, M. T., Manzoni, M., Monti, E., Pizzo, M. T., Ballabio, A. and Borsani, G.** (2000). Cloning of the gene encoding a novel integral membrane protein, mucolipidin-and identification of the two major founder mutations causing mucopolidosis type IV. *Am J Hum Genet* **67**, 1110-20.
- Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E. and Julius, D.** (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* **448**, 204-8.
- Bayon, Y., Hernandez, M., Alonso, A., Nunez, L., Garcia-Sancho, J., Leslie, C., Sanchez Crespo, M. and Nieto, M. L.** (1997). Cytosolic phospholipase A2 is coupled to muscarinic receptors in the human astrocytoma cell line 1321N1: characterization of the transducing mechanism. *Biochem J* **323** (Pt 1), 281-7.
- Beato, M., Chavez, S. and Truss, M.** (1996). Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* **61**, 240-51.
- Beck, B., Bidaux, G., Bavencoffe, A., Lemonnier, L., Thebault, S., Shuba, Y., Barrit, G., Skryma, R. and Prevarskaya, N.** (2007). Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators. *Cell Calcium* **41**, 285-94.
- Bernard, G. and Shevell, M. I.** (2008). Channelopathies: a review. *Pediatr Neurol* **38**, 73-85.
- Berridge, M. J.** (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-25.
- Berridge, M. J.** (1995). Capacitative calcium entry. *Biochem J* **312** (Pt 1), 1-11.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Lipp, P.** (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* **395**, 645-8.
- Berson, D. M., Dunn, F. A. and Takao, M.** (2002). Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**, 1070-3.
- Bidaux, G., Flourakis, M., Thebault, S., Zholos, A., Beck, B., Gkika, D., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y. et al.** (2007). Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest* **117**, 1647-57.
- Bidaux, G., Roudbaraki, M., Merle, C., Crepin, A., Delcourt, P., Slomianny, C., Thebault, S., Bonnal, J. L., Benahmed, M., Cabon, F. et al.** (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* **12**, 367-82.
- Birder, L. A. and Perl, E. R.** (1999). Expression of alpha2-adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. *J Physiol* **515** (Pt 2), 533-42.
- Borthwick, L. A., Neal, A., Hobson, L., Gerke, V., Robson, L. and Muimo, R.** (2008). The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium* **44**, 147-57.
- Brauchi, S., Orio, P. and Latorre, R.** (2004). Clues to understanding cold sensation: thermodynamics and electrophysiological analysis of the cold receptor TRPM8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15494-9.
- Brauchi, S., Orta, G., Salazar, M., Rosenmann, E. and Latorre, R.** (2006). A hot-sensing cold receptor: C-terminal domain determines thermosensation in transient receptor potential channels. *J Neurosci* **26**, 4835-40.
- Cantiello, H. F., Montalbetti, N., Goldmann, W. H., Raychowdhury, M. K., Gonzalez-Perrett, S., Timpanaro, G. A. and Chasan, B.** (2005). Cation channel activity of mucolipin-1: the effect of calcium. *Pflugers Arch* **451**, 304-12.
- Cao, G., van der Wijst, J., van der Kemp, A., van Zeeland, F., Bindels, R. J. and Hoenderop, J. G.** (2009). Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and

the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). *J Biol Chem* **284**, 14788-95.

Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U. and Weigel, R. J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* **45**, 607-17.

Carr, D. B., Andrews, G. D., Glen, W. B. and Lavin, A. (2007). alpha2-Noradrenergic receptors activation enhances excitability and synaptic integration in rat prefrontal cortex pyramidal neurons via inhibition of HCN currents. *J Physiol* **584**, 437-50.

Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D. and Heppenstall, P. A. (2009). The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS One* **4**, e7383.

Caterina, M. J., Leffler, A., Malmberg, A. B., Martin, W. J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K. R., Koltzenburg, M., Basbaum, A. I. and Julius, D. (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306-13.

Caterina, M. J., Rosen, T. A., Tominaga, M., Brake, A. J. and Julius, D. (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* **398**, 436-41.

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D. and Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-24.

Catterall, W. A., Goldin, A. L. and Waxman, S. G. (2003a). International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of voltage-gated ion channels: sodium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 575-8.

Catterall, W. A., Striessnig, J., Snutch, T. P. and Perez-Reyes, E. (2003b). International Union of Pharmacology. XL. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 579-81.

Caulfield, M. P. and Birdsall, N. J. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**, 279-90.

Caulfield, M. P., Robbins, J., Higashida, H. and Brown, D. A. (1993). Postsynaptic actions of acetylcholine: the coupling of muscarinic receptor subtypes to neuronal ion channels. *Prog Brain Res* **98**, 293-301.

Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. and Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* **444**, 288-94.

Chen, W. C. and Chen, C. C. (1999). Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts: role of Ca²⁺ and the protein kinase C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **140**, 1639-48.

Choi, Y., Yoon, Y. W., Na, H. S., Kim, S. H. and Chung, J. M. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* **59**, 369-76.

Christensen, A. P. and Corey, D. P. (2007). TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nat Rev Neurosci* **8**, 510-21.

Chuang, H. H., Neuhauser, W. M. and Julius, D. (2004). The super-cooling agent icilin reveals a mechanism of coincidence detection by a temperature-sensitive TRP channel. *Neuron* **43**, 859-69.

Chubanov, V., Schlingmann, K. P., Waring, J., Heinzinger, J., Kaske, S., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M. and Gudermann, T. (2007). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia due to a missense mutation in the putative pore-forming region of TRPM6. *J Biol Chem* **282**, 7656-67.

Chubanov, V., Waldegger, S., Mederos y Schnitzler, M., Vitzthum, H., Sassen, M. C., Seyberth, H. W., Konrad, M. and Gudermann, T. (2004). Disruption of

TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2894-9.

Clapham, D. E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517-24.

Cliff, M. A. and Green, B. G. (1994). Sensory irritation and coolness produced by menthol: evidence for selective desensitization of irritation. *Physiol Behav* **56**, 1021-9.

Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone, D. J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R., Brandt, M. R., Liu, Y., Flores, C. M. and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* **54**, 379-86.

Conklin, B. R., Brann, M. R., Buckley, N. J., Ma, A. L., Bonner, T. I. and Axelrod, J. (1988). Stimulation of arachidonic acid release and inhibition of mitogenesis by cloned genes for muscarinic receptor subtypes stably expressed in A9 L cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8698-702.

Conklin, B. R., Chabre, O., Wong, Y. H., Federman, A. D. and Bourne, H. R. (1992). Recombinant Gq alpha. Mutational activation and coupling to receptors and phospholipase C. *J Biol Chem* **267**, 31-4.

Corey, D. P. (2003). New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron* **39**, 585-8.

Corey, D. P., Garcia-Anoveros, J., Holt, J. R., Kwan, K. Y., Lin, S. Y., Vollrath, M. A., Amalfitano, A., Cheung, E. L., Derfler, B. H., Duggan, A. et al. (2004). TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* **432**, 723-30.

Cuajungco, M. P. and Samie, M. A. (2008). The varitint-waddler mouse phenotypes and the TRPML3 ion channel mutation: cause and consequence. *Pflugers Arch* **457**, 463-73.

Cummins, T. R., Aglieco, F., Renganathan, M., Herzog, R. I., Dib-Hajj, S. D. and Waxman, S. G. (2001). Nav1.3 sodium channels: rapid repriming and slow closed-state inactivation display quantitative differences after expression in a mammalian cell line and in spinal sensory neurons. *J Neurosci* **21**, 5952-61.

Cummins, T. R. and Waxman, S. G. (1997). Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* **17**, 3503-14.

Damann, N., Voets, T. and Nilius, B. (2008). TRPs in our senses. *Curr Biol* **18**, R880-9.

Davis, J. B., Gray, J., Gunthorpe, M. J., Hatcher, J. P., Davey, P. T., Overend, P., Harries, M. H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K. et al. (2000). Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* **405**, 183-7.

De Blas, G. A., Darszon, A., Ocampo, A. Y., Serrano, C. J., Castellano, L. E., Hernandez-Gonzalez, E. O., Chirinos, M., Larrea, F., Beltran, C. and Trevino, C. L. (2009). TRPM8, a versatile channel in human sperm. *PLoS One* **4**, e6095.

de Groot, T., Lee, K., Langeslag, M., Xi, Q., Jalink, K., Bindels, R. J. and Hoenderop, J. G. (2009). Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* **20**, 1693-704.

de la Pena, E., Malkia, A., Cabedo, H., Belmonte, C. and Viana, F. (2005). The contribution of TRPM8 channels to cold sensing in mammalian neurones. *J Physiol* **567**, 415-26.

Deng, X., Wang, Y., Zhou, Y., Soboloff, J. and Gill, D. L. (2009). STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals. *J Biol Chem* **284**, 22501-5.

Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J. and Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* **54**, 371-8.

- Dhaka, A., Viswanath, V. and Patapoutian, A.** (2006). Trp ion channels and temperature sensation. *Annu Rev Neurosci* **29**, 135-61.
- Di Palma, F., Belyantseva, I. A., Kim, H. J., Vogt, T. F., Kachar, B. and Noben-Trauth, K.** (2002). Mutations in Mcoln3 associated with deafness and pigmentation defects in varitint-waddler (Va) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14994-9.
- Dib-Hajj, S., Black, J. A., Felts, P. and Waxman, S. G.** (1996). Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14950-4.
- Dib-Hajj, S. D., Fjell, J., Cummins, T. R., Zheng, Z., Fried, K., LaMotte, R., Black, J. A. and Waxman, S. G.** (1999). Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* **83**, 591-600.
- Doeland, H. J., Nauta, J. J., van Zandbergen, J. B., van der Eerden, H. A., van Diemen, N. G., Bertelsmann, F. W. and Heimans, J. J.** (1989). The relationship of cold and warmth cutaneous sensation to age and gender. *Muscle Nerve* **12**, 712-5.
- Dragoni, I., Guida, E. and McIntyre, P.** (2006). The cold and menthol receptor TRPM8 contains a functionally important double cysteine motif. *J Biol Chem* **281**, 37353-60.
- Duncan, L. M., Deeds, J., Hunter, J., Shao, J., Holmgren, L. M., Woolf, E. A., Tepper, R. I. and Shyjan, A. W.** (1998). Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* **58**, 1515-20.
- Dunn, J. F., Nisula, B. C. and Rodbard, D.** (1981). Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **53**, 58-68.
- Eccles, R.** (1992). Nasal airway resistance and nasal sensation of airflow. *Rhinol Suppl* **14**, 86-90.
- Eisenach, J. C., De Kock, M. and Klimscha, W.** (1996). alpha(2)-adrenergic agonists for regional anesthesia. A clinical review of clonidine (1984-1995). *Anesthesiology* **85**, 655-74.
- El-Yassimi, A., Hichami, A., Besnard, P. and Khan, N. A.** (2008). Linoleic acid induces calcium signaling, Src kinase phosphorylation, and neurotransmitter release in mouse CD36-positive gustatory cells. *J Biol Chem* **283**, 12949-59.
- Elzanaty, S., Richthoff, J., Malm, J. and Giwercman, A.** (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Hum Reprod* **17**, 2904-11.
- Er, F., Michels, G., Brandt, M. C., Khan, I., Haase, H., Eicks, M., Lindner, M. and Hoppe, U. C.** (2007). Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* **41**, 467-77.
- Exton, J. H.** (1996). Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 481-509.
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M.** (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* **52**, 513-56.
- Fan, H. C., Zhang, X. and McNaughton, P. A.** (2009). Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 27884-91.
- 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.
- 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 Orail causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179-85.

- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., Jr. and Bland, K. I.** (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* **16**, 70-84.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C. and Lazdunski, M.** (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *Embo J* **15**, 6854-62.
- Flink, M. T. and Atchison, W. D.** (2003). Ca²⁺ channels as targets of neurological disease: Lambert-Eaton Syndrome and other Ca²⁺ channelopathies. *J Bioenerg Biomembr* **35**, 697-718.
- Foradori, C. D., Weiser, M. J. and Handa, R. J.** (2008). Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* **29**, 169-81.
- Frederick, J., Buck, M. E., Matson, D. J. and Cortright, D. N.** (2007). Increased TRPA1, TRPM8, and TRPV2 expression in dorsal root ganglia by nerve injury. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 1058-64.
- 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**, 221-8.
- Gackiere, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoi-Mariot, M. T., Mauroy, B., Prevarskaya, N. et al.** (2008). CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* **283**, 10162-73.
- Gatenbeck, L., Eneroth, P., Johansson, B. and Stromberg, L.** (1987). Plasma testosterone concentrations in male rats during short and long-term stress stimulation. *Scand J Urol Nephrol* **21**, 139-42.
- Gauchan, P., Andoh, T., Kato, A. and Kuraishi, Y.** (2009). Involvement of increased expression of transient receptor potential melastatin 8 in oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. *Neurosci Lett* **458**, 93-5.
- Gavva, N. R., Klionsky, L., Qu, Y., Shi, L., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T. J., Viswanadhan, V. N., Toth, A., Pearce, L. V. et al.** (2004). Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem* **279**, 20283-95.
- Goel, M., Sinkins, W. G. and Schilling, W. P.** (2002). Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem* **277**, 48303-10.
- Gonzalez-Perrett, S., Kim, K., Ibarra, C., Damiano, A. E., Zotta, E., Batelli, M., Harris, P. C., Reisin, I. L., Arnaout, M. A. and Cantiello, H. F.** (2001). Polycystin-2, the protein mutated in autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD), is a Ca²⁺-permeable nonselective cation channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1182-7.
- Gorczyńska, E. and Handelsman, D. J.** (1995). Androgens rapidly increase the cytosolic calcium concentration in Sertoli cells. *Endocrinology* **136**, 2052-9.
- Green, B. G.** (1992). The sensory effects of l-menthol on human skin. *Somatosens Mot Res* **9**, 235-44.
- Green, B. G. and Frankmann, S. P.** (1988). The effect of cooling on the perception of carbohydrate and intensive sweeteners. *Physiol Behav* **43**, 515-9.
- 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**, 21493-501.
- Gulbransen, B. D., Clapp, T. R., Finger, T. E. and Kinnamon, S. C.** (2008). Nasal solitary chemoreceptor cell responses to bitter and trigeminal stimulants in vitro. *J Neurophysiol* **99**, 2929-37.

- Guler, A. D., Lee, H., Iida, T., Shimizu, I., Tominaga, M. and Caterina, M.** (2002). Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci* **22**, 6408-14.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Adelman, J. P., Aiyar, J., Bayliss, D. A., Clapham, D. E., Covarriubias, M., Desir, G. V., Furuichi, K., Ganetzky, B. et al.** (2003). International Union of Pharmacology. XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* **55**, 583-6.
- Haider, S. G.** (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* **233**, 181-241.
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J. et al.** (2002). LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* **9**, 163-73.
- Hardie, R. C.** (2007). TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *J Physiol* **578**, 9-24.
- Harju, E. L.** (2002). Cold and warmth perception mapped for age, gender, and body area. *Somatosens Mot Res* **19**, 61-75.
- Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M. and Yau, K. W.** (2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* **295**, 1065-70.
- 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. et al.** (2003). Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* **63**, 4196-203.
- Hocker, J., Paris, A., Scholz, J., Tonner, P. H., Nielsen, M. and Bein, B.** (2008). Differential effects of alpha 2-adrenoceptors in the modulation of the thermoregulatory response in mice induced by meperidine. *Anesthesiology* **109**, 95-100.
- Hoenderop, J. G., Voets, T., Hoefs, S., Weidema, F., Prenen, J., Nilius, B. and Bindels, R. J.** (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *Embo J* **22**, 776-85.
- Hofmann, T., Schaefer, M., Schultz, G. and Gudermann, T.** (2002). Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7461-6.
- Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A. and Murphy, G. P.** (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **43**, 1809-18.
- Howard, J. and Bechstedt, S.** (2004). Hypothesis: a helix of ankyrin repeats of the NOMPC-TRP ion channel is the gating spring of mechanoreceptors. *Curr Biol* **14**, R224-6.
- Huang, Y. A., Maruyama, Y., Stimac, R. and Roper, S. D.** (2008). Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J Physiol* **586**, 2903-12.
- Hunter, J. C., Fontana, D. J., Hedley, L. R., Jasper, J. R., Lewis, R., Link, R. E., Secchi, R., Sutton, J. and Eglen, R. M.** (1997). Assessment of the role of alpha2-adrenoceptor subtypes in the antinociceptive, sedative and hypothermic action of dexmedetomidine in transgenic mice. *Br J Pharmacol* **122**, 1339-44.
- Hwang, B. G., Min, B. I., Kim, J. H., Na, H. S. and Park, D. S.** (2002). Effects of electroacupuncture on the mechanical allodynia in the rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* **320**, 49-52.
- Iftinca, M. C. and Zamponi, G. W.** (2009). Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 32-40.
- Inoue, R., Jensen, L. J., Jian, Z., Shi, J., Hai, L., Lurie, A. I., Henriksen, F. H., Salomonsson, M., Morita, H., Kawarabayashi, Y. et al.** (2009a). Synergistic activation of vascular TRPC6 channel by receptor and mechanical stimulation via phospholipase

C/diacylglycerol and phospholipase A2/omega-hydroxylase/20-HETE pathways. *Circ Res* **104**, 1399-409.

Inoue, R., Jian, Z. and Kawarabayashi, Y. (2009b). Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther* **123**, 371-85.

Irnatén, M., Blanchard-Gutton, N., Praetorius, J. and Harvey, B. J. (2009). Rapid effects of 17beta-estradiol on TRPV5 epithelial Ca²⁺ channels in rat renal cells. *Steroids* **74**, 642-9.

Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H., Tominaga, M. and Matsunami, H. (2006). Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12569-74.

Janssen, P. A., Niemegeers, C. J. and Dony, J. G. (1963). The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung* **13**, 502-7.

Jeon, J. P., Lee, K. P., Park, E. J., Sung, T. S., Kim, B. J., Jeon, J. H. and So, I. (2008). The specific activation of TRPC4 by Gi protein subtype. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 538-43.

Johnson, C. D., Melanaphy, D., Purse, A., Stokesberry, S. A., Dickson, P. and Zholos, A. V. (2009). Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **296**, H1868-77.

Jordt, S. E. and Julius, D. (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell* **108**, 421-30.

Kang, J. Q. and Macdonald, R. L. (2004). The GABAA receptor gamma2 subunit R43Q mutation linked to childhood absence epilepsy and febrile seizures causes retention of alpha1beta2gamma2S receptors in the endoplasmic reticulum. *J Neurosci* **24**, 8672-7.

Kataoka, S., Yang, R., Ishimaru, Y., Matsunami, H., Seigny, J., Kinnamon, J. C. and Finger, T. E. (2008). The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse. *Chem Senses* **33**, 243-54.

Kedei, N., Szabo, T., Lile, J. D., Treanor, J. J., Olah, Z., Iadarola, M. J. and Blumberg, P. M. (2001). Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* **276**, 28613-9.

Khosravani, H., Altier, C., Simms, B., Hamming, K. S., Snutch, T. P., Mezeyova, J., McRory, J. E. and Zamponi, G. W. (2004). Gating effects of mutations in the Cav3.2 T-type calcium channel associated with childhood absence epilepsy. *J Biol Chem* **279**, 9681-4.

Kiessling, A., Fussel, S., Schmitz, M., Stevanovic, S., Meye, A., Weigle, B., Klenk, U., Wirth, M. P. and Rieber, E. P. (2003). Identification of an HLA-A*0201-restricted T-cell epitope derived from the prostate cancer-associated protein trp-p8. *Prostate* **56**, 270-9.

Kim, J., Chung, Y. D., Park, D. Y., Choi, S., Shin, D. W., Soh, H., Lee, H. W., Son, W., Yim, J., Park, C. S. et al. (2003). A TRPV family ion channel required for hearing in *Drosophila*. *Nature* **424**, 81-4.

Kim, J. A., Park, J. Y., Kang, H. W., Huh, S. U., Jeong, S. W. and Lee, J. H. (2006). Augmentation of Cav3.2 T-type calcium channel activity by cAMP-dependent protein kinase A. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 230-7.

Kim, S. K., Park, J. H., Bae, S. J., Kim, J. H., Hwang, B. G., Min, B. I., Park, D. S. and Na, H. S. (2005). Effects of electroacupuncture on cold allodynia in a rat model of neuropathic pain: mediation by spinal adrenergic and serotonergic receptors. *Exp Neurol* **195**, 430-6.

Kimchi, T., Xu, J. and Dulac, C. (2007). A functional circuit underlying male sexual behaviour in the female mouse brain. *Nature* **448**, 1009-14.

Kiselyov, K., Chen, J., Rbaibi, Y., Oberdick, D., Tjon-Kon-Sang, S., Shcheynikov, N., Muallem, S. and Soyombo, A. (2005). TRP-ML1 is a lysosomal monovalent cation channel that undergoes proteolytic cleavage. *J Biol Chem* **280**, 43218-23.

Kiselyov, K., Soyombo, A. and Muallem, S. (2007). TRPpathies. *J Physiol* **578**, 641-53.

Knaus, A., Zong, X., Beetz, N., Jahns, R., Lohse, M. J., Biel, M. and Hein, L. (2007). Direct inhibition of cardiac hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated pacemaker channels by clonidine. *Circulation* **115**, 872-80.

Kobayashi, K., Fukuoka, T., Obata, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Tokunaga, A. and Noguchi, K. (2005). Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with adelta/c-fibers and colocalization with trk receptors. *J Comp Neurol* **493**, 596-606.

Kuhn, F. J., Kuhn, C. and Luckhoff, A. (2009). Inhibition of TRPM8 by icilin distinct from desensitization induced by menthol and menthol derivatives. *J Biol Chem* **284**, 4102-11.

Lansman, J. B., Hallam, T. J. and Rink, T. J. (1987). Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature* **325**, 811-3.

Lanzafame, A. A., Christopoulos, A. and Mitchelson, F. (2003). Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. *Receptors Channels* **9**, 241-60.

LaPlante, J. M., Ye, C. P., Quinn, S. J., Goldin, E., Brown, E. M., Slaugenhaupt, S. A. and Vassilev, P. M. (2004). Functional links between mucolipin-1 and Ca²⁺-dependent membrane trafficking in mucopolipidosis IV. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1384-91.

Latorre, R., Brauchi, S., Orta, G., Zaelzer, C. and Vargas, G. (2007). ThermoTRP channels as modular proteins with allosteric gating. *Cell Calcium* **42**, 427-38.

Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J. P. and Besnard, P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest* **115**, 3177-84.

Lefkimmiatis, K., Srikanthan, M., Maiellaro, I., Moyer, M. P., Curci, S. and Hofer, A. M. (2009). Store-operated cyclic AMP signalling mediated by STIM1. *Nat Cell Biol* **11**, 433-42.

Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca²⁺/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380-5.

Liman, E. R. (2007). TRPM5 and taste transduction. *Handb Exp Pharmacol*, 287-98.

Lin, D. Y., Zhang, S. Z., Block, E. and Katz, L. C. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* **434**, 470-7.

Lin, W., Arellano, J., Slotnick, B. and Restrepo, D. (2004). Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system. *J Neurosci* **24**, 3703-10.

Lin, W., Margolskee, R., Donnert, G., Hell, S. W. and Restrepo, D. (2007). Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2471-6.

Lin, W., Ogura, T., Margolskee, R. F., Finger, T. E. and Restrepo, D. (2008). TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants. *J Neurophysiol* **99**, 1451-60.

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**, 1235-41.

- Liu, B. and Qin, F.** (2005). Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* **25**, 1674-81.
- Liu, D. and Liman, E. R.** (2003). Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15160-5.
- Liu, L., Zhao, R., Bai, Y., Stanish, L. F., Evans, J. E., Sanderson, M. J., Bonventre, J. V. and Rittenhouse, A. R.** (2006). M1 muscarinic receptors inhibit L-type Ca²⁺ current and M-current by divergent signal transduction cascades. *J Neurosci* **26**, 11588-98.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Darnell, J., Kaiser, C. A. and Masson, P. L.** (2005). *Biologie Moléculaire de la Cellule*.
- Lory, P. and Nargeot, N.** (2007). Diversité moléculaire des canaux ioniques et canalopathies. *Biologie et pathologie du coeur et des vaisseaux*.
- Ludwig, A., Zong, X., Stieber, J., Hullin, R., Hofmann, F. and Biel, M.** (1999). Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *Embo J* **18**, 2323-9.
- Lyng, F. M., Jones, G. R. and Rommerts, F. F.** (2000). Rapid androgen actions on calcium signaling in rat sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biol Reprod* **63**, 736-47.
- Madrid, R., Donovan-Rodriguez, T., Meseguer, V., Acosta, M. C., Belmonte, C. and Viana, F.** (2006). Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *J Neurosci* **26**, 12512-25.
- Maingret, F., Patel, A. J., Lesage, F., Lazdunski, M. and Honore, E.** (2000). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* **275**, 10128-33.
- Manzoni, M., Monti, E., Bresciani, R., Bozzato, A., Barlati, S., Bassi, M. T. and Borsani, G.** (2004). Overexpression of wild-type and mutant mucolipin proteins in mammalian cells: effects on the late endocytic compartment organization. *FEBS Lett* **567**, 219-24.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M. F. and Prevarskaya, N.** (2002). Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* **277**, 10824-33.
- Maroto, R., Raso, A., Wood, T. G., Kurosky, A., Martinac, B. and Hamill, O. P.** (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol* **7**, 179-85.
- Marthinet, E., Bloc, A., Oka, Y., Tanizawa, Y., Wehrle-Haller, B., Bancila, V., Dubuis, J. M., Philippe, J. and Schwitzgebel, V. M.** (2005). Severe congenital hyperinsulinism caused by a mutation in the Kir6.2 subunit of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel impairing trafficking and function. *J Clin Endocrinol Metab* **90**, 5401-6.
- Matta, J. A. and Ahern, G. P.** (2007). Voltage is a partial activator of rat thermosensitive TRP channels. *J Physiol* **585**, 469-82.
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M. and Julius, D.** (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* **416**, 52-8.
- Michel, M. C. and Vrydag, W.** (2006). Alpha1-, alpha2- and beta-adrenoceptors in the urinary bladder, urethra and prostate. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 2**, S88-119.
- Michels, G., Er, F., Eicks, M., Herzig, S. and Hoppe, U. C.** (2006). Long-term and immediate effect of testosterone on single T-type calcium channel in neonatal rat cardiomyocytes. *Endocrinology* **147**, 5160-9.
- Minke, B.** (1977). Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* **3**, 59-64.

- Mogil, J. S., Chesler, E. J., Wilson, S. G., Juraska, J. M. and Sternberg, W. F.** (2000). Sex differences in thermal nociception and morphine antinociception in rodents depend on genotype. *Neurosci Biobehav Rev* **24**, 375-89.
- Monteilh-Zoller, M. K., Hermosura, M. C., Nadler, M. J., Scharenberg, A. M., Penner, R. and Fleig, A.** (2003). TRPM7 provides an ion channel mechanism for cellular entry of trace metal ions. *J Gen Physiol* **121**, 49-60.
- Montell, C.** (1997). New light on TRP and TRPL. *Mol Pharmacol* **52**, 755-63.
- Montell, C.** (2001). Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2001**, RE1.
- Montell, C.** (2003). Mg²⁺ homeostasis: the Mg²⁺-nificent TRPM channels. *Curr Biol* **13**, R799-801.
- Montell, C.** (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Montell, C., Birnbaumer, L. and Flockerzi, V.** (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595-8.
- Mowszowicz, I., Berthaut, I., Mestayer, C., Wright, F., Kuttann, F. and Mauvais-Jarvis, P.** (1995). [5-alpha-reductases: physiology and pathology]. *Ann Endocrinol (Paris)* **56**, 555-9.
- Mukerji, G., Yiangou, Y., Corcoran, S. L., Selmer, I. S., Smith, G. D., Benham, C. D., Bountra, C., Agarwal, S. K. and Anand, P.** (2006). Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urol* **6**, 6.
- Muraki, K., Iwata, Y., Katanosaka, Y., Ito, T., Ohya, S., Shigekawa, M. and Imaizumi, Y.** (2003). TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* **93**, 829-38.
- Nadler, M. J., Hermosura, M. C., Inabe, K., Perraud, A. L., Zhu, Q., Stokes, A. J., Kurosaki, T., Kinet, J. P., Penner, R., Scharenberg, A. M. et al.** (2001). LTRPC7 is a Mg-ATP-regulated divalent cation channel required for cell viability. *Nature* **411**, 590-5.
- Nakaya, K., Harbidge, D. G., Wangemann, P., Schultz, B. D., Green, E. D., Wall, S. M. and Marcus, D. C.** (2007). Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1314-21.
- Nealen, M. L., Gold, M. S., Thut, P. D. and Caterina, M. J.** (2003). TRPM8 mRNA is expressed in a subset of cold-responsive trigeminal neurons from rat. *J Neurophysiol* **90**, 515-20.
- Nilius, B.** (2007). TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 805-12.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T. and Peters, J. A.** (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* **87**, 165-217.
- Nilius, B., Talavera, K., Owsianik, G., Prenen, J., Droogmans, G. and Voets, T.** (2005). Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol* **567**, 35-44.
- O'Dowd, B. F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K. R., Heng, H. H., Kolakowski, L. F., Jr. and George, S. R.** (1998). Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* **47**, 310-3.
- O'Neil, R. G. and Heller, S.** (2005). The mechanosensitive nature of TRPV channels. *Pflugers Arch* **451**, 193-203.
- Osterhout, J. L. and Shuttleworth, T. J.** (2000). A Ca²⁺-independent activation of a type IV cytosolic phospholipase A(2) underlies the receptor stimulation of arachidonic acid-dependent noncapacitative calcium entry. *J Biol Chem* **275**, 8248-54.
- Otsuguro, K., Tang, J., Tang, Y., Xiao, R., Freichel, M., Tsvilovskyy, V., Ito, S., Flockerzi, V., Zhu, M. X. and Zholos, A. V.** (2008). Isoform-specific inhibition of TRPC4 channel by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **283**, 10026-36.

- Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B. and Jegla, T.** (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* **307**, 600-4.
- Parekh, A. B., Terlau, H. and Stuhmer, W.** (1993). Depletion of InsP3 stores activates a Ca²⁺ and K⁺ current by means of a phosphatase and a diffusible messenger. *Nature* **364**, 814-8.
- Park, J. H., Kim, S. K., Kim, H. N., Sun, B., Koo, S., Choi, S. M., Bae, H. and Min, B. I.** (2009). Spinal cholinergic mechanism of the relieving effects of electroacupuncture on cold and warm allodynia in a rat model of neuropathic pain. *J Physiol Sci* **59**, 291-8.
- Patel, A. J. and Honore, E.** (2001). Properties and modulation of mammalian 2P domain K⁺ channels. *Trends Neurosci* **24**, 339-46.
- Pedretti, A., Marconi, C., Bettinelli, I. and Vistoli, G.** (2009). Comparative modeling of the quaternary structure for the human TRPM8 channel and analysis of its binding features. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 973-82.
- Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S. et al.** (2002a). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* **108**, 705-15.
- Peier, A. M., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Moqrich, A., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Story, G. M., Colley, S., Hogenesch, J. B., McIntyre, P. et al.** (2002b). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**, 2046-9.
- 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**, 729-34.
- Pennefather, J. N., Lau, W. A., Mitchelson, F. and Ventura, S.** (2000). The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol* **20**, 193-206.
- Perozo, E., Cortes, D. M., Sompornpisut, P., Kloda, A. and Martinac, B.** (2002). Open channel structure of MscL and the gating mechanism of mechanosensitive channels. *Nature* **418**, 942-8.
- 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. et al.** (2001). ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology. *Nature* **411**, 595-9.
- Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., Morenilla-Palao, C. and Ferrer-Montiel, A.** (2005). Functional aspects and mechanisms of TRPV1 involvement in neurogenic inflammation that leads to thermal hyperalgesia. *Pflugers Arch* **451**, 151-9.
- Potkanowicz, E. S., Caine-Bish, N., Otterstetter, R. and Glickman, E. L.** (2003). Age effects on thermal, metabolic, and perceptual responses to acute cold exposure. *Aviat Space Environ Med* **74**, 1157-62.
- Poyhia, R., Xu, M., Kontinen, V. K., Paananen, S. and Kalso, E.** (1999). Systemic physostigmine shows antiallodynic effects in neuropathic rats. *Anesth Analg* **89**, 428-33.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A. and Hogan, P. G.** (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**, 230-3.
- Prakriya, M. and Lewis, R. S.** (2002). Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg²⁺-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol* **119**, 487-507.
- Premkumar, L. S., Raisinghani, M., Pingle, S. C., Long, C. and Pimentel, F.** (2005). Downregulation of transient receptor potential melastatin 8 by protein kinase C-mediated dephosphorylation. *J Neurosci* **25**, 11322-9.
- Prevarskaya, N., Flourakis, M., Bidaux, G., Thebault, S. and Skryma, R.** (2007a). Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* **35**, 133-5.

- Prevarskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y.** (2004). Ca²⁺ homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1326-35.
- Prevarskaya, N., Zhang, L. and Barritt, G.** (2007b). TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 937-46.
- Proudfoot, C. J., Garry, E. M., Cottrell, D. F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D. C., Fleetwood-Walker, S. M. and Mitchell, R.** (2006). Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr Biol* **16**, 1591-605.
- Putney, J. W., Jr.** (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**, 1-12.
- Rahman, F. and Christian, H. C.** (2007). Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab* **18**, 371-8.
- Ramos, B. P., Stark, D., Verduzco, L., van Dyck, C. H. and Arnsten, A. F.** (2006). Alpha2A-adrenoceptor stimulation improves prefrontal cortical regulation of behavior through inhibition of cAMP signaling in aging animals. *Learn Mem* **13**, 770-6.
- Ramsey, I. S., Delling, M. and Clapham, D. E.** (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* **68**, 619-47.
- Randriamampita, C. and Tsien, R. Y.** (1993). Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* **364**, 809-14.
- Raychowdhury, M. K., Gonzalez-Perrett, S., Montalbetti, N., Timpanaro, G. A., Chasan, B., Goldmann, W. H., Stahl, S., Cooney, A., Goldin, E. and Cantiello, H. F.** (2004). Molecular pathophysiology of mucopolipidosis type IV: pH dysregulation of the mucolipin-1 cation channel. *Hum Mol Genet* **13**, 617-27.
- Rayford, W., Noble, M. J., Austenfeld, M. A., Weigel, J., Mebust, W. K. and Shah, G. V.** (1997). Muscarinic cholinergic receptors promote growth of human prostate cancer cells. *Prostate* **30**, 160-6.
- Reiser, J., Polu, K. R., Moller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., Faul, C., Herbert, S., Villegas, I., Avila-Casado, C. et al.** (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* **37**, 739-44.
- Rohacs, T., Lopes, C. M., Michailidis, I. and Logothetis, D. E.** (2005). PI(4,5)P₂ regulates the activation and desensitization of TRPM8 channels through the TRP domain. *Nat Neurosci* **8**, 626-34.
- Rosa, A. O. and Rapoport, S. I.** (2009). Intracellular- and extracellular-derived Ca(2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 697-705.
- Rosner, W.** (1990). The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr Rev* **11**, 80-91.
- Rosner, W.** (1991). Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* **20**, 697-720.
- Ruggieri, M. R., Colton, M. D., Wang, P., Wang, J., Smyth, R. J., Pontari, M. A. and Luthin, G. R.** (1995). Human prostate muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **274**, 976-82.
- Sabnis, A. S., Shadid, M., Yost, G. S. and Reilly, C. A.** (2008). Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**, 466-74.
- Schaefer, M.** (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits. *Pflugers Arch* **451**, 35-42.
- Schaefer, M. L., Yamazaki, K., Osada, K., Restrepo, D. and Beauchamp, G. K.** (2002). Olfactory fingerprints for major histocompatibility complex-determined body odors II: relationship among odor maps, genetics, odor composition, and behavior. *J Neurosci* **22**, 9513-21.

Schlingmann, K. P., Waldegger, S., Konrad, M., Chubanov, V. and Gudermann, T. (2007). TRPM6 and TRPM7--Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 813-21.

Schlingmann, K. P., Weber, S., Peters, M., Niemann Nejsum, L., Vitzthum, H., Klingel, K., Kratz, M., Haddad, E., Ristoff, E., Dinour, D. et al. (2002). Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet* **31**, 166-70.

Schmidt, U., Fuessel, S., Koch, R., Baretton, G. B., Lohse, A., Tomasetti, S., Unversucht, S., Froehner, M., Wirth, M. P. and Meye, A. (2006). Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate* **66**, 1521-34.

Schmitz, C., Dorovkov, M. V., Zhao, X., Davenport, B. J., Ryazanov, A. G. and Perraud, A. L. (2005). The channel kinases TRPM6 and TRPM7 are functionally nonredundant. *J Biol Chem* **280**, 37763-71.

Schmitz, C., Perraud, A. L., Johnson, C. O., Inabe, K., Smith, M. K., Penner, R., Kurosaki, T., Fleig, A. and Scharenberg, A. M. (2003). Regulation of vertebrate cellular Mg²⁺ homeostasis by TRPM7. *Cell* **114**, 191-200.

Schnizler, K., Shutov, L. P., Van Kanegan, M. J., Merrill, M. A., Nichols, B., McKnight, G. S., Strack, S., Hell, J. W. and Usachev, Y. M. (2008). Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons. *J Neurosci* **28**, 4904-17.

Sclafani, A., Zukerman, S., Glendinning, J. I. and Margolskee, R. F. (2007). Fat and carbohydrate preferences in mice: the contribution of alpha-gustducin and Trpm5 taste-signaling proteins. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**, R1504-13.

Selye, H. (1941). The anesthetic effect of steroid hormones. *Proc Soc Exp Biol Med* **46**, 116-121.

Sharma, N., Crane, A., Clement, J. P. t., Gonzalez, G., Babenko, A. P., Bryan, J. and Aguilar-Bryan, L. (1999). The C terminus of SUR1 is required for trafficking of KATP channels. *J Biol Chem* **274**, 20628-32.

Shuttleworth, T. J. and Thompson, J. L. (1998). Muscarinic receptor activation of arachidonate-mediated Ca²⁺ entry in HEK293 cells is independent of phospholipase C. *J Biol Chem* **273**, 32636-43.

Simon, S. A., de Araujo, I. E., Gutierrez, R. and Nicolelis, M. A. (2006). The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci* **7**, 890-901.

Simoncini, T. and Genazzani, A. R. (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol* **148**, 281-92.

Simoncini, T., Mannella, P., Fornari, L., Caruso, A., Varone, G. and Genazzani, A. R. (2004). Genomic and non-genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* **69**, 537-42.

Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X. L., Coppenolle, F. V., Shuba, Y., Vanden Abele, 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.

Slater, M., Barden, J. A. and Murphy, C. R. (2000). Tyrosine kinase A, autonomic and transmitter receptors, but not innervation, are upregulated in the aging rat prostate. *Acta Histochem* **102**, 427-38.

Smani, T., Zakharov, S. I., Csutora, P., Leno, E., Trepakova, E. S. and Bolotina, V. M. (2004). A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 113-20.

Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O. and Sternweis, P. C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* **251**, 804-7.

- Sotomayor, M., Corey, D. P. and Schulten, K.** (2005). In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure* **13**, 669-82.
- Soyombo, A. A., Tjon-Kon-Sang, S., Rbaibi, Y., Bashllari, E., Bisceglia, J., Muallem, S. and Kiselyov, K.** (2006). TRP-ML1 regulates lysosomal pH and acidic lysosomal lipid hydrolytic activity. *J Biol Chem* **281**, 7294-301.
- Stahl, F., Gotz, F. and Dorner, G.** (1984). Plasma testosterone levels in rats under various conditions. *Exp Clin Endocrinol* **84**, 277-84.
- Steen, K. H. and Reeh, P. W.** (1993). Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, in vitro. *J Neurophysiol* **70**, 397-405.
- Stein, R. J., Santos, S., Nagatomi, J., Hayashi, Y., Minnery, B. S., Xavier, M., Patel, A. S., Nelson, J. B., Futrell, W. J., Yoshimura, N. et al.** (2004). Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* **172**, 1175-8.
- Stokes, A. J., Shimoda, L. M., Koblan-Huberson, M., Adra, C. N. and Turner, H.** (2004). A TRPV2-PKA signaling module for transduction of physical stimuli in mast cells. *J Exp Med* **200**, 137-47.
- 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. et al.** (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-29.
- Strotmann, R., Harteneck, C., Nunnenmacher, K., Schultz, G. and Plant, T. D.** (2000). OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**, 695-702.
- Strubing, C., Krapivinsky, G., Krapivinsky, L. and Clapham, D. E.** (2001). TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron* **29**, 645-55.
- Sukharev, S. I., Blount, P., Martinac, B., Blattner, F. R. and Kung, C.** (1994). A large-conductance mechanosensitive channel in *E. coli* encoded by *mscL* alone. *Nature* **368**, 265-8.
- Sun, M., Goldin, E., Stahl, S., Falardeau, J. L., Kennedy, J. C., Acierno, J. S., Jr., Bove, C., Kaneshi, C. R., Nagle, J., Bromley, M. C. et al.** (2000). Mucopolidosis type IV is caused by mutations in a gene encoding a novel transient receptor potential channel. *Hum Mol Genet* **9**, 2471-8.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W. and Gilman, A. G.** (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-80.
- Suzuki, M., Mizuno, A., Kodaira, K. and Imai, M.** (2003a). Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem* **278**, 22664-8.
- Suzuki, M., Watanabe, Y., Oyama, Y., Mizuno, A., Kusano, E., Hirao, A. and Ookawara, S.** (2003b). Localization of mechanosensitive channel TRPV4 in mouse skin. *Neurosci Lett* **353**, 189-92.
- Tabuchi, K., Suzuki, M., Mizuno, A. and Hara, A.** (2005). Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett* **382**, 304-8.
- Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R. and Fleig, A.** (2004). Receptor-mediated regulation of the TRPM7 channel through its endogenous protein kinase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6009-14.
- Talavera, K., Nilius, B. and Voets, T.** (2008). Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci* **31**, 287-95.
- Talavera, K., Yasumatsu, K., Voets, T., Droogmans, G., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F. and Nilius, B.** (2005). Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* **438**, 1022-5.
- Tata, A. M., Vilaro, M. T. and Mengod, G.** (2000). Muscarinic receptor subtypes expression in rat and chick dorsal root ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* **82**, 1-10.

Thebault, S., Hoenderop, J. G. and Bindels, R. J. (2006). Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ channels in kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis* **13**, 110-7.

Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y. et al. (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **280**, 39423-35.

Thut, P. D., Wrigley, D. and Gold, M. S. (2003). Cold transduction in rat trigeminal ganglia neurons in vitro. *Neuroscience* **119**, 1071-83.

Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A. and Suzuki, M. (2004). Warm temperature-sensitive transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) plays an essential role in thermal hyperalgesia. *J Biol Chem* **279**, 35133-8.

Togashi, K., Hara, Y., Tominaga, T., Higashi, T., Konishi, Y., Mori, Y. and Tominaga, M. (2006). TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *Embo J* **25**, 1804-15.

Tominaga, M., Caterina, M. J., Malmberg, A. B., Rosen, T. A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B. E., Basbaum, A. I. and Julius, D. (1998). The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* **21**, 531-43.

Tostain, J., Rossi, D. and Martin, P. M. (2004). [Physiology of androgens in adult men]. *Prog Urol* **14**, 639-60.

Trepakova, E. S., Csutora, P., Hunton, D. L., Marchase, R. B., Cohen, R. A. and Bolotina, V. M. (2000). Calcium influx factor directly activates store-operated cation channels in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **275**, 26158-63.

Trepakova, E. S., Gericke, M., Hirakawa, Y., Weisbrod, R. M., Cohen, R. A. and Bolotina, V. M. (2001). Properties of a native cation channel activated by Ca²⁺ store depletion in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **276**, 7782-90.

Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S. and Laus, R. (2001). 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**, 3760-9.

Tsukimi, Y., Mizuyachi, K., Yamasaki, T., Niki, T. and Hayashi, F. (2005). Cold response of the bladder in guinea pig: involvement of transient receptor potential channel, TRPM8. *Urology* **65**, 406-10.

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**, 1929-31.

Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004). Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* **279**, 30326-37.

Vanden Abeele, F., Zholos, A., Bidaux, G., Shuba, Y., Thebault, S., Beck, B., Flourakis, M., Panchin, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2006). Ca²⁺-independent phospholipase A₂-dependent gating of TRPM8 by lysophospholipids. *J Biol Chem* **281**, 40174-82.

Vazquez, E. and Valverde, M. A. (2006). A review of TRP channels splicing. *Semin Cell Dev Biol* **17**, 607-17.

Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417.

- Vergarajauregui, S., Oberdick, R., Kiselyov, K. and Puertollano, R.** (2008). Muco1ipin 1 channel activity is regulated by protein kinase A-mediated phosphorylation. *Biochem J* **410**, 417-25.
- Verrey, F.** (1998). Early aldosterone effects. *Exp Nephrol* **6**, 294-301.
- Vierhapper, H., Nowotny, P. and Waldhausl, W.** (2000). production rates of testosterone in patients with Cushing's syndrome. *Metabolism* **49**, 229-31.
- Vig, M., Beck, A., Billingsley, J. M., Lis, A., Parvez, S., Peinelt, C., Koomoa, D. L., Soboloff, J., Gill, D. L., Fleig, A. et al.** (2006a). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol* **16**, 2073-9.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R. et al.** (2006b). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* **312**, 1220-3.
- Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V. and Nilius, B.** (2004a). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* **430**, 748-54.
- Voets, T., Nilius, B., Hoefs, S., van der Kemp, A. W., Droogmans, G., Bindels, R. J. and Hoenderop, J. G.** (2004b). TRPM6 forms the Mg²⁺ influx channel involved in intestinal and renal Mg²⁺ absorption. *J Biol Chem* **279**, 19-25.
- Voets, T., Owsianik, G., Janssens, A., Talavera, K. and Nilius, B.** (2007a). TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli. *Nat Chem Biol* **3**, 174-82.
- Voets, T., Owsianik, G. and Nilius, B.** (2007b). Trpm8. *Handb Exp Pharmacol*, 329-44.
- Voets, T., Talavera, K., Owsianik, G. and Nilius, B.** (2005). Sensing with TRP channels. *Nat Chem Biol* **1**, 85-92.
- Vriens, J., Watanabe, H., Janssens, A., Droogmans, G., Voets, T. and Nilius, B.** (2004). Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 396-401.
- Wagner, T. F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S. E. et al.** (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol* **10**, 1421-30.
- Walder, R. Y., Landau, D., Meyer, P., Shalev, H., Tsolia, M., Borochowitz, Z., Boettger, M. B., Beck, G. E., Englehardt, R. K., Carmi, R. et al.** (2002). Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* **31**, 171-4.
- Walker, R. G., Willingham, A. T. and Zuker, C. S.** (2000). A Drosophila mechanosensory transduction channel. *Science* **287**, 2229-34.
- Wang, J., Zhou, J., Todorovic, S. M., Feero, W. G., Barany, F., Conwit, R., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Fidzianska, A., Arahata, K., Wessel, H. B. et al.** (1993). Molecular genetic and genetic correlations in sodium channelopathies: lack of founder effect and evidence for a second gene. *Am J Hum Genet* **52**, 1074-84.
- Wang, J. M., McKenna, K. E. and Lee, C.** (1991). Determination of prostatic secretion in rats: effect of neurotransmitters and testosterone. *Prostate* **18**, 289-301.
- Wasner, G., Naleschinski, D., Binder, A., Schattschneider, J., McLachlan, E. M. and Baron, R.** (2008). The effect of menthol on cold allodynia in patients with neuropathic pain. *Pain Med* **9**, 354-8.
- Wasner, G., Schattschneider, J., Binder, A. and Baron, R.** (2004). Topical menthol--a human model for cold pain by activation and sensitization of C nociceptors. *Brain* **127**, 1159-71.

- Watanabe, H., Vriens, J., Prenen, J., Droogmans, G., Voets, T. and Nilius, B.** (2003). Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature* **424**, 434-8.
- Waxman, S. G.** (2001). Transcriptional channelopathies: an emerging class of disorders. *Nat Rev Neurosci* **2**, 652-9.
- Waxman, S. G., Kocsis, J. D. and Black, J. A.** (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* **72**, 466-70.
- Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., Daskalakis, N., Kwan, S. Y., Ebersviller, S., Burchette, J. L. et al.** (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* **308**, 1801-4.
- 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**, 19461-8.
- Witte, L. P., Chapple, C. R., de la Rosette, J. J. and Michel, M. C.** (2008). Cholinergic innervation and muscarinic receptors in the human prostate. *Eur Urol* **54**, 326-34.
- Wood, J. M.** (1999). Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 230-62.
- Wu, G., Markowitz, G. S., Li, L., D'Agati, V. D., Factor, S. M., Geng, L., Tibara, S., Tuchman, J., Cai, Y., Park, J. H. et al.** (2000). Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in Pkd2. *Nat Genet* **24**, 75-8.
- Wunderlich, F., Benten, W. P., Lieberherr, M., Guo, Z., Stamm, O., Wrehlke, C., Sekeris, C. E. and Mossmann, H.** (2002). Testosterone signaling in T cells and macrophages. *Steroids* **67**, 535-8.
- Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W. and Gu, J. G.** (2007). TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J Neurosci* **27**, 13680-90.
- Xing, H., Ling, J., Chen, M. and Gu, J. G.** (2006). Chemical and cold sensitivity of two distinct populations of TRPM8-expressing somatosensory neurons. *J Neurophysiol* **95**, 1221-30.
- Xu, H., Ramsey, I. S., Kotecha, S. A., Moran, M. M., Chong, J. A., Lawson, D., Ge, P., Lilly, J., Silos-Santiago, I., Xie, Y. et al.** (2002). TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* **418**, 181-6.
- Xu, X. Z., Li, H. S., Guggino, W. B. and Montell, C.** (1997). Coassembly of TRP and TRPL produces a distinct store-operated conductance. *Cell* **89**, 1155-64.
- Yang, X. R., Lin, M. J., McIntosh, L. S. and Sham, J. S.** (2006). Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L1267-76.
- Yang, Z. H., Wang, X. H., Wang, H. P. and Hu, L. Q.** (2009). Effects of TRPM8 on the proliferation and motility of prostate cancer PC-3 cells. *Asian J Androl* **11**, 157-65.
- Yao, Y., Ferrer-Montiel, A. V., Montal, M. and Tsien, R. Y.** (1999). Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* **98**, 475-85.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O. and Cahalan, M. D.** (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* **443**, 226-9.
- Yuan, J. P., Kiselyov, K., Shin, D. M., Chen, J., Shcheynikov, N., Kang, S. H., Dehoff, M. H., Schwarz, M. K., Seeburg, P. H., Muallem, S. et al.** (2003). Homer binds

TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors. *Cell* **114**, 777-89.

Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* **9**, 636-45.

Zeilhofer, H. U., Kress, M. and Swandulla, D. (1997). Fractional Ca²⁺ currents through capsaicin- and proton-activated ion channels in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* **503 (Pt 1)**, 67-78.

Zeng, W., Yuan, J. P., Kim, M. S., Choi, Y. J., Huang, G. N., Worley, P. F. and Muallem, S. (2008). STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Mol Cell* **32**, 439-48.

Zhang, L. and Barritt, G. J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* **64**, 8365-73.

Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. and Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature* **437**, 902-5.

Zhou, H., Das, S. and Murthy, K. S. (2003). Erk1/2- and p38 MAP kinase-dependent phosphorylation and activation of cPLA2 by m3 and m2 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G472-80.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J. H., Kaufman, A. and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**, 43-8.

Zhou, Z., Gong, Q., Epstein, M. L. and January, C. T. (1998). HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects. *J Biol Chem* **273**, 21061-6.

Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M. and Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2231-6.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **16**, 109-10.

Zufall, F., Ukhanov, K., Lucas, P., Liman, E. R. and Leinders-Zufall, T. (2005). Neurobiology of TRPC2: from gene to behavior. *Pflugers Arch* **451**, 61-71.

Testosterone is a key regulator of TRPM8–mediated cold perception

Alexis Bavencoffe^{1,5}, Dimitra Gkika^{1,5}, Jérôme Busserolles^{2,5}, Artem Kondratskyi³, Alexander Zholos⁴, Eric Chapuy², Monique Etienne², Alain Eschalier², Brigitte Mauroy¹, Yaroslav Shuba³, Roman Skryma¹ and Natalia Prevarskaya^{1,*}

¹*Inserm U800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, F59656 Villeneuve d'Ascq, France; Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), F59656 Villeneuve d'Ascq, France*

²*Clermont Université, Université d'Auvergne, Laboratoire de Pharmacologie Médicale, Faculté de Médecine/CHU, Clermont-Ferrand, France; Inserm, UMR 766, Pharmacologie Fondamentale et Clinique, Faculté de Médecine, 63001 Clermont-Ferrand, France*

³*Bogomoletz Institute of Physiology and International Centre of Molecular Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 01024, Ukraine*

⁴*Department of Physiology, Medical Biology Center, Queen's University of Belfast, Belfast, Northern Ireland, BT7 1NN, United Kingdom*

⁵These authors equally contributed to this work.

*Correspondence: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr

SUMMARY

It is now largely accepted that a number of sensory modalities including cold and warmth perception are affected by changes of the individual hormonal status. However, the mechanisms by which steroids influence sensory functions are yet to be determined. Cold/menthol-activated member of Transient Receptor Potential channels family, TRPM8, is mainly expressed in the sensory neurons where it represents the primary *in vivo* sensor of external innocuous cold temperatures. Despite extensive studies on TRPM8 activation by cold and chemical cooling compounds, the physiological mechanisms modulating TRPM8 activity remain unknown. Here we show that the male sex hormone, testosterone, specifically inhibits TRPM8 channel via a non-genomic pathway and reduces male sensitivity to non-noxious cold temperatures. Thus, testosterone constitutes a novel physiological modulator of TRPM8 inhibiting innocuous cold perception *in vivo* and variation of which could account for the gender as well as inter- and intra-individual disparity in thermosensation.

INTRODUCTION

TRPM8, is known as a cold receptor expressed in sensory neurons which is activated by cooling temperatures ($<28^{\circ}\text{C}$, with maximal activation around 18°C) or by the chemical imitators of cooling sensation such as menthol, icilin and eucalyptol (McKemy et al., 2002). Recently, using TRPM8-knockout mice three independent groups have established that TRPM8 is indeed the principal detector of environmental cold (Bautista et al., 2007; Colburn et al., 2007; Dhaka et al., 2007). TRPM8-deficient mice have severe deficits in avoiding cold temperatures in paw withdrawal responses to acetone evaporative cold stimuli and to cold-inducing icilin application, suggesting that TRPM8 activation also mediates generation of unpleasant signals sent to the

brain. Even though the role of TRPM8 as cold receptor is firmly established, up to date still little is known on the regulation of this channel by endogenous factors. Interestingly, two recent reports show that androgens increase TRPM8 expression in non-neural cells (Bidaux et al., 2005; Zhang and Barritt, 2004). Thus, given that a number of sensory modalities including cold and warmth perception are affected by changes of the individual hormonal status (Doeland et al., 1989; Harju, 2002; Potkanowicz et al., 2003), one would expect that the decrease of androgens would reduce cold sensitivity by down-regulating TRPM8 expression and/or function in sensory neurons. Here we show that in addition to the genomic regulation by androgens detected in the non-neural cells, TRPM8 in the peripheral nervous system is also the subject of the short-term, non-genomic inhibition by testosterone which depending on the levels of circulating androgens may notably impact the perception of innocuous cold on the whole organism level.

RESULTS

Circulating androgens reduce TRPM8-mediated cold sensitivity in rats and mice

To test the hypothesis that the level of circulating androgens is an important factor in determining cold-sensitivity *in vivo* we have first conducted extensive behavioural studies involving two thermal tests, tail immersion test and cold-avoidance (or plate preference) test, on five groups of male rats. Then in order to show that TRPM8 is the molecular determinant of the androgen effect on cold sensitivity we have used four groups of experimental male animals from two species: rats and mice, in which TRPM8 expression was ablated either with transient siRNA TRPM8 silencing or TRPM8-knockout (*TRPM8*^{-/-}). Each group in turn consisted of two, control (sham-operated) and orchidectomized (OX), subgroups, having different levels of circulating androgens. The results of these studies are documented in Figures 1 and 2.

In detail, we have first assessed the cold sensitivity of OX male rats with strongly reduced circulating testosterone levels, as compared with sham-operated ones, using standard thermal test which measures the latency of rat's tail withdrawal after immersion in the water bath maintained at different temperatures, from noxious cold (6°C) to noxious heat (48°C). As evident from Figure 1A, orchidectomy of male rats led to the clear reduction of the tail-flick latencies compared to the sham-operated counterparts in the range of innocuous cold temperatures from 16°C to 20°C (Figure 1A), indicating that decreased testosterone level promotes enhanced cold sensitivity. Consistent with this conclusion, supplementation of the OX rats with exogenous testosterone *via* implanted mini-pump in a dose-dependent manner prolonged the tail-flick latency to control values in the same range of temperatures (Figure 1A). Noteworthy, similar test did not reveal statistically significant differences between control and OX male rats in the reaction to the noxious cold (6°C) (Figure 1A), indicating that changes specifically concern the range of TRPM8 temperature sensitivity and not that of noxious cold-sensitive TRPA1.

The same results were also attained with another, cold-avoidance behavioral test, which is based on quantification of the time spent by the animal on two adjacent surfaces with different temperatures. This test is also better in excluding other than cold somatosensory modalities, such as mechanosensation, in the observed responses, as animals remain always in a free motion. Here again, OX male rats showed preferred avoidance of the surface with temperature range of 15-21°C compared to controls, and this difference could be largely eliminated by the infusion of the exogenous testosterone (Figure 1B). Thus, taken together these experiments led us to believe that the levels of circulating testosterone could confer the difference in the perception of cooling temperatures, which are in the activation range of the TRPM8 cold receptor.

To directly demonstrate the involvement of TRPM8 in the observed effects we have conducted same behavioural tests on animals with either transient knockdown or permanent

knockout of TRPM8. In the first case we used siRNA-mediated knockdown strategy on male rats, whilst in the second case we used TRPM8-null mice generated through targeted deletion of a genomic region encoding part of the amino-terminal domain (Bautista et al., 2007). In the event of transient knockdown the sequence targeted by anti-TRPM8 siRNA (siM8) was located within the TRPM8 channel's pore region in order to silence all putative functional isoforms of the channel. The employed protocol was based on previous studies demonstrating an efficient silencing of ionic channels in sensory neurons *in vivo* (Bourinet et al., 2005), and consisted in the periodic (2 per day for 3 days) intrathecal injections of siRNA between the L5 and L6 dorsal spinous of OX or sham-operated male rats. As ionic channels' turnover has been estimated to be three days in the primary culture of sensory neurons (Lambert et al., 1998), a three-day treatment was applied followed by the assessment of the animals' behaviour. Quantitative RT-PCR has shown that after such treatment TRPM8 mRNA expression in the lumbar dorsal root ganglia (DRG) of control and OX male rats decreased by $43\pm 8\%$ and $35\pm 6\%$, respectively (Figure 2A). Noteworthy, orchidectomy per se did not influence DRG's TRPM8 mRNA level in any essential way (Figures 2A and S1), suggesting that in contrast to the non-neural cells, particularly prostate epithelial cells, TRPM8 expression in the peripheral nervous system is probably not androgen-dependent.

As expected, siRNA-mediated silencing of TRPM8 in control rats resulted in the slower tail-flick latencies at 16°C and 18°C (Figure 2B), consistent with the reduced cold sensitivity due to decreased number of cold receptors. Moreover, in OX rats injection of anti-TRPM8 siRNA also led to the prolongation of the tail-flick latency at 16°C and 18°C basically to the level of control animals (Figure 2B) pointing out to TRPM8 as the target of testosterone thermoregulatory action.

All behavioural results concerning the involvement of testosterone in the TRPM8-mediated cold sensitivity obtained in experimental rats could be fully reproduced in *TRPM8*^{-/-} mice. Thus,

tail immersion test has shown that orchidectomy of the wild-type mice led to the shortening of the tail-flick latency on average by 27% in the range of temperatures 16-20°C (Figure 2C), whilst in the *TRPM8*^{-/-} mice completely lacking functional TRPM8 the tail-flick latency not only increased dramatically, but also orchidectomy failed to affect its duration (Figure 2C). Altogether the results obtained in the TRPM8 knockout mouse model are consistent with the ones obtained in rats. They allow one to draw three major conclusions: 1) testosterone regulates *in vivo* cold sensitivity in the innocuous range of cooling temperatures; 2) the target of this regulation is TRPM8 cold receptor and 3) the regulation of TRPM8 by testosterone in sensory neurons most likely occurs not through androgenic control of TRPM8 gene expression *via* classical genomic pathway.

Testosterone acutely modulates TRPM8-mediated membrane current in the native sensory neurons

As was already mentioned, TRPM8 mRNA levels were not changed in the DRGs from OX male rats as compared to the sham-operated counterparts, suggesting that the difference in the behavioural responses to the cooling temperatures in the 16-21°C range is most likely not due to androgenic control of the TRPM8 gene expression, but is rather explained by a non-genomic action of androgens. The latter is commonly associated with either direct action of the hormones on the target protein or the action *via* the putative surface receptors, whose identity often remains vague.

Non-genomic effects of sex steroid hormones generally occur on a much faster time scale compared to the actions involving genes expression and usually require from seconds to minutes to reach maximum. Thus, we next tested for the possibility of acute modulation of TRPM8-mediated membrane current (I_{TRPM8}) in the native sensory DRG neurons by the male sex

hormone, testosterone. Neurons were isolated from the lumbar DRGs of the male rats and subjected to whole-cell patch clamp recording of the menthol-evoked I_{TRPM8} at 32°C. Almost all tested DRG neurons of small diameter developed significant membrane current in response to the application of menthol (100 μ M, (Figure 3A). As this current showed pronounced outward rectification, close to 0 mV reversal potential (Figure 3C) and rapidly diminished upon menthol withdrawal – properties similar to those reported for the activation of endogenous and heterologously expressed TRPM8 (McKemy et al., 2002) – it was identified as I_{TRPM8} . In all experiments on DRG neurons I_{TRPM8} was isolated by subtracting baseline current before application of menthol from the net current in the presence of menthol (Figure 3A).

Exposure of the DRG neurons that showed menthol-activated I_{TRPM8} to testosterone within the physiological concentration range (10 nM) in the continuing presence of menthol caused rapid inhibition of the current by $83\pm 12\%$ (Figures 3B and C), which would be consistent with the suppression by testosterone of cold-evoked signalling. To make sure that such suppression indeed takes place we have also conducted current-clamp experiments, which typical result is presented in (Figure 3D). In these experiments, exposure of the resting neuron to menthol (100 μ M) caused depolarization of the membrane potential accompanied by the action potentials (AP) firing. Application of 10 nM testosterone on top of menthol induced rapid partial hyperpolarization and immediate cessation of the APs generation. Thus, inhibition of I_{TRPM8} by testosterone has negative functional consequences on cold-evoked excitation, which well agrees with the behavioural tests showing that orchidectomy leading to the decrease of circulating testosterone also promotes enhanced cold sensitivity.

Testosterone exerts specific inhibition of heterologously expressed TRPM8 via the shift of channel's voltage-dependent activation

Since native DRG neurons express numerous membrane channels and receptors which may complicate the study of the specific functional coupling between hormone and the channel, to further investigate the mechanism of the testosterone inhibitory action on TRPM8 we proceeded to the model system of HEK-293 cells stably expressing the human isoform of TRPM8 under control of tetracycline-inducible promoter (HEK-M8 cells) (Thebault et al., 2005). Pre-incubation of HEK-M8 cells with 10 nM testosterone for 10 minutes resulted in the decrease of maximal density of I_{TRPM8} (+100 mV) activated by the three main channel agonists, cool temperature (20°C), menthol and icilin by $60\pm 11\%$, $75\pm 4\%$ and $55\pm 5\%$, respectively (Figure 4A). The inhibitory action of testosterone appeared to be stable over time, since repeated applications of menthol were still unable to activate any current (Figure 4B). It was previously demonstrated that TRPM8 gating by cold involves the shift of the activation voltage-dependence towards more negative potentials (Voets et al., 2004). Using a voltage-step protocol ranging from -120 to +160 mV and “tail current” analysis, we determined whether I_{TRPM8} inhibition by testosterone is associated with the opposite shift of TRPM8 activation back to positive potentials. The midpoint voltage of current activation by menthol ($V_{1/2}$) was 15.3 ± 1.3 mV (Figure 4C). Testosterone produced a rightward shift of the activation curve to $V_{1/2} = 42.4\pm 1.5$ mV indicating that the channel needs approximately 30 mV higher depolarization to get the same activation (Figure 4C).

Apparently in terms of voltage-dependence testosterone-mediated regulation of TRPM8 is different from the cardiac L-type calcium channel, for which acute testosterone application blocked the $I_{Ca,L}$ without affecting its steady-state activation curve (Er et al., 2007). In a physiological context, testosterone exerts a vasorelaxing effect by rapidly inhibiting $I_{Ca,L}$. Since other androgens, including their precursor as well as the natural dihydro-reduced metabolites, are also capable of inducing vasorelaxation (Furukawa and Kurokawa, 2007), we next asked which other steroids could modulate TRPM8 activity and thus cold perception.

Most peripheral tissues, including neurons of the spinal cord express cytochrome P450 aromatase and 5 α -reductase, which convert testosterone to 17 β -estradiol or to DHT respectively (Evrard and Balthazart, 2004; Patte-Mensah et al., 2004). Local conversion of testosterone to oestrogen or DHT could thus allow tissue-specific control over the immediate hormonal milieu thereby regulating physiological functions. For instance, testosterone aromatization to estrogens underlies rapid regulation of the spinal mechanisms of nociception (Evrard and Balthazart, 2004). We, therefore, examined whether testosterone aromatized products have as well an effect on TRPM8. The inhibitory effects of testosterone on I_{TRPM8} could be fully reproduced by pre-treating HEK-M8 cells with 10 nM of DHT, the testosterone active metabolite (Figure 4D). On the other hand, 17 β -estradiol pre-incubation, even in high concentrations (10 nM to 1 μ M) did not affect the I_{TRPM8} elicited by cold, menthol or icilin (Figure S2), suggesting an androgen-specific effect. The specificity of the androgenic inhibitory effect was further confirmed by testing testosterone precursors and a number of structurally related steroids such as 25-hydroxycholesterol, progesterone, pregnenolone and androstenedione, no one of which had an effect on I_{TRPM8} (Figure S2).

Next, we analyzed which specific chemical groups of testosterone molecule may be most critical for the observed effects. If we take a closer look at the structure of 17 β -estradiol, testosterone and its precursors, androsterone and androstenedione, there is a clear difference in the stereochemical orientation of the chemical groups attached at the 3rd and 17th positions (Figure 4E). It is, therefore, likely that the 3-oxo and 17-hydroxyl groups are responsible for the testosterone specificity. Indeed, swapping the 3-oxo and 17-hydroxyl groups of testosterone (Androsterone) or replacing them with O-carboxymethyl oxime (Testo-CMO) and an acetate (Testo-COOCH₃) groups, respectively, abolished the inhibitory properties of testosterone on TRPM8 activity (Figure 4F). Thus, 3-oxo and 17-hydroxyl groups seem to be critical ones in

defining specificity of the testosterone effect on TRPM8. However, what still remains unknown is the molecular mechanism through which testosterone acts.

Testosterone action on TRPM8 is mediated via the Gi/AC/cAMP/PKA signaling pathway

Extracellular application of testosterone could also inhibit single-channel TRPM8 activity in cell-attached patches (Figure 5A). Together with the finding that membrane impermeable testosterone-bovine serum albumin conjugate (testosterone-BSA) was ineffective in the same configuration this suggested to us that testosterone action is mediated by surface receptor coupled to the intracellular signalling pathway rather than by direct hormone-channel interaction. Rapid, indirect non-genomic effects of sex steroid hormones may be mediated either by “classical” steroid receptors which are associated with plasma membrane and act via intracellular signalling cascades (Furukawa and Kurokawa, 2007) or by “unconventional” transmembrane steroid receptors that are distinct from the “classical” ones (Boonyaratanakornkit and Edwards, 2007).

HEK-293 cells are known to lack “classical” androgen receptor (AR) (Cullen et al., 2004). In addition, 20 minutes pre-incubation of HEK-M8 cells or DRG cells with AR inhibitor failed to impair the inhibitory action of testosterone on menthol-evoked I_{TRPM8} (data not shown) strongly suggesting the involvement of some other, “unconventional” transmembrane steroid receptor. Although the exact nature of such receptors often remains unknown, there is evidence that in response to hormone binding they may stimulate either the phospholipase C (PLC) (Loss et al., 2004) or signalling pathway(s) coupled to pertussis toxin-(PTX)-sensitive Gi/Go proteins (Rahman and Christian, 2007). PLC stimulation also leads to the depletion of PIP₂–PLC substrate and lipid messenger, which has been directly implicated in sustaining TRPM8 functional state (Liu and Qin, 2005; Rahman and Christian, 2007). Thus, altered Ca²⁺ signalling, PIP₂ depletion

and/or PTX-sensitive G proteins activation may potentially contribute to the inhibitory action of testosterone.

To obtain the general clue on possible signalling pathways involved in testosterone actions on TRPM8 we first performed the experiments with PLC inhibitor U73122 and with PTX. Short-term pre-treatment of HEK-M8 cells with testosterone (10 nM) plus U73122 (1 μ M) did not influence the ability of testosterone to suppress menthol-activated I_{TRPM8} (data not shown). On the contrary, overnight pre-treatment of HEK-M8 cells with PTX (500 ng/ml) virtually abolished the inhibitory effects of testosterone (Figure 5B). These results indicate that testosterone modulation of TRPM8 channel does not involve IP_3 , DAG or PIP_2 and is most likely mediated by PTX-sensitive Gi/Go proteins. Such G protein specificity is also consistent with the ineffectiveness of PLC inhibitor U73122 in impacting testosterone effects, as receptor-mediated stimulation of PLC is known to occur mainly *via* Gq proteins (Limonta et al., 2003). To further elucidate the role of G proteins in the testosterone-conferred inhibition of TRPM8 we have conducted experiments with non-hydrolysable GTP analogues, $GTP\gamma S$, which is a constitutive G protein activator, $GDP\beta S$, which is G protein inhibitor. Inclusion of 100 μ M $GTP\gamma S$ in the pipette solution with or without U73122 virtually abolished the responsiveness to menthol (Figure 5C) in contrast to $GDP\beta S$, which did not impair I_{TRPM8} activation by menthol (Figure S3).

In light of the above experiments, we assumed that the $GTP\gamma S$ -induced inhibition of TRPM8 is mediated predominantly through Gi protein and, therefore, tested the effect of the constitutively active (Q205L) and inactive (G204A) forms of Gai2. As shown in Figure 5D, transfection of the cells with Q205L but not with G204A mimicked the testosterone effect by exerting a similar suppression of menthol-activated I_{TRPM8} . Since engagement of Gi inhibits catalytic activity of adenylate cyclase (AC) and cAMP production, the Gi-mediated suppression of TRPM8 could be the consequence of cAMP levels reduction and a concomitant decrease in

PKA-dependent phosphorylation of TRPM8 channels or accessory protein(s) impairing TRPM8 activity. Indeed, pre-treatment of HEK-M8 with the AC inhibitor, 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine (SQ22536), decreased I_{TRPM8} by $59\pm 9\%$ while the AC activator, forskolin, reversed the testosterone I_{TRPM8} inhibition (Figure 5E). Consistent abolition of the testosterone inhibitory effect could be also achieved by 15 minutes incubation with both the cell membrane-permeable cAMP analogue, dibutyryl cAMP (db-cAMP) and the phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Figure 5F).

Thus, it seems evident that the functional link between extracellular androgens and TRPM8 cold receptor/channel involves putative surface receptor coupled to the Gi/AC/cAMP/PKA signalling pathway, which is known to suppress activity of the target protein(s) via the decrease of their cAMP/PKA-dependent phosphorylation.

DISCUSSION

The present study provides novel insight into the molecular mechanism of hormonal modulation of TRPM8 thermal receptor. We have identified the male sex steroid hormone testosterone as the principal physiological inhibitor of TRPM8 impairing cold perception *in vivo*. This inhibition was non-genomic, androgen-specific and involved a putative membrane receptor coupled to the Gi protein/AC/cAMP signalling pathway. The possibility for the acute regulation of TRPM8 channel function by androgens may not only account for the gender, age and individual differences in the perception of cold (Doeland et al., 1989; Harju, 2002; Potkanowicz et al., 2003), but may also be important for the adaptation of the organism to the environmental cold depending on plasma levels of testosterone, which in turn is variable of seasonal and dietary conditions, physical and psychosocial state (Stahl et al., 1984)(Gatenbeck et al., 1987). Our data are consistent with the notion that elevated plasma levels of testosterone both in males and

females, which usually accompany mating behaviours, physical activity, stress, aggression, by desensitizing TRPM8 would help to diminish the impact of environmental cold as a factor which may impede taking necessary actions. Hormonal regulation of TRPM8 and in turn of innocuous cooling temperatures detection may be of particular significance to the male organism helping it to better adapt to the changes of the environmental conditions.

Regulation of ion channels by sex steroid hormones in a non-genomic fashion is a quite widespread phenomenon. It involves various mechanisms and signalling pathways and contributes to the gender-related differences in a number of physiological and pathological processes. One of the best examples is regulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels and slowly-activating delayed rectifier K^{+} channels (I_{Ks}) via testosterone, progesterone, and a high-concentration of 17β -estradiol, which underlies male-female differences in the duration of cardiac action potential and predisposition to the arrhythmogenesis and involves nitric oxide (NO) produced via non-genomic stimulation of PI3-kinase/Akt/eNOS signalling cascade by classical membrane-associated sex hormone receptor (Furukawa and Kurokawa, 2007).

Up to date steroid hormone-mediated regulation via non-genomic mechanisms has been demonstrated only for three members of TRP channel family, noteworthy, all from melastatin, TRPM, subfamily: TRPM3, TRPM6 and TRPM8. Divalent cation-permeable TRPM3 channel was shown to act as ionotropic steroid receptor gated by the neuroactive steroid, pregnenolone sulphate, which can rapidly activate the channel in the heterologous expression system as well as in native insulin-producing β -cells (Wagner et al., 2008). It was concluded that such type of activation establishes TRPM3 as an ionotropic steroid receptor enabling crosstalk between steroidal and insulin-signalling endocrine systems. Just recently, non-genomic regulation of TRPM6 channel, which functions as the gatekeeper of transepithelial Mg^{2+} transport, by estrogens was found to involve hormone-induced dissociation of an interacting protein, the

repressor of oestrogen receptor activity (REA), which when bound to the channel inhibits its function (Cao et al., 2009). However, TRPM8 is so far the only TRP member responsible for the specific sensory modality, namely perception of cold, which is acutely regulated by sex steroid hormones, thereby making this modality hormone-dependent. One cannot exclude that other sensory modalities may appear hormone-dependent as well.

Despite the fact that non-genomic actions of sex steroids have been known for a long time, the receptor mechanisms mediating their rapid effects remain poorly understood. The presence of GPCR for steroid hormones has been debated for many years, but credible and rigorous proof for such an entity is still lacking. Surface steroid receptors are best described in the amphibian oocytes, where they are involved in the hormone-induced oocyte's maturation (Smith, 1989). There is strong evidence that these, mostly progestins, gonadotropin and testosterone, receptors are coupled through the G proteins to the AC/cAMP/PKA or bidirectional PLC/DAG/PKC-PLC/IP₃/Ca²⁺ signalling systems (Smith, 1989), thus, representing genuine GPCRs. For instance, the receptor for progestins that satisfies the criteria for the steroid membrane GPCR have been cloned from the spotted sea trout ovaries (Zhu et al., 2003). In mammalian cell lines transfected with this receptor, progestins and gonadotropin were able to inhibit AC and cAMP production in a pertussis toxin-sensitive manner, within 5 minutes (Zhu et al., 2003). Progesterone would bind to a membrane form of progesterone receptor of about 40 kDa. containing 7 transmembrane domains, characteristic of the GPCR structure (Zhu et al., 2003). Similar hypothesis for a membrane steroid receptor have been proposed to explain the rapid effect of estrogens (Li et al., 2003; Razandi et al., 1999).

As far as testosterone is concerned then, although several groups have reported its specific binding to the plasma membrane in different cell types, a membrane protein *via* which testosterone mediates non-classical actions has not yet been purified or cloned (Rahman and

Christian, 2007). To date three possible receptor targets for androgens have been proposed (Limonta et al., 2003). First, testosterone may act indirectly through the receptor of sex hormone-binding globulin (SHBG), which has not been cloned, but it is thought to be a GPCR or functionally linked to this type of receptor. Alternatively, testosterone might bind a membrane-associated classical AR or a membrane androgen receptor distinct from the classical AR. In view of the fact that HEK-M8 cells, which were the primary object of our study, do not contain a classical androgen receptor (Cullen et al., 2004), we propose that testosterone acts *via* some not yet identified Gi-coupled GPCR whose stimulation would decrease cAMP levels and possibly reduce the phosphorylation state of TRPM8 channel or associated regulatory protein(s). This receptor has to be highly specific to testosterone, as swapping its 3-oxo and 17-hydroxyl groups (Androsterone) or replacing them with O-carboxymethyl oxime (Testo-CMO) and an acetate (Testo-COOCH₃) groups, respectively, abolished the inhibitory properties of testosterone on TRPM8 activity.

Involvement Gi/AC/cAMP/PKA pathway in the testosterone-mediated inhibition of TRPM8 potentially makes this channel the target of regulatory influences through many other GPCRs coupled to the same pathway. Indeed, our data show the existence of functional link between Gi-coupled α 2-adrenoreceptor and TRPM8 in sensory DRG neurons utilizing Gi/AC/cAMP/PKA inhibitory pathway (Bavencoffe et al., unpublished data). As α 2-adrenoreceptor is implicated in analgesia response after nerve injury and in the thermoregulation (Birder and Perl, 1999; Hocker et al., 2008), whereas TRPM8 expression is known to increase in the rat model of chronic constrictive nerve injury (CCI) leading to the cold allodynia (Chung and Caterina, 2007; Xing et al., 2007) our findings establish general significance of Gi/AC/cAMP/PKA pathway in controlling normal as well as pathologic TRPM8 function.

In conclusion, our data demonstrate that the male sex steroid hormone testosterone is the principal physiological inhibitor of TRPM8 impairing cold perception *in vivo*. Hormonal regulation of TRPM8 and in turn of innocuous cooling temperatures detection, may be of particular significance to the male organism helping it to adapt to the changes of the environmental conditions, and could also account for the reported age-related and gender differences in thermosensation (Doeland et al., 1989; Harju, 2002; Potkanowicz et al., 2003).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Behavioural animal studies. All experiments were performed on 150-200 g male Wistar rats (Janvier, France) 20–24 g male C57Bl/6J mice (Charles River, France) and *TRPM8*^{-/-} mice (kind gift of Prof. D. Julius, UCSF). Animals were acclimatized to the laboratory conditions for at least 1 week prior to testing. They were housed in grouped cages in a temperature-controlled environment with food and water *ad libitum*. The behavioural experiments were performed blind to the genotype, in a quiet room, by the same experimenter for a given test taking great care to avoid or minimize discomfort of the animals. Treatments were randomized and all experiments were carried out according to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP (Zimmermann, 1983).

In cold avoidance test two hot/cold plate analgesia meters (Bioseb, France) were placed side by side such that the adjacent thermal surface (each 16.5×16.5 cm²) were enclosed in a single Plexiglas chamber (34×17×25 cm³). The surface temperature of each plate could be controlled individually over the range -3 to +65°C. Voluntary movement of animals between plates was recorded over 3 minutes by tallying the cumulative time spent on each plate. Temperature of one of the plates (reference) was maintained at constant value of 25°C, and the fraction of time spent

on the second plate (testing), which temperatures varied, was calculated. The number of crossing was also recorded as a measure of general exploratory behaviour (Noel et al., 2009).

In tail immersion test the tail of the animal was immersed in a water bath until withdrawal was observed (cutoff time 30 s)(Janssen et al., 1963). Separate withdrawal latency time determinations were averaged. A range of different temperatures (6–48°C) was tested.

In vivo siRNA treatment. For the siRNA assays Stealth RNAi were synthesized by Invitrogen. The sense sequences of siTRPM8 and the scramble control were 5'-CAGUGAUGUGGACAGUACCACAUAU-3' and 5'-CAGGUAGGUACAAUGACCACUGUAU-3' respectively. Intrathecal administrations of siRNA (10 µg/rat) were performed in a volume of 10 µl *via* direct transcutaneous injection (with a 25-gauge needle connected to a 25 µl Hamilton syringe) between the L5 and L6 dorsal spinous processes under animal anaesthesia with isofluran (3.5%). Treatments were randomized and all experiments were performed blind by the same experimenter using the method of equal blocks to avoid any uncontrollable environmental influence that might induce a modification in behavioural response. Animal care and experiments were carried out according to the guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP (Zimmermann, 1983).

Quantitative real-time PCR analysis. DRG were homogenized with Precellys 24 using CK14 tubes containing ceramic beads (Bertin technologies, Ozyme, France) at 5000 rpm for 2 cycles of 20 sec in Trizol and total RNA was isolated and reverse transcribed as described previously (Thebault et al., 2005). Expression levels of PCR products were quantified by quantitative real-time PCR on an ABI Prism 5700 Sequence Detection System. TRPM8 mRNA levels were quantified with the primer pair 5'-GGATCTTCCGCTCTGTCATC-3'/5'-

TCATCTAGCTCCACGCACAG-3'. The housekeeping gene HPRT was used as an endogenous control to normalize variations in RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in reverse transcription efficiency. The primers for HPRT were 5'-TAAGTTCTTTGCTGACCTGCTG-3'/5'-CCCGTTGACTGGTCATTACA-3'. To quantify the results we used the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001).

Cells and electrophysiology. Neurons were isolated from the lumbar DRG of adult Wistar rats (250-300 g) using enzymatic digestion procedure described elsewhere (Pinchenko et al., 2005). Cell suspension was plated onto Petri dishes filled with 10 % foetal calf serum- and 8 µg/ml gentamicine-supplemented DMEM ("Gibco", UK) culture medium and incubated for 18-24 h at 37° C in the 95 % air 5 % CO₂ atmosphere, prior to using in electrophysiological experiments. For the whole-cell patch clamp recordings patch pipette was filled with Cs-based intracellular solution (in mM): 140 CsCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 8 EGTA, 10 HEPES, pH 7.4, while bathing the cells in the standard extracellular solution (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 10 Glucose, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH 7.3.

HEK-M8 cells were cultured as described previously (Thebault et al., 2005) and TRPM8 expression was induced with tetracycline 24 h before experiments. Western blot analysis have shown that TRPM8 protein expression in HEK-M8 cells reaches maximum after 3 h of tetracycline (2 µg/ml) induction and then remains steady up to 48 h (Beck et al., 2007). For studying Gi-mediated regulation of TRPM8 HEK-M8 cells were co-transfected with 2 µg of the constructs of the wild type, constitutively activated (Gi(-)) and constitutively inactivated (Gi(-)) forms of Gi (kind gifts of Dr. Sylvie Hermouet, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie,

CHU de Nantes, France) together with 0.4 μg of pmax GFP using a NucleofectorTM (Amaxa, Gaithersburg, Maryland, USA).

Whole cell and cell-attached recordings were performed with Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA). The program for data acquisition is pClamp 9.0 (Axon Instruments, Inc.). For composition of extra- and intracellular solutions used, see Supplemental Table.

Drugs and chemicals. Testosterone, dihydrotestosterone, testosterone – acetate, testosterone 3-(O-carboxymethyl) oxime, androsterone, 17- β -estradiol, progesterone, menthol, GTP γ S, GDP β S, U73122, pertussis toxin, LY294002, forskolin, dibutyryl cAMP, IBMx, H-89, wortmannin, clonidine were obtained from Sigma. Icilin was obtained from Tocris. Steroids were prepared as stock solutions at 10 μM in absolute ethanol, kept at -20°C, protected from light and diluted into extracellular solution prior to experiments.

Data analysis. Data are expressed as mean \pm s.e.m. Overall statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA). In case of significance, differences between the means of two groups were analyzed by unpaired t-test, while multiple comparisons between groups were performed by ANOVA tests followed by Dunnett tests unless otherwise indicated. On all graphs (*) and (**) denote statistical significance with $P < 0.05$ and $P < 0.02$, respectively, between specified values, or if not specified to the respective control. The statistical analyses were performed using the InStat v3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA).

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include three figures and their legends, and one table.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Julius for critical reading and helpful suggestions. We are grateful to F. Van Coppenolle for his help with the testosterone implants, G. Bidaux for providing the HEK-M8 clone, S. Hermouet for the G α i2 constructs, J.L. Baneres for his valuable input with Gi proteins activity test and Ken-ichi Otsuguro for his technical assistance with patch-clamp experiments. Finally, we thank J. Brocard, L. Pelinski, C. Biot for critical discussion on testosterone chemistry. This work was supported by grants from INSERM, la Ligue nationale contre le cancer, le Ministère de l'éducation nationale and the Région Nord/Pas-de-Calais and INTAS 05-1000008-8223. D. Gkika was supported by a long-term fellowship from the European Molecular Biology Organization (ALTF-161-2006).

REFERENCES

- Bautista, D.M., Siemens, J., Glazer, J.M., Tsuruda, P.R., Basbaum, A.I., Stucky, C.L., Jordt, S.E., and Julius, D. (2007). The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature* 448, 204-208.
- Beck, B., Bidaux, G., Bavencoffe, A., Lemonnier, L., Thebault, S., Shuba, Y., Barrit, G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007). Prospects for prostate cancer imaging and therapy using high-affinity TRPM8 activators. *Cell Calcium* 41, 285-294.
- Bidaux, G., Roudbaraki, M., Merle, C., Crepin, A., Delcourt, P., Slomianny, C., Thebault, S., Bonnal, J.L., Benahmed, M., Cabon, F., *et al.* (2005). Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* 12, 367-382.
- Birder, L.A., and Perl, E.R. (1999). Expression of alpha2-adrenergic receptors in rat primary afferent neurones after peripheral nerve injury or inflammation. *J Physiol* 515 (Pt 2), 533-542.
- Boonyaratanakornkit, V., and Edwards, D.P. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* 25, 139-153.
- Bourinet, E., Alloui, A., Monteil, A., Barrere, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., McRory, J., Snutch, T.P., Eschalier, A., *et al.* (2005). Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *Embo J* 24, 315-324.
- Cao, G., van der Wijst, J., van der Kemp, A., van Zeeland, F., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2009). Regulation of the epithelial Mg²⁺ channel TRPM6 by estrogen and the associated repressor protein of estrogen receptor activity (REA). *J Biol Chem* 284, 14788-14795.
- Chung, M.K., and Caterina, M.J. (2007). TRP channel knockout mice lose their cool. *Neuron* 54, 345-347.
- Colburn, R.W., Lubin, M.L., Stone, D.J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M.R., Brandt, M.R., Liu, Y., Flores, C.M., and Qin, N. (2007). Attenuated cold sensitivity in TRPM8 null mice. *Neuron* 54, 379-386.
- Cullen, D.A., Leigh, P.N., and Gallo, J.M. (2004). Degradation properties of polyglutamine-expanded human androgen receptor in transfected cells. *Neurosci Lett* 357, 175-178.

Dhaka, A., Murray, A.N., Mathur, J., Earley, T.J., Petrus, M.J., and Patapoutian, A. (2007). TRPM8 is required for cold sensation in mice. *Neuron* *54*, 371-378.

Doeland, H.J., Nauta, J.J., van Zandbergen, J.B., van der Eerden, H.A., van Diemen, N.G., Bertelsmann, F.W., and Heimans, J.J. (1989). The relationship of cold and warmth cutaneous sensation to age and gender. *Muscle Nerve* *12*, 712-715.

Er, F., Michels, G., Brandt, M.C., Khan, I., Haase, H., Eicks, M., Lindner, M., and Hoppe, U.C. (2007). Impact of testosterone on cardiac L-type calcium channels and Ca²⁺ sparks: acute actions antagonize chronic effects. *Cell Calcium* *41*, 467-477.

Evrard, H.C., and Balthazart, J. (2004). Rapid regulation of pain by estrogens synthesized in spinal dorsal horn neurons. *J Neurosci* *24*, 7225-7229.

Furukawa, T., and Kurokawa, J. (2007). Regulation of cardiac ion channels via non-genomic action of sex steroid hormones: implication for the gender difference in cardiac arrhythmias. *Pharmacol Ther* *115*, 106-115.

Gatenbeck, L., Eneroth, P., Johansson, B., and Stromberg, L. (1987). Plasma testosterone concentrations in male rats during short and long-term stress stimulation. *Scand J Urol Nephrol* *21*, 139-142.

Harju, E.L. (2002). Cold and warmth perception mapped for age, gender, and body area. *Somatosens Mot Res* *19*, 61-75.

Hocker, J., Paris, A., Scholz, J., Tonner, P.H., Nielsen, M., and Bein, B. (2008). Differential effects of alpha 2-adrenoceptors in the modulation of the thermoregulatory response in mice induced by meperidine. *Anesthesiology* *109*, 95-100.

Janssen, P.A., Niemegeers, C.J., and Dony, J.G. (1963). The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung* *13*, 502-507.

Lambert, R.C., McKenna, F., Maulet, Y., Talley, E.M., Bayliss, D.A., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Perez-Reyes, E., and Feltz, A. (1998). Low-voltage-activated Ca²⁺ currents are generated by members of the CavT subunit family (alpha1G/H) in rat primary sensory neurons. *J Neurosci* *18*, 8605-8613.

Li, L., Haynes, M.P., and Bender, J.R. (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4807-4812.

Limonta, P., Moretti, R.M., Marelli, M.M., and Motta, M. (2003). The biology of gonadotropin hormone-releasing hormone: role in the control of tumor growth and progression in humans. *Front Neuroendocrinol* 24, 279-295.

Liu, B., and Qin, F. (2005). Functional control of cold- and menthol-sensitive TRPM8 ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Neurosci* 25, 1674-1681.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.

Loss, E.S., Jacobsen, M., Costa, Z.S., Jacobus, A.P., Borelli, F., and Wassermann, G.F. (2004). Testosterone modulates K(+)ATP channels in Sertoli cell membrane via the PLC-PIP2 pathway. *Horm Metab Res* 36, 519-525.

McKemy, D.D., Neuhauser, W.M., and Julius, D. (2002). Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416, 52-58.

Noel, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., *et al.* (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28, 1308-1318.

Patte-Mensah, C., Penning, T.M., and Mensah-Nyagan, A.G. (2004). Anatomical and cellular localization of neuroactive 5 alpha/3 alpha-reduced steroid-synthesizing enzymes in the spinal cord. *J Comp Neurol* 477, 286-299.

Pinchenko, V.O., Kostyuk, P.G., and Kostyuk, E.P. (2005). Influence of external pH on two types of low-voltage-activated calcium currents in primary sensory neurons of rats. *Biochim Biophys Acta* 1724, 1-7.

Potkanowicz, E.S., Caine-Bish, N., Otterstetter, R., and Glickman, E.L. (2003). Age effects on thermal, metabolic, and perceptual responses to acute cold exposure. *Aviat Space Environ Med* 74, 1157-1162.

Rahman, F., and Christian, H.C. (2007). Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab* 18, 371-378.

Razandi, M., Pedram, A., Greene, G.L., and Levin, E.R. (1999). Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol* *13*, 307-319.

Smith, L.D. (1989). The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development* *107*, 685-699.

Stahl, F., Gotz, F., and Dorner, G. (1984). Plasma testosterone levels in rats under various conditions. *Exp Clin Endocrinol* *84*, 277-284.

Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., *et al.* (2005). Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* *280*, 39423-39435.

Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004). The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* *430*, 748-754.

Wagner, T.F., Loch, S., Lambert, S., Straub, I., Mannebach, S., Mathar, I., Dufer, M., Lis, A., Flockerzi, V., Philipp, S.E., *et al.* (2008). Transient receptor potential M3 channels are ionotropic steroid receptors in pancreatic beta cells. *Nat Cell Biol* *10*, 1421-1430.

Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W., and Gu, J.G. (2007). TRPM8 mechanism of cold allodynia after chronic nerve injury. *J Neurosci* *27*, 13680-13690.

Zhang, L., and Barritt, G.J. (2004). Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* *64*, 8365-8373.

Zhu, Y., Rice, C.D., Pang, Y., Pace, M., and Thomas, P. (2003). Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 2231-2236.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* *16*, 109-110.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Testosterone reduces cold perception in rats. **(A)** Tail-withdrawal latencies at specified water bath temperatures of sham-operated (sham), orchidectomized (OX), or OX with exogenous testosterone supplementation male rats (mean±s.e.m., n=6-8). **(B)** Avoidance of the test plate with specified cooling temperatures (cold-avoidance test) by sham operated (sham), orchidectomized (OX), or OX with exogenous testosterone supplementation male rats (mean±s.e.m., n=6-8); exogenous testosterone supplementation on **A** and **B** is presented in percentage to normal circulating levels.

Figure 2 TRPM8 knockdown and knockout eliminate regulation of cold sensitivity by testosterone. **(A)** Reduction of TRPM8 expression in lumbar DRGs of sham-operated (sham) and orchidectomized (OX) male rats injected intrathecally with anti-TRPM8 siRNA (siM8) as compared to mismatch (control) siRNA assayed by quantitative RT-PCR; values were calculated as a ratio to hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) expression (mean±s.e.m., n=8-10). **(B)** Comparison of the tail-flick latencies at 16°C and 18°C of the control (sham) and orchidectomized (OX) male rats without (mismatch) and with siRNA-mediated TRPM8 silencing (siM8) (mean±s.e.m., n=8-10). **(C)** Tail-withdrawal latencies at specified water bath temperatures of sham-operated (sham), and orchidectomized (OX) wild-type (WT) and *TRPM8*^{-/-} male mice (mean±s.e.m., n=6-8).

Figure 3 Testosterone inhibits TRPM8-mediated current in the native DRG neurons. **(A)** Representative recordings of the baseline current in DRG neurons at 32° C and currents after consecutive applications of menthol (100 µM) and menthol plus testosterone (10 nM); voltage-

clamp protocol is shown above the recordings. **(B)** Averaged time-courses of the net outward current in 5 DRG neurons at +100 mV during application of menthol (100 μ M) and testosterone (10 nM); current amplitudes were normalized to the neuron's membrane capacitance before averaging (mean \pm s.e.m., n=5). **(C)** Averaged I-V relationships (mean \pm s.e.m., n=5) of the current in the presence of menthol (100 μ M, black symbols, control) and menthol plus testosterone (10 nM, open symbols, Testo); inset shows quantification of the effects of testosterone on the density of menthol-activated I_{TRPM8} at +100 mV, (*) denotes statistically significant differences with $P < 0.05$. **(D)** Suppression by testosterone (10 nM) of menthol-evoked action potential firing in DRG neurons; the recording of neuron's membrane potential was performed in the current-clamp mode; application of menthol (100 μ M) caused depolarization and AP firing, whilst application of testosterone on top of menthol caused hyperpolarization and cessation of AP firing.

Figure 4 Inhibitory effects of androgens on TRPM8 heterologously expressed in HEK-293 cells.

(A) Quantification of the mean density of I_{TRPM8} (at +100 mV) activated by cold (20° C), menthol (100 μ M) and icilin (10 μ M) in HEK-M8 cells under control conditions and after incubation in testosterone (10 nM) (n=6). **(B)** Averaged time-courses of the whole-cell current density (measured at +100 mV) in control HEK-M8 cells (black triangles) and cells pre-incubated in testosterone (10 nM, open circles) during consecutive exposures to menthol (100 μ M, n=5-6). **(C)** Voltage-dependence of steady-state activation of menthol-evoked I_{TRPM8} in control HEK-M8 cells (black triangles) and cells pre-incubated in testosterone (10 nM, open circles); symbols: experimental data points (mean \pm s.e.m., n=8-9), continuous lines: the best fit with Boltzmann equation; inset provides magnified view of the voltage-dependencies within the range of "physiological" resting potentials. **(D)** Averaged I-V relationships of menthol-evoked I_{TRPM8} in the control HEK-M8 cells and cells treated with 10 nM testosterone or DHT (n=5-6); inset,

quantification of the respective mean I_{TRPM8} densities at +100 mV. **(E)** Structures of the steroids tested; the 3- and 17-groups that differ among the steroids are indicated by one and two arrows, respectively. **(F)** Quantification of the mean menthol-evoked I_{TRPM8} densities at +100 mV in the control HEK-M8 cells and cells treated with testosterone, Testo-COOCH₃, Testo-CMO, or androsterone (all in 10 nM) (mean±s.e.m., n=7-9); the lowest panel shows representative traces of menthol-activated I_{TRPM8} in response to the voltage-steps ranging from -100 to +100 mV under respective conditions.

Figure 5 Molecular pathway involved in the testosterone-mediated TRPM8 inhibition. **(A)** Upper panel: representative recordings of the baseline TRPM8 single channel activity in cell-attached patch at room temperature before (left) and after (right) bath application of testosterone; lower panel: changes in the TRPM8 single channel open probability in cell-attached patch before and after exposure to testosterone; dashed line indicates mean respective values. **(B)** Quantification of the mean menthol-evoked I_{TRPM8} densities at +100 mV in the control HEK-M8 cells and cells pre-treated with PTX (500 ng/ml, overnight) in the absence and in the presence of testosterone (10 nM) (mean±s.e.m., n=5-6). **(C)** Averaged I-V relationships of menthol-evoked I_{TRPM8} in HEK-M8 cells dialyzed with the control pipette solution or the pipette solution supplemented with either GTP γ S (100 μ M) alone or in combination with U73122 (1 μ M) (n=4-6); inset, quantification of the mean menthol-evoked I_{TRPM8} densities at +100 mV under respective conditions. **(D)** Quantification of the mean menthol-evoked I_{TRPM8} densities at +100 mV in the control HEK-M8 cells and cells transfected with the wild-type Gi protein (WT), its inactive (Gi(-)) or constitutively active (Gi(+)) isoforms, in the absence and in the presence of testosterone (Testo) (mean±s.e.m., n=5-7). **(E)** Mean changes of menthol-activated I_{TRPM8} (at +100 mV) in HEK-M8 cells (n=5-7) pre-treated with testosterone (10 nM), testosterone plus forskolin (10 μ M)

or SQ22536 (200 μ M) relative to control. **(F)** Quantification of the mean menthol-evoked I_{TRPM8} densities at +100 mV in the control HEK-M8 cells and cells pre-incubated in db-cAMP (1 mM) plus IBMX (100 μ M) alone or in combination with testosterone (10 nM) (mean \pm s.e.m., n=7).

Figure 1

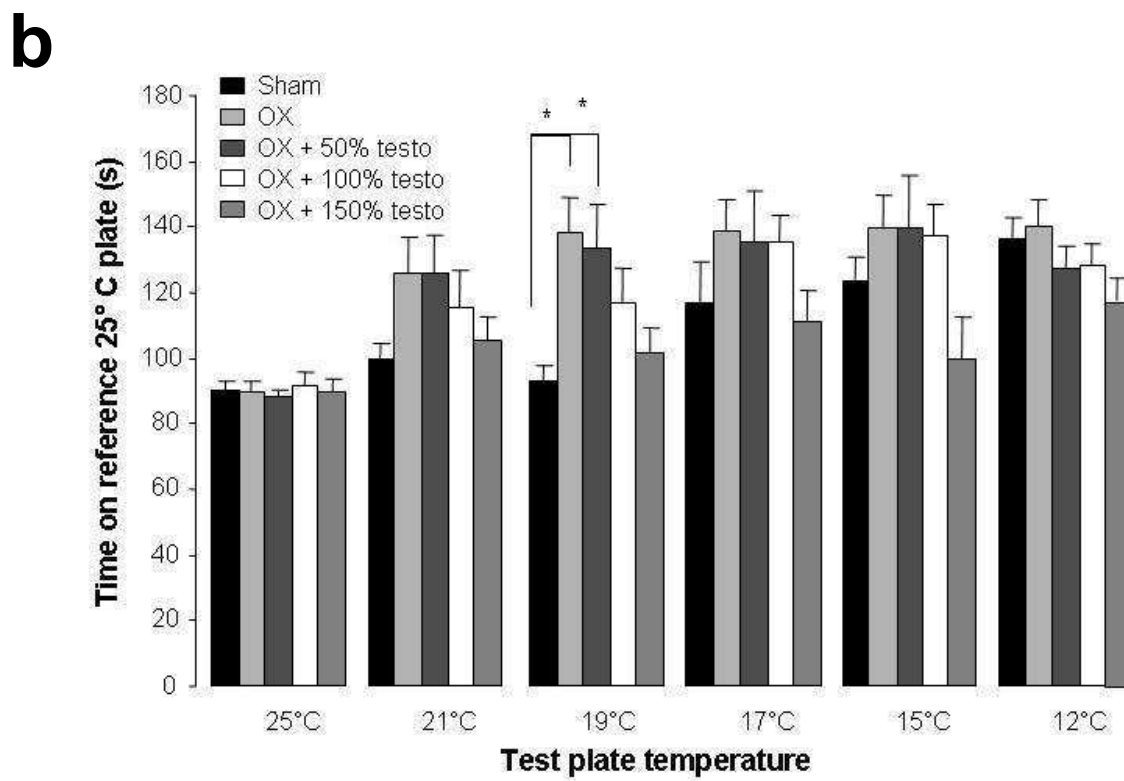
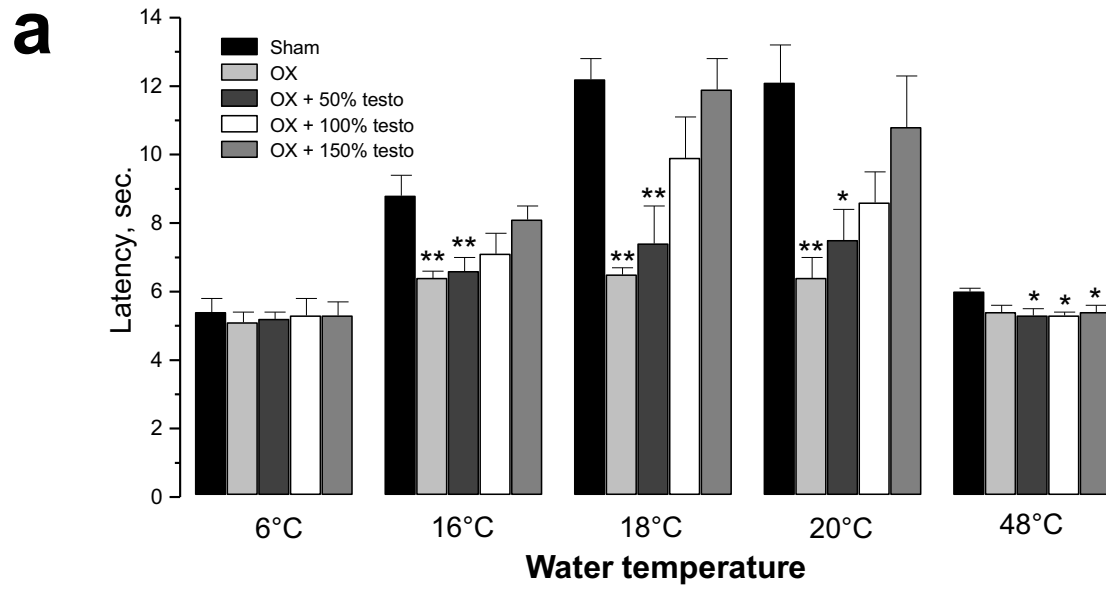


Figure 2

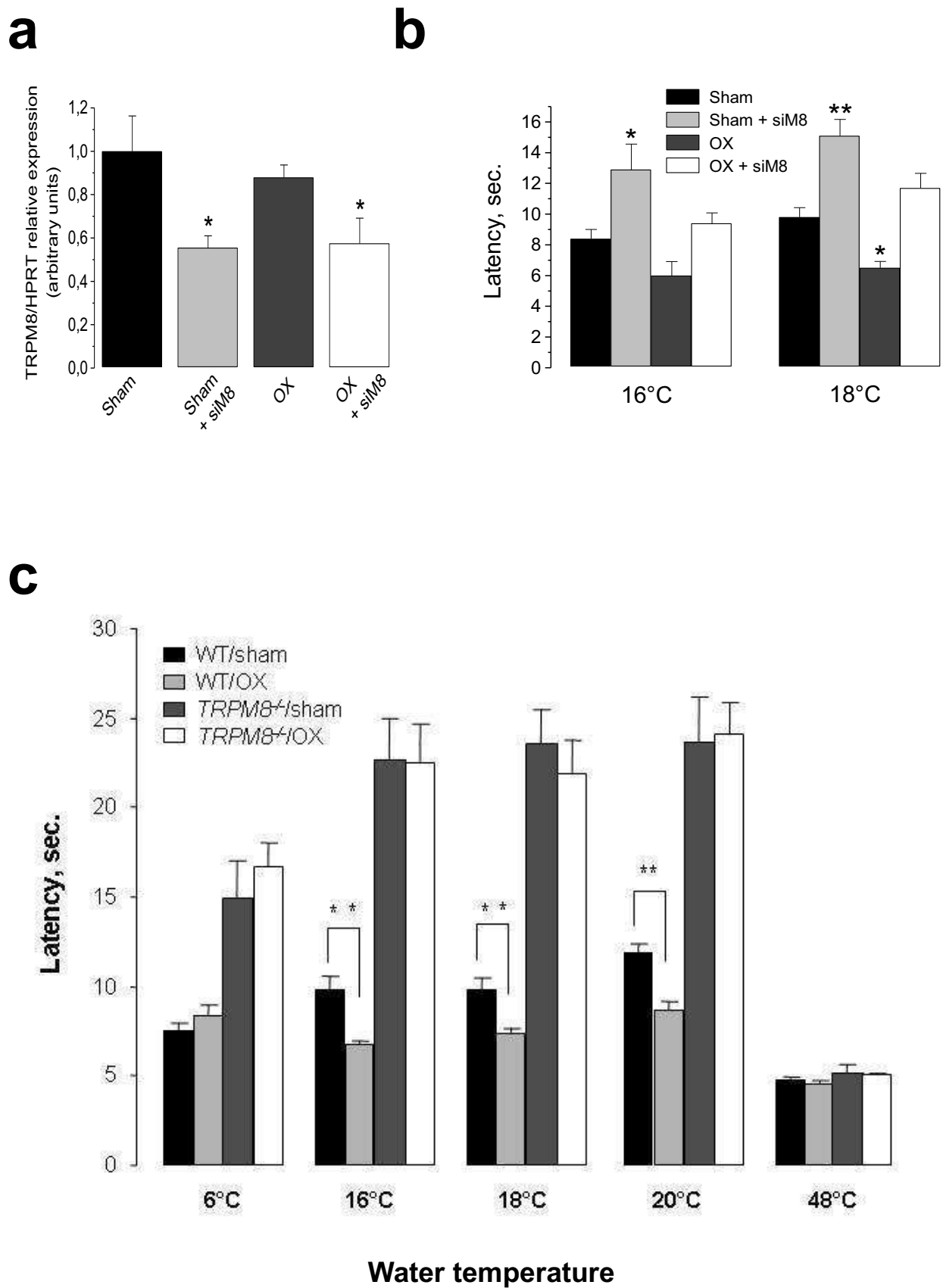
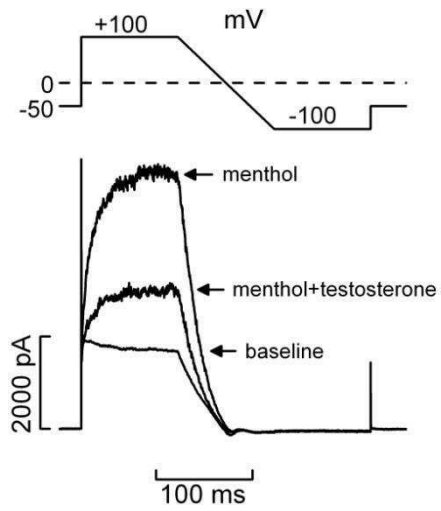
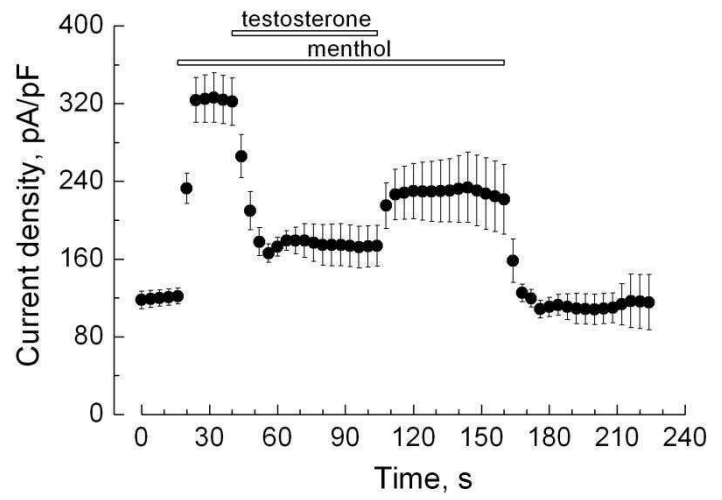


Figure 3

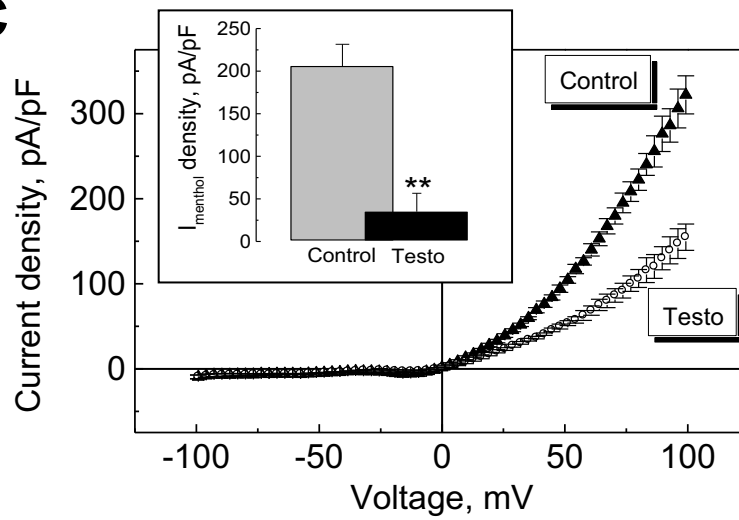
a



b



c



d

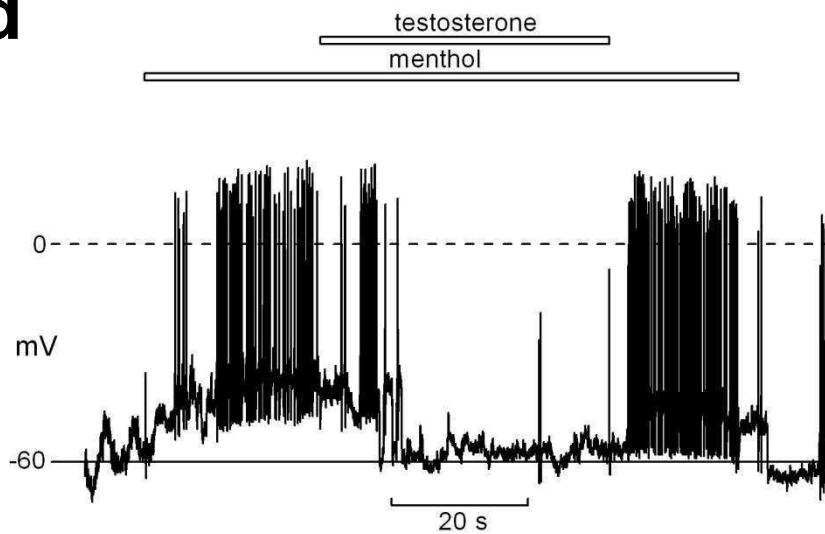
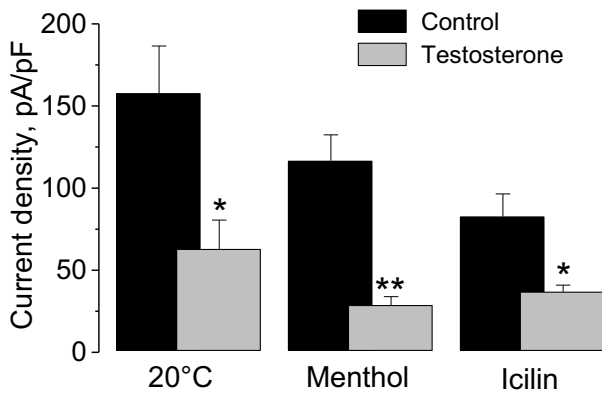
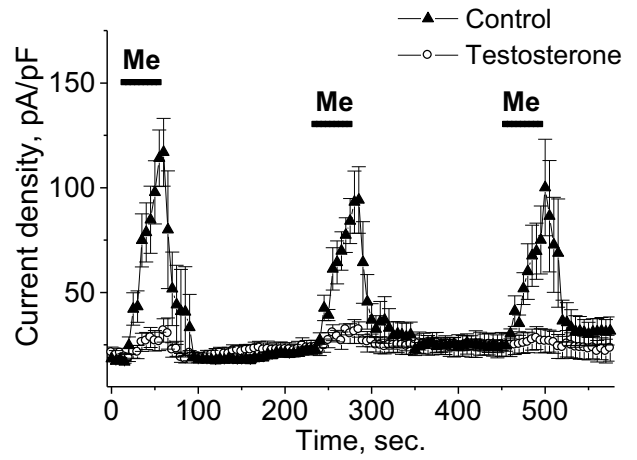


Figure 4

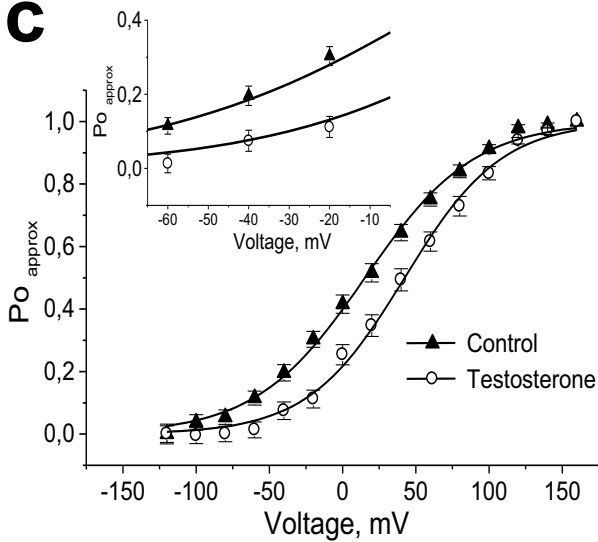
a



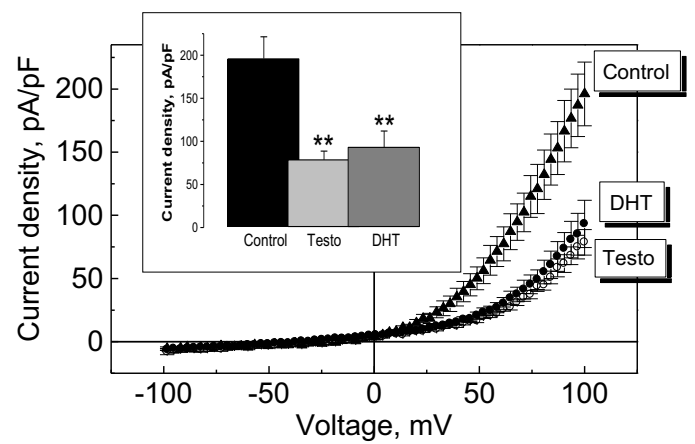
b



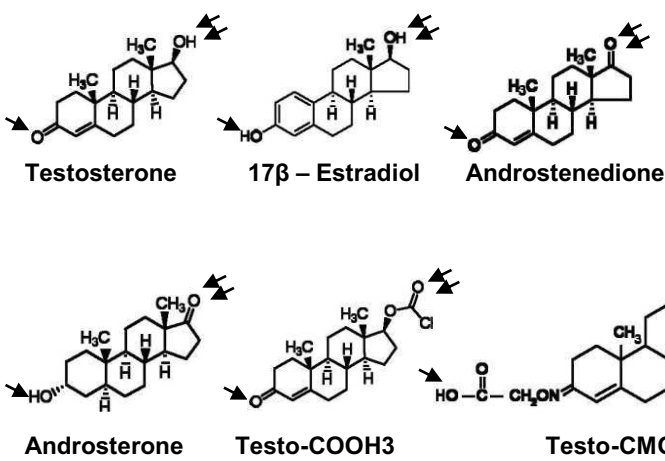
c



d



e



f

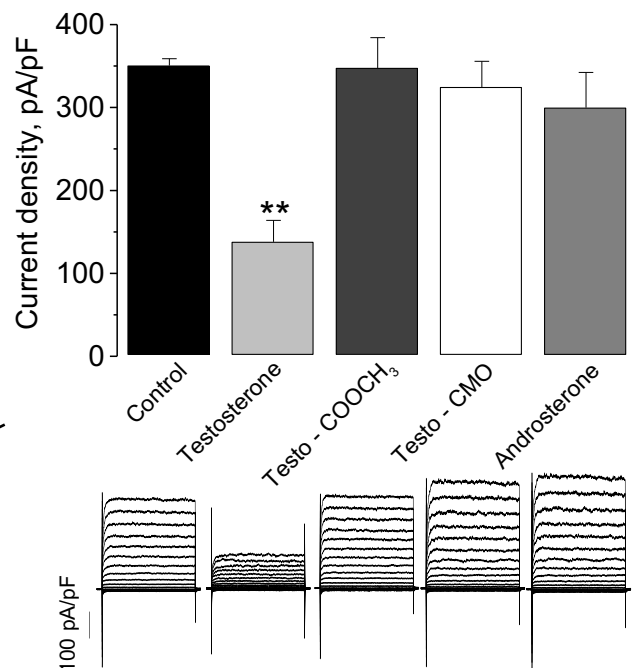
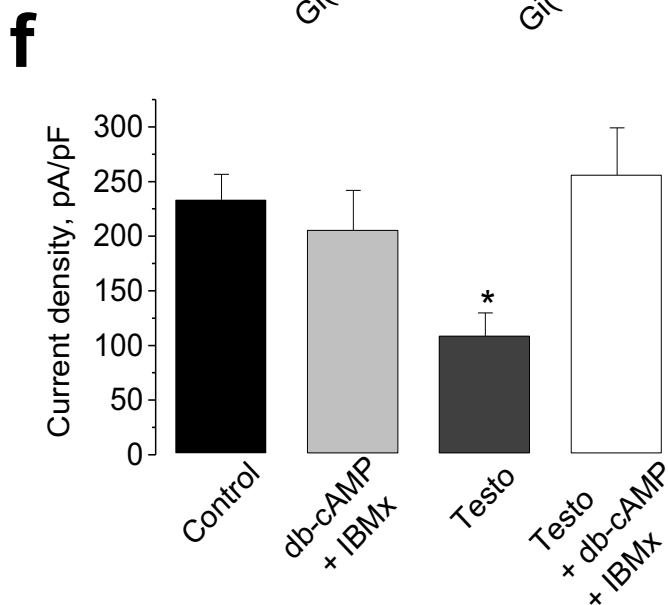
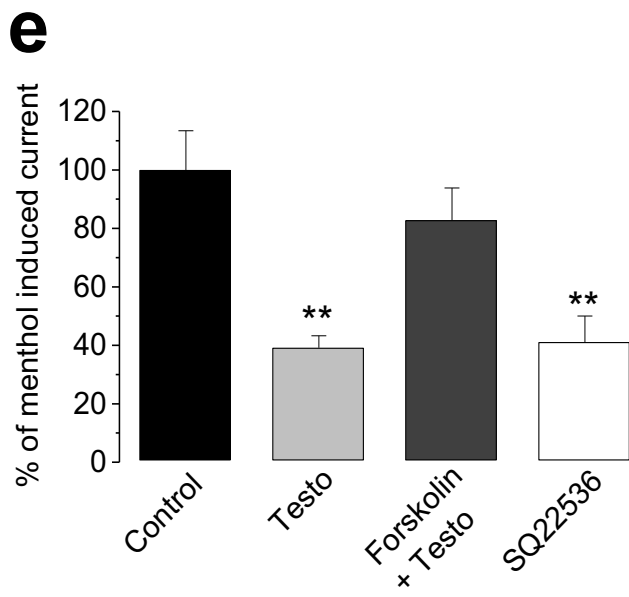
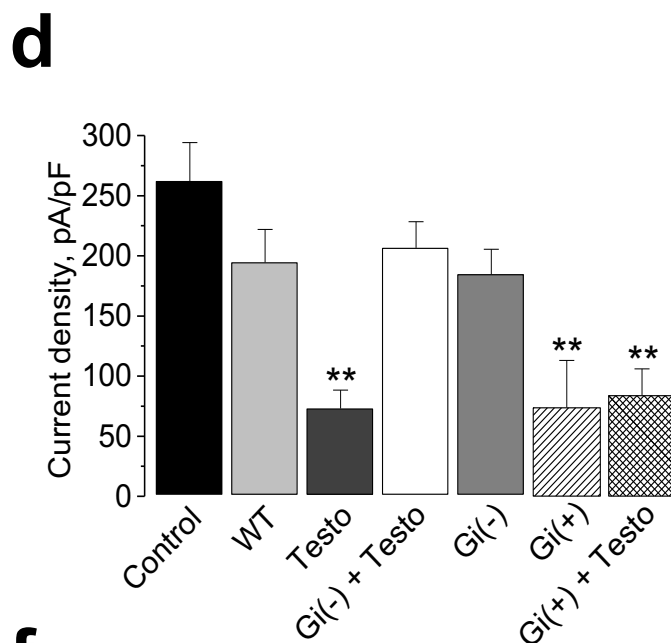
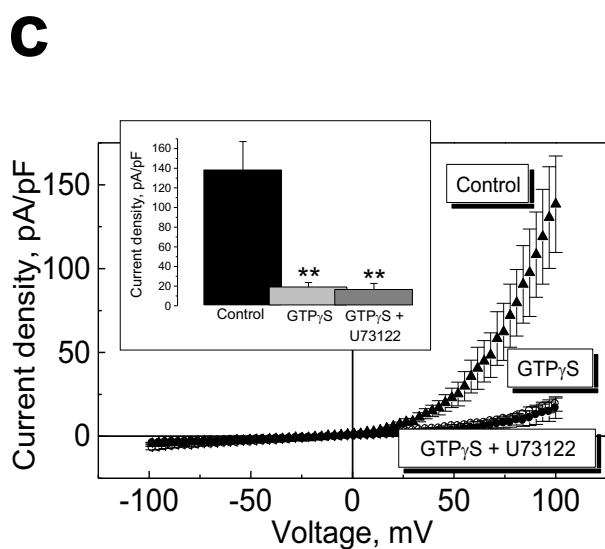
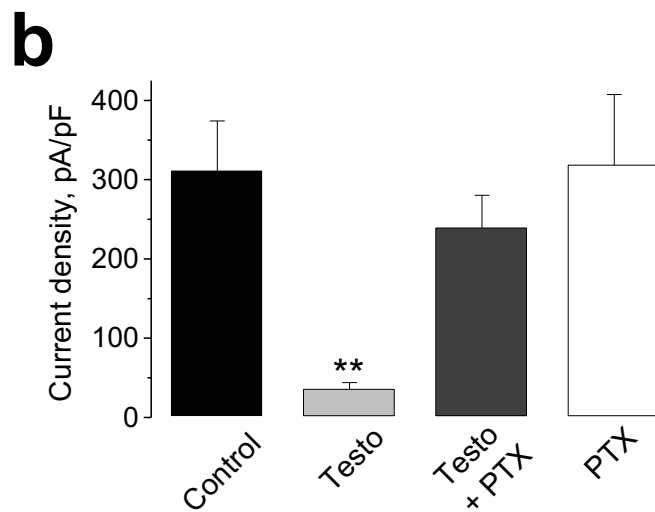
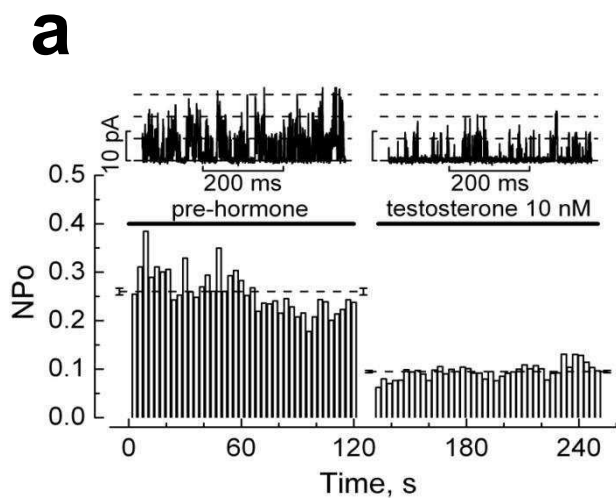


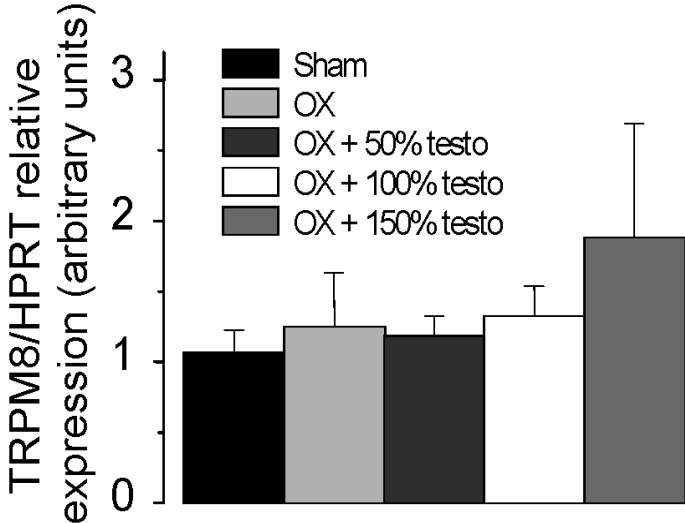
Figure 5



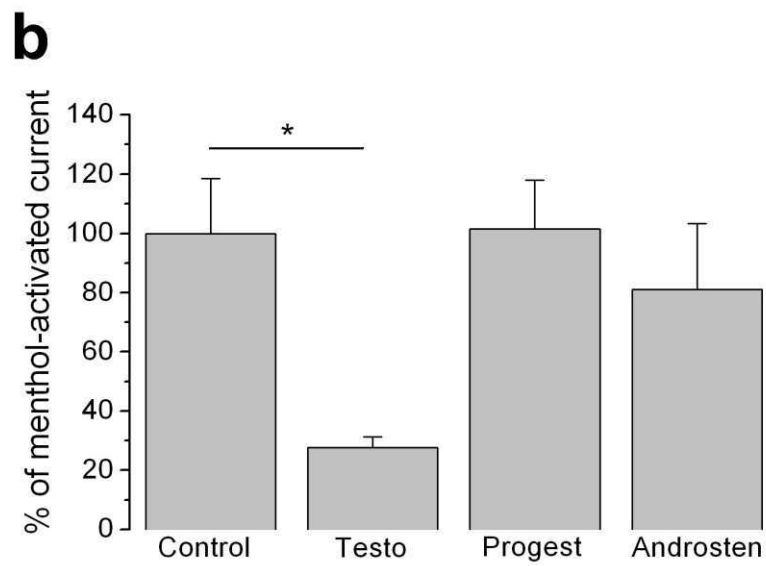
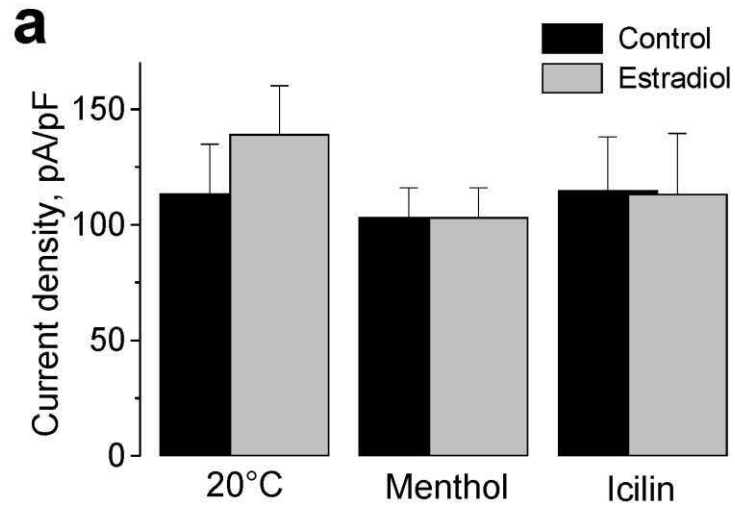
Supplemental data

Supplemental Data include three figures and their legends, and one table.

Supplemental figure S1, related to figure 2



Supplementary figure S2, related to figure 4



Supplementary figure S3, related to figure 5

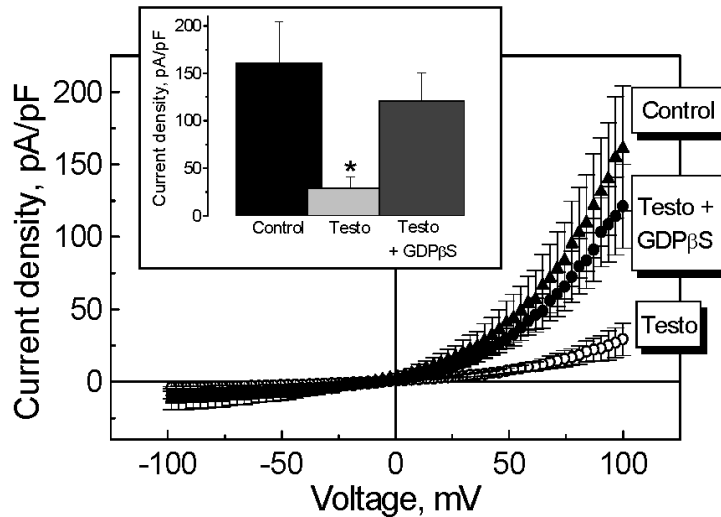


Figure S1 Expression of TRPM8 in rat DRG neurons. Quantitative RT-PCR on the expression of TRPM8 transcripts relative to HPRT in the lumbar DRGs of the sham-operated (sham), orchidectomized (OX), or OX with exogenous testosterone supplementation (in the specified percentage to the normal plasma level) male rats (mean±s.e.m., n=6-8).

Figure S2 The action of non-testosterone steroids on TRPM8. **(A)** Quantification of the mean density of I_{TRPM8} (at +100 mV) activated by cold (20° C), menthol (100 μM) and icilin (10 μM) in HEK-M8 cells under control conditions and after incubation in 17β-estradiol (10 nM) (n=6-7). **(B)** Lack of the effect of progesterone and androstenediole as compared to testosterone on menthol-activated I_{TRPM8} (control); I_{TRPM8} was measured at +100 mV in the absence and in the presence of the respective hormone and the relative change was tabulated and averaged (mean±s.e.m., n=6-8).

Figure S3 G protein inhibition by GDP β S eliminates inhibitory action of testosterone on I_{TRPM8}. Averaged I-V relationships of menthol-evoked I_{TRPM8} in HEK-M8 cells dialyzed with the control pipette solution or the pipette solution supplemented with GDP β S (100 μ M) in the absence or in the presence of testosterone (10 nM) (n=5); inset, quantification of the respective data at +100 mV.

Table Composition of the solutions used in the patch-clamp experiments on HEK-M8 cells.

Compound	Extracellular	Intracellular
	Concentration (mM)	
NaCl	140	
KCl	5	140
MgCl ₂	2	1
CaCl ₂	2	2,5
Na ₂ HPO ₄	0,3	
KH ₂ PO ₄	0,4	
NaHCO ₃	4	
Glucose	5	
HEPES	10	10
EGTA		4
Osmolarity	320	290
pH	7,4	7,2
pH adjusted with	NaOH	KOH

THE TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL CHANNEL TRPM8 IS INHIBITED VIA THE ALPHA2A ADRENORECEPTOR SIGNALING PATHWAY

Alexis Bavencoffe^{1‡}, Dimitra Gkika^{1‡}, Artem Kondratskyi², Benjamin Beck¹, Anne-Sophie Borowiec¹, Gabriel Bidaux¹, Jérôme Busserolles³, Alain Eschalier³, Yaroslav Shuba², Roman Skryma^{1§} and Natalia Prevarskaya^{1§}

¹Inserm U800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, F59655 Villeneuve d'Ascq, France; Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), F59655 Villeneuve d'Ascq, France; ²Bogomoletz Institute of Physiology and International Center of Molecular Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine; ³INSERM, U766, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne, 63001 Clermont-Ferrand, France

[‡] Share first authorship

[§] Share senior authorship

Running head: TRPM8 regulation by Gi-coupled receptors

Address correspondence to: Natalia Prevarskaya, Laboratoire de physiologie cellulaire, Inserm U800, USTL, F59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: (33) 3 20 33 60 18, fax: (33) 3 20 43 40 66, e-mail: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr

The Transient Receptor Potential channel Melastatin member 8 (TRPM8) is expressed in sensory neurons where it constitutes the main receptor of environmental innocuous cold (10-25° C). Among several types of G protein-coupled receptors expressed in sensory neurons, Gi-coupled α 2A-adrenoreceptor (α 2A-AR), is known to be involved in the thermoregulation, however, the underlying molecular mechanisms remain poorly understood. Here we demonstrated that stimulation of α 2A-AR inhibited TRPM8 in sensory neurons from rat dorsal root ganglia (DRG). In addition, using specific pharmacological and molecular tools combined with patch-clamp current recordings, we found that in heterologously expressed HEK-293 (Human Embryonic Kidney) cells, TRPM8 channel is inhibited by the Gi protein/adenylate cyclase (AC)/cAMP/protein kinase A (PKA) signaling cascade. We further identified the TRPM8 S9 and T17 as two key PKA phosphorylation sites regulating TRPM8 channel activity.

We therefore propose that inhibition of TRPM8 through the α 2A-AR signaling cascade could constitute a new mechanism of modulation of thermosensation in both physiological and pathological conditions.

The members of Transient Receptor Potential (TRP) superfamily of cationic channels display diverse activation mechanisms and participate in a plethora of physiological and pathological processes (1), which made them the focus of intense research over the last decades. A

number of TRPs, dubbed thermo-TRPs, from TRPV (Vanilloid), TRPM (Melastatin) and TRPA (Ankyrin) subfamilies can be activated by various ambient temperatures ranging from noxious cold to noxious heat. They also respond to chemical imitators of temperatures and to a number of chemical and environmental irritants (2). No wonder that with such activating stimuli virtually all thermo-TRPs are implicated in nociception and pain transduction (3,4).

So far, the best known and characterized temperature-gated TRP channels are TRPV1, activated by noxious heat (>42° C) (2), and TRPM8, activated by innocuous cold (<25° C) (5). Capsaicin, the active constituent of hot chili pepper, mimics the sensation of heat via TRPV1 activation, whilst peppermint oil component, menthol, causes cooling sensation, via TRPM8 gating (2). Except for the innocuous cold and menthol, TRPM8 can be also activated by some other cooling agents such as icilin and eucalyptol as well as by non-cooling compounds hydroxycitronellal, geraniol and linalool (6). It has been shown that the mechanism of TRPM8 activation by cold and menthol involves negative shift in the channel's voltage-dependent opening from very positive non-physiological membrane potentials toward physiological values (7,8).

TRPM8 is expressed in the subset of dorsal root ganglion (DRG) and trigeminal sensory neurons in which it acts as cold receptor (5,9). Recently, using TRPM8-knockout mice three independent groups have established that TRPM8 is indeed the principal detector of environmental cold (10-12). TRPM8-deficient mice have severe deficits in avoiding cold

temperatures and in paw withdrawal responses to acetone and icilin, suggesting that TRPM8 activation mediates generation of unpleasant signal sent to the brain. Moreover, the expression of TRPM8 is increased in neuropathic pain models. However, the consequences of such increase may depend on the nature of pain and pain condition. Indeed, enhanced TRPM8 expression in rat model of chronic constriction injury of sensory nerves (CCI) induces hyperexcitability of menthol- and cold-sensitive neurons to innocuous cold, which underlies the mechanism of cold allodynia (13,14). On the other hand, TRPM8 activation also mediates analgesic effects to the more noxious stimuli, as TRPM8 agonists are known to suppress mechanical and heat nociception in the CCI animals (15). The analgesic effect of TRPM8 activation was suggested, though, to involve central metabotropic glutamate receptors (mGluRs) and glutamate release from TRPM8-containing afferents exerting an inhibitory gate control over nociceptive inputs (15).

Among several types of G protein-coupled receptors (GPCR) expressed in sensory neurons, Gi-coupled α 2A-adrenoreceptor (α 2A-AR) is known to be involved in analgesia response after nerve injury and in the thermoregulation (16,17). Moreover, α 2A-AR is central to the antinociceptive action of clinically used α 2A-AR agonist, clonidine. Antinociceptive effect of α 2A-AR activation becomes much more pronounced following peripheral nerve injury (18). Given that the molecular target of α 2A-AR-mediated antinociception is not well understood and that CCI animal model is associated with 1) upregulated TRPM8 expression, 2) gain in TRPM8-mediated cold allodynia and 3) increased α 2A-AR-mediated antinociception, we reasoned that there might be a mechanistic link between α 2A-AR and TRPM8, via which α 2A-AR can negatively control TRPM8 function under condition of its overexpression.

Thus, the purpose of our work was to investigate if α 2A-AR can modulate TRPM8 activity and if so, what signaling pathway is involved. Our results show that stimulation of α 2A-AR inhibits TRPM8 in sensory neurons from rat DRG. Based on heterologous expression of various components of α 2A-AR-to-TRPM8 pathway in HEK-293 (Human Embryonic Kidney) cells, employment of specific pharmacological and molecular tools combined with patch-clamp recording of the whole-cell TRPM8 currents, we show that this effect is

mediated via Gi protein coupled to the inhibition of adenylate cyclase (AC)/cAMP/protein kinase A (PKA) pathway. Resulting decrease in the PKA-dependent phosphorylation of TRPM8 reduces normal channel activity. Thus, in this work we propose a novel physiological mechanism regulating TRPM8 channel activity.

Experimental Procedures

Cells and electrophysiology – HEK-293 cells stably transfected with human TRPM8 (HEK-293_{M8}) were cultured as described previously (19), and TRPM8 expression was induced with tetracycline 24 h before the experiments (20). The composition of the normal extracellular solution used for electrophysiological recordings was (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 0.3 Na₂HPO₄, 0.4 KH₂PO₄, 4 NaHCO₃, 5 Glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.4 with NaOH). Patch-clamp pipettes were filled with an intracellular solution containing (in mM): 140 KCl, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 4 EGTA, 10 HEPES (calculated free Ca²⁺ concentration: 150 nM, pH adjusted to 7.2 with KOH).

Neurons were isolated from the lumbar DRG of adult Wistar rats (250-300 g) using enzymatic digestion procedure described elsewhere (21). Cell suspension was plated onto Petri dishes filled with DMEM (Gibco, UK) culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and 8 μ g/ml gentamicin and incubated for up to 18-24 h at 37° C in the 95% air 5% CO₂ atmosphere prior to using them in electrophysiological experiments. During whole-cell patch-clamp recordings DRG neurons were bathed in the standard extracellular solution (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 10 Glucose, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, pH 7.4, while dialyzed with Cs-based intracellular patch-pipette solution to minimize background outward currents, (in mM): 140 CsCl, 5 EGTA, 10 HEPES, 2 Mg-ATP, 0.5 Li-GTP, pH adjusted to 7.3 with Cs(OH).

Whole-cell patch-clamp experiments on DRG neurons and HEK-293_{M8} cells were performed using Axopatch 200B amplifier and pClamp 9.0 software (Molecular Devices, Union City, CA) for data acquisition and analysis. Patch pipettes for the whole-cell recordings were fabricated from borosilicate glass capillaries (World Precision Instr., Inc., Sarasota, FL) on horizontal puller (Sutter Instruments Co., Novato, CA) and had resistance of 3–5 M Ω for HEK-293 cells or 2-3 M Ω for DRG neurons

when filled with intracellular solutions.

In the course of patch-clamp recording, drugs and solutions were applied to the cells using temperature-controlled microperfusion system (Cell MicroControls, Norfolk, VA) with common outflow of the multiple solution lines, which was placed in the close proximity (~200 μm) to the studied cell. Membrane currents through TRPM8 channels (I_{TRPM8}) were activated by temperature drop from 33° C to 20° C (cold), icilin (10 μM) or menthol (500 μM or 100 μM in the event of DRG neurons) and monitored by applying every 3 s voltage-clamp pulses that consisted of initial 200 ms depolarization to +100 mV enabling full current activation followed by descending ramp (rate 0.4 mV/ms) to -100 mV (see Fig. 6A). The ramp portion of the current served for constructing I-V relationship.

Plasmids and transfections – $\alpha 2\text{A}$ -adrenoreceptor subtype constructs are kind gifts of Prof. Lutz Hein (Institute of Pharmacology and Toxicology, University of Freiburg, Germany) and Prof. Stephen Lanier (Department of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Louisiana State University Health Sciences Center, New Orleans, USA). Constructs of the wild type, constitutively activated (Q205L) and constitutively inactivated (G204A) forms of Gi are kind gifts of Dr. Sylvie Hermouet (Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, France).

HEK-293_{M8} were co-transfected with 2 μg of each construct and 0.4 μg of pmax GFP using a NucleofectorTM (Amaxa, Gaithersburg, Maryland, USA). Cells were used for patch-clamp experiments 24 hours after nucleofection.

Drugs and chemicals – All chemicals were purchased from Sigma Aldrich except for icilin which was from Tocris. The final concentration of ethanol and DMSO in the experimental solution did not exceed 0.1%.

Data analysis – Data were analyzed with Clampfit 9.0 and Origin 5.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Data are expressed as mean \pm s.e.m. Overall statistical significance was determined by analysis of variance (ANOVA). In case of significance, differences between the means of two groups were analyzed by unpaired t-test, while multiple comparisons between groups were performed by ANOVA tests followed by Dunnett tests unless otherwise indicated. $P < 0.05$ was considered significant. The statistical analyses were performed using the InStat v3.06 (GraphPad Software, Inc., San

Diego, CA).

All results presented in this article are representative of two or three experiments.

Mutagenesis – The five putative PKA phosphorylation sites predicted for the human TRPM8 sequence by the prediction tool *pkaPS* described (22) were mutated into “inactive” alanines and constitutively “active” aspartic acids. Ten mutants were therefore generated by *in vitro* mutagenesis in the hTRPM8pcDNA4 plasmid (19) using the primers shown in the Table 1 (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit, Agilent Technologies-Stratagene products).

RESULTS

Stimulation of $\alpha 2\text{A}$ -adrenoreceptor inhibits TRPM8 function. To test for functional coupling between $\alpha 2\text{A}$ -adrenoreceptors and TRPM8 channel, both of which were implicated in antinociception and cold hypersensitivity, we used HEK-293 cell line stably expressing human TRPM8 (HEK-293_{M8}), which was created in our lab (20), in addition transiently transfected with $\alpha 2\text{A}$ $\alpha 2$ -adrenoreceptor subtype (HEK-293_{M8- $\alpha 2\text{A}$ -AR}). $\alpha 2\text{A}$ -AR was activated by the agonist clonidine and TRPM8 functionality was assessed by the ability to generate membrane current (I_{TRPM8}) in response to cold, menthol or icilin.

As documented in Fig. 1A, B and C, incubation of HEK-293_{M8- $\alpha 2\text{A}$ -AR} cells with clonidine (10 μM) for 10-20 min resulted in the decrease of I_{TRPM8} density in response to the three major TRPM8-activating stimuli, cold (temperature drop from 33° C to 20° C), icilin (10 μM) and menthol (500 μM), by $70 \pm 7 \%$, $58 \pm 6 \%$ and $52 \pm 7 \%$, respectively, compared to the cells, which were not exposed to clonidine. Since the effect of clonidine appeared to be the same when TRPM8-activating stimuli were applied independently (Fig. 1C) or in a successive way (supplementary data S2 Fig. C), for practical reasons we chose to perfuse cold, icilin and menthol consecutively for the next experiments.

The inhibitory effect of $\alpha 2\text{A}$ -AR stimulation on TRPM8 does not involve the G_q/PLC pathway. Since $\alpha 2$ -adrenoreceptors act via G proteins, we investigated possible regulation of TRPM8 activity by G proteins activators and inhibitors. To do so we used non-hydrolysable GTP analogues, GTP- γ -S, which is a constitutive G protein activator, and GDP- β -S, which is G protein inhibitor. Pre-dialysis of

HEK-293_{M8} cells with the intracellular pipette solution supplemented with GTP- γ -S (100 μ M) attenuated their responsiveness to icilin and menthol: respectively by 72 \pm 5% and 55 \pm 9% (Fig. 2A). On the other hand inclusion in the pipette solution of GDP- β -S (100 μ M) did not impair I_{TRPM8} activation by both icilin and menthol, strongly suggesting the involvement of G proteins in TRPM8 inhibition.

α 2A-ARs are generally known to be coupled to the inhibitory Gi proteins (23) through which they inhibit adenylylate cyclase (AC) activity, although there is evidence on the possibility of α 2A-ARs coupling to the Gq proteins as well (24). In the latter case one can expect stimulation of catalytic activity of phospholipase C (PLC), which hydrolyses phospholipids. Noteworthy, depletion of phosphatidylinositol biphosphate (PIP₂), which is an important TRPM8 regulator and PLC substrate, during PLC stimulation has been shown to induce I_{TRPM8} rundown (25,26). In view of potential coupling of α 2A-ARs to Gq/PLC pathway, we next focused on assessing its involvement in the signal transduction from α 2A-AR to TRPM8. For that we used PLC inhibitor, U73122.

In the first set of experiments we pretreated HEK-293_{M8} cells with U73122 (1 μ M) and then dialyzed them with GTP- γ -S-supplemented (100 μ M) intracellular pipette solution during patch-clamp recording. Cells' dialysis with GTP- γ -S strongly blocked I_{TRPM8} activation by menthol irrespective of whether or not they were pretreated with U73122 (Fig. 2B), indicating that PLC and consequently Gq most likely are not involved in I_{TRPM8} abolition by constitutive G proteins activation with GTP- γ -S. Next, to validate no involvement of Gq/PLC pathway also in clonidine effects, we pretreated HEK-293_{M8}- α 2A-AR cells with the drug (10 μ M) alone or in combination with U73122 (1 μ M). As quantified on Fig. 2C, suppression of PLC by U73122 did not impair the inhibitory action of clonidine on I_{TRPM8} , activated by cold, icilin or menthol, showing that stimulation of α 2A-ARs does not recruit Gq/PLC pathway in signal transduction to TRPM8.

The inhibitory effect of clonidine involves Gi proteins and the adenylylate cyclase pathway.
To determine whether clonidine- and GTP- γ -S-induced inhibition of TRPM8 occurs via Gi proteins we have transfected HEK-293_{M8} cells with one of three forms of Gi α subunit: wild type (Gai2_{wt}), constitutively activated

(Gai2_{Q205L}) or constitutively inactivated (Gai2_{G204A}). Comparison of menthol-evoked I_{TRPM8} densities in these cells at +100 mV has shown that only in the cells transfected with constitutively activated Gai2_{Q205L} the density of I_{TRPM8} dropped to the level comparable to that achieved during intracellular infusion of GTP- γ -S via patch pipette (Fig. 2D). Other forms of Gai2 (i.e., wild-type and inactivated), although produced some decrease of I_{TRPM8} density compared to the control (i.e., cells with no transfection of any of the Gai2-s), this decrease was by far less than the one caused by the transfection of constitutively activated Gai2_{Q205L} (Fig. 2D). The fact that inhibitory effect of GTP- γ -S can be mimicked by constitutively activated form of Gai2 strongly suggests on the involvement of Gi proteins in signal transduction from α 2A-ARs to TRPM8 channel.

To further confirm this conclusion we also conducted experiments with specific Gi inhibitor, pertussis toxin (PTX). As documented in Fig. 2E, overnight pre-incubation of HEK-293_{M8}- α 2A-AR cells with PTX (500 ng/ml) completely abolished the inhibitory effects of clonidine (10 μ M) on I_{TRPM8} irrespective of whether it was activated by cold, icilin or menthol. Taken together both results, with Gai2_{Q205L} transfection and PTX treatment, unequivocally demonstrate that α 2A-ARs exert inhibition of TRPM8 activity via Gi proteins.

Since Gi proteins inhibit the catalytic activity of adenylylate cyclase (AC), which catalyzes cAMP production, the Gi-mediated suppression of TRPM8 can be the consequence of decreased levels of intracellular cAMP and a concomitant reduction in PKA-dependent phosphorylation of TRPM8 channels or accessory protein(s) impairing TRPM8 activity. To test this hypothesis, we used a number of pharmacological agents, which influence AC-cAMP-PKA signaling pathway: AC activator, forskolin, AC inhibitor, 9-(tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine (SQ22536), cell membrane-permeable cAMP analogs, 8 bromo cAMP (8br-cAMP) and dibutyryl cAMP (db-cAMP) as well as phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). The results of the respective experiments are summarized in Fig. 3A. As one can see, 15-minutes-long pretreatments of HEK-293_{M8} cells with forskolin (10 μ M), 8br-cAMP (1 mM) or combination of db-cAMP (1 mM) and IBMX (100 μ M) did not affect menthol-activated I_{TRPM8} , whilst pretreatment with SQ22536 (200 μ M) caused its

decrease by $59 \pm 9\%$. Moreover, despite the fact that the incubation with forskolin per se did not influence the baseline I_{TRPM8} , it totally removed the inhibitory effect of clonidine ($10\ \mu\text{M}$) on cold-, icilin- and menthol- activated currents (Fig. 3B). Antagonistic influence on clonidine effects similar to that of forskolin could also be attained with the β -adrenoreceptor (β -AR) agonist, isoproterenol. Endogenous β -ARs, which are coupled via stimulatory Gs proteins to AC, are known to be present in HEK-293 cells (e.g. (27)). Thus, if forskolin stimulates AC directly then isoproterenol does the same via Gs-coupled β -AR. Figures 3C-E show that pre-application of isoproterenol ($1\ \mu\text{M}$) per se did not influence the baseline level of I_{TRPM8} in HEK-293_{M8- α 2A-AR} cells, but almost completely abrogated inhibitory effects of clonidine.

These results indicate that enhancement of intracellular cAMP levels either by stimulation of AC or by providing exogenous cAMP together with inhibition of its degradation has no consequence on TRPM8 function, whilst decrease of cAMP levels results in TRPM8 inhibition. They also show that enhancement of cAMP above the basal level due to direct or β -AR/Gs protein-mediated stimulation of AC prevents the effectiveness of clonidine. Altogether they are consistent with the general notion that stimulation of α 2A-ARs by clonidine brings about Gi-mediated inhibition of AC and reduction of intracellular cAMP levels below the basal levels, which is the causative reason for the TRPM8 reduced activity.

TRPM8 S9 and T17 PKA phosphorylation sites are critical in the clonidine-induced channel inhibition. Since reduction of intracellular cAMP levels inhibits TRPM8 activity, the next logical step was to determine whether this molecular sequence of events involves the PKA.

In the first set of experiments we assessed this issue by using a pharmacological approach. Figures 4A and 4B show that pretreatment of HEK-293_{M8} cells with each of the two membrane-permeable PKA inhibitors, KT5720 ($1\ \mu\text{M}$) or H-89 ($10\ \mu\text{M}$), reduced dramatically cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} . Moreover, significant inhibition of cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} could be also attained by pretreatment of HEK-293_{M8} cells for two hours with either C6 or C2 ceramide (each at $10\ \mu\text{M}$), which are activators of the serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A), dephosphorylating the PKA phosphorylation

sites (Fig. 4C, D). TRPM8 inhibition following α 2A-ARs stimulation with clonidine is therefore due to a decrease PKA activity.

The latter suggest the presence of PKA phosphorylation sites in the TRPM8 sequence. Indeed five putative PKA phosphorylation sites were predicted in the channel's N-terminal cytosolic tail – Ser9, Thr17, Thr32, Ser121 and Ser367 (Fig. 5A). In order to test the hypothetical sites we proceeded to a substitution of these serines or threonines by alanines (inactive mutants), or by aspartic acids (constitutively active mutants). Subsequently, mutants were screened by an electrophysiological approach using icilin, since icilin is the most specific and potent agonist of TRPM8 (28). Alanine substitution of the T32, S121, and S367 sites had no consequence on TRPM8 sensitivity to icilin whereas mutation of the S9 and T17 sites inhibited the icilin-induced TRPM8 current by $\sim 40\%$ (Fig. 5B). The constitutively active mutants did not present any statistical difference in their activity compared to the native TRPM8 (data not shown). In addition, we tested the sensibility of S9D and T17D to clonidine, since inactivation of these sites elicited less current than the native form of TRPM8. S9D and T17D mutations totally abolished the inhibitory effect of α 2A-ARs stimulation by clonidine on the three main TRPM8 activators (Fig. 5C). Taken together, these results demonstrated that the S9 and T17 PKA phosphorylation sites of TRPM8 are involved in the clonidine-induced inhibition of the channel.

Inhibitory effect of α 2A-AR stimulation on TRPM8 activity in DRG neurons. Following the establishment of the functional coupling between α 2A-AR and TRPM8 in heterologous system we next tested whether α 2A-AR agonist, clonidine, can modulate endogenous TRPM8-mediated membrane current (I_{TRPM8}) in native DRG neurons. These neurons were enzymatically isolated from male rats and subjected to the whole-cell patch-clamp recording at room temperature. Almost all tested DRG neurons of small diameter developed significant membrane current in response to the application of menthol ($100\ \mu\text{M}$). As this current showed pronounced outward rectification, close to 0 mV reversal potential and rapidly diminished upon menthol withdrawal – properties similar to those reported for the activation of endogenous and heterologously expressed TRPM8 (5,9) – it was identified as I_{TRPM8} . In all experiments on DRG neurons I_{TRPM8} was isolated by subtracting

baseline current before application of menthol from the net current in the presence of menthol (see Fig. 6A).

Exposure of the DRG neurons that showed menthol-activated I_{TRPM8} to clonidine (30 μ M) caused decrease of the current amplitude (measured at +100 mV) only in about 20 % of the neurons tested (in 5 out of 23). In those neurons average reduction of I_{TRPM8} in response to clonidine reached 48 ± 12 % (at + 100 mV, $n = 5$, Fig. 6A-C). We have noted that neurons, which responded to clonidine by I_{TRPM8} inhibition, were characterized by significantly lower baseline density of I_{TRPM8} (176 ± 32 pA/pF, $n = 5$) compared to the unresponsive neurons (429 ± 83 pA/pF, $n = 18$), suggesting that apparently only the subpopulation of DRG neurons with low density I_{TRPM8} coexpress TRPM8 and α 2A-AR. Overnight treatment of the neurons with PTX completely abolished the effect of clonidine (data not shown, $n = 20$). The result with PTX indicates that consistent with the findings in heterologous expression system (i.e., HEK-293_{M8- α 2A-AR} cells) in native DRG neurons, which show clonidine effect, functional coupling between α 2A-ARs and TRPM8 is realized with the involvement of Gi proteins.

It is worthy to note that menthol is also an agonist of TRPA1 channel expressed in small DRG neurons (29,30). However, there are several characteristic features of mode of menthol action on TRPA1 that could be used to discriminate between TRPM8- and TRPA1-mediated menthol responses in sensory neurons. After washout of menthol TRPA1 currents decay slowly ($\tau > 20$ s) in contrast to the virtually immediate reversal of the effect of menthol on TRPM8 ($\tau < 2$ s) (29). In all menthol-responsive neurons demonstrating in this study menthol washout caused virtually immediate decrease in the current amplitude (Fig. 6B) suggesting that menthol sensitivity of these neurons was mediated by TRPM8 expression. Further, after washout of menthol (concentrations > 30 μ M) TRPA1 currents exhibit a characteristic transient increase in amplitude. In our study we've never observed such increases in the current amplitudes after washout of menthol.

DISCUSSION

In this study we identify a novel signaling pathway for physiological regulation of the cold/menthol receptor, TRPM8. Our work demonstrates, for the first time, that the activity

of TRPM8 channel can be inhibited through the decreased phosphorylation of the channel itself by cAMP-dependent PKA. Since the extent of PKA-dependent phosphorylation of target proteins is controlled through the number of plasma membrane GPCRs coupled via inhibitory Gi protein to the AC inhibition, this discovery opens up the possibility for alleviating TRPM8-mediated cold hypersensitivity under conditions of its overexpression. In particular, we establish functional link between α 2A-ARs and TRPM8 in sensory neurons utilizing Gi/AC/cAMP/PKA pathway, which may underlie known analgesic significance of these receptors in nerve injury and in the thermoregulation.

Our experiments on freshly isolated sensory DRG neurons from male rats have shown pronounced inhibition of menthol-stimulated TRPM8 activity by α 2A-ARs agonist, clonidine. We have detected clonidine effects on TRPM8-mediated membrane current in ~ 20 % of menthol-sensitive neurons, which in view of generally small subpopulation of menthol-sensitive neurons (~ 10 %, (31)) and low reported expression of α 2A-AR in DRGs (32) can be explained by even smaller proportion of DRG neurons coexpressing both, TRPM8 and α 2A-AR.

Although the α 2A-ARs mostly signal via Gi/AC cascade (23), there is also evidence that they may recruit Gq/PLC pathway as well (24). In the event of α 2A-AR-mediated TRPM8 inhibition, the involvement of Gq/PLC pathway would be most anticipated, as the substrate of PLC activity, PIP₂, is a well-known TRPM8 modulating agent whose depletion during PLC activation causes I_{TRPM8} rundown (25,26). However, our experiments with PLC inhibitor, U73122, did not support the hypothesis on Gq/PLC involvement, as this agent failed to impair in any essential way the inhibitory effects of clonidine on TRPM8 heterologously coexpressed with α 2A subtype of α 2-AR in HEK-293 cells. At the same time, using molecular and pharmacological tools and a mutagenesis strategy affecting different stages of Gi/AC/cAMP/PKA pathway (i.e., constitutively active and inactive forms of G α i, Gi/Go proteins inhibitor, PTX, AC activator, forskolin, AC inhibitor, SQ22536, membrane-permeable cAMP analog, db-cAMP, phosphodiesterase inhibitor, IBMX, PKA inhibitors, KT5720 and H-89, phosphatase 2A activators, ceramide C6 and C2, phospho-null and phospho-mimicked mutants) strongly interfered with the action of clonidine

on TRPM8, consistent with the notion that $\alpha 2A$ -AR regulates TRPM8 via the decrease of cAMP/PKA-dependent phosphorylation. This inhibitory pathway is summarized in the cartoon of figure 7. Interestingly, either forskolin, isoproterenol or combination of db-cAMP/IBMX – the interventions which stimulate cAMP-dependent phosphorylation – did not affect the baseline menthol-activated I_{TRPM8} , suggesting that the basal level of TRPM8 phosphorylation is sufficient to maintain fully functional state of the channel. To the contrary, all interventions, which led to the decreased phosphorylation via Gi/AC/cAMP/PKA cascade, mimicked the effects of clonidine through the receptor. This indicates that physiological meaning of such regulation may consist in counteracting enhanced expression of TRPM8 that may be associated with some pathological states.

Indeed, our study suggests that TRPM8 current reduction via $\alpha 2A$ -AR could have an impact in nociception, notably in cold allodynia during chronic constriction injury of sensory nerves (CCI) – condition characterized by the increased expression of TRPM8 in the subpopulation of nociceptive DRG neurons leading to the gain of a painful cold sensitivity (14). Interestingly, under the CCI conditions, the expression of $\alpha 2A$ -AR in DRG neurons increases as well (16). We therefore propose that overexpression and stimulation of $\alpha 2A$ adrenergic receptors in sensory neurons may

represent protective measure, leading to an attenuation of the painful symptoms of allodynia, such as the hypersensitivity to cold temperatures, via the inhibition of TRPM8 channels activity.

TRPM8 regulation via Gi/AC/cAMP/PKA pathway discovered herein may have significance far beyond the $\alpha 2A$ -AR and TRPM8 mediated sensory transduction and antinociception, as TRPM8 is known to be present in a number of tissues outside the peripheral nervous system including common types of human cancers (e.g. (6)), in which it can be coexpressed with other GPCRs coupled to the same signaling pathway. Moreover, if for any reason cAMP/PKA-dependent phosphorylation is compromised and TRPM8 function is reduced, one can expect that its functionality can be restored via Gs-coupled GPCRs or other influences that stimulate AC activity. Interestingly, just recently it has been shown that lowering of endoplasmic reticulum (ER) Ca^{2+} stores content, independently of the cytosolic Ca^{2+} , leads to the recruitment of AC, accumulation of cAMP and PKA activation – the process dubbed store-operated cAMP signaling or SOcAMPS (33). This opens up additional to Ca^{2+} -independent phospholipase A2 (iPLA2)/lysophospholipids (LPLs) (34) mechanism for up-regulation of TRPM8 by store-mobilizing factors.

REFERENCES

1. Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007) *Annu Rev Biochem* **76**, 387-417
2. Clapham, D. E. (2003) *Nature* **426**, 517-524
3. Cortright, D. N., Krause, J. E., and Broom, D. C. (2007) *Biochim Biophys Acta* **1772**, 978-988
4. Wang, H., and Woolf, C. J. (2005) *Neuron* **46**, 9-12
5. McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., and Julius, D. (2002) *Nature* **416**, 52-58
6. Voets, T., Owsianik, G., and Nilius, B. (2007) *Handb Exp Pharmacol*, 329-344
7. Brauchi, S., Orio, P., and Latorre, R. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15494-15499
8. Voets, T., Droogmans, G., Wissenbach, U., Janssens, A., Flockerzi, V., and Nilius, B. (2004) *Nature* **430**, 748-754
9. Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., and Patapoutian, A. (2002) *Cell* **108**, 705-715
10. Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E., and Julius, D. (2007) *Nature* **448**, 204-208
11. Colburn, R. W., Lubin, M. L., Stone, D. J., Jr., Wang, Y., Lawrence, D., D'Andrea, M. R., Brandt, M. R., Liu, Y., Flores, C. M., and Qin, N. (2007) *Neuron* **54**, 379-386
12. Dhaka, A., Murray, A. N., Mathur, J., Earley, T. J., Petrus, M. J., and Patapoutian, A. (2007) *Neuron* **54**, 371-378
13. Chung, M. K., and Caterina, M. J. (2007) *Neuron* **54**, 345-347
14. Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W., and Gu, J. G. (2007) *J Neurosci* **27**, 13680-13690

15. Proudfoot, C. J., Garry, E. M., Cottrell, D. F., Rosie, R., Anderson, H., Robertson, D. C., Fleetwood-Walker, S. M., and Mitchell, R. (2006) *Curr Biol* **16**, 1591-1605
16. Birder, L. A., and Perl, E. R. (1999) *J Physiol* **515 (Pt 2)**, 533-542
17. Hocker, J., Paris, A., Scholz, J., Tonner, P. H., Nielsen, M., and Bein, B. (2008) *Anesthesiology* **109**, 95-100
18. Duflo, F., Li, X., Bantel, C., Pancaro, C., Vincler, M., and Eisenach, J. C. (2002) *Anesthesiology* **97**, 636-641
19. Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2005) *J Biol Chem* **280**, 39423-39435
20. Beck, B., Bidaux, G., Bavencoffe, A., Lemonnier, L., Thebault, S., Shuba, Y., Barrit, G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007) *Cell Calcium* **41**, 285-294
21. Pinchenko, V. O., Kostyuk, P. G., and Kostyuk, E. P. (2005) *Biochim Biophys Acta* **1724**, 1-7
22. Neuberger, G., Schneider, G., and Eisenhaber, F. (2007) *Biol Direct* **2**, 1
23. Ramos, B. P., Stark, D., Verduzco, L., van Dyck, C. H., and Arnsten, A. F. (2006) *Learn Mem* **13**, 770-776
24. Conklin, B. R., Chabre, O., Wong, Y. H., Federman, A. D., and Bourne, H. R. (1992) *J Biol Chem* **267**, 31-34
25. Liu, B., and Qin, F. (2005) *J Neurosci* **25**, 1674-1681
26. Rohacs, T., Lopes, C. M., Michailidis, I., and Logothetis, D. E. (2005) *Nat Neurosci* **8**, 626-634
27. Takezawa, R., Schmitz, C., Demeuse, P., Scharenberg, A. M., Penner, R., and Fleig, A. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6009-6014
28. Chuang, H. H., Neuhausser, W. M., and Julius, D. (2004) *Neuron* **43**, 859-869
29. Karashima, Y., Damann, N., Prenen, J., Talavera, K., Segal, A., Voets, T., and Nilius, B. (2007) *J Neurosci* **27**, 9874-9884
30. Xiao, B., Dubin, A. E., Bursulaya, B., Viswanath, V., Jegla, T. J., and Patapoutian, A. (2008) *J Neurosci* **28**, 9640-9651
31. Madrid, R., Donovan-Rodriguez, T., Meseguer, V., Acosta, M. C., Belmonte, C., and Viana, F. (2006) *J Neurosci* **26**, 12512-12525
32. Cho, H. J., Kim, D. S., Lee, N. H., Kim, J. K., Lee, K. M., Han, K. S., Kang, Y. N., and Kim, K. J. (1997) *Neuroreport* **8**, 3119-3122
33. Lefkimiatis, K., Srikanthan, M., Maiellaro, I., Moyer, M. P., Curci, S., and Hofer, A. M. (2009) *Nat Cell Biol* **11**, 433-442
34. Vanden Abeele, F., Zholos, A., Bidaux, G., Shuba, Y., Thebault, S., Beck, B., Flourakis, M., Panchin, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006) *J Biol Chem* **281**, 40174-40182

FOOTNOTES

We are grateful to Dr. S. Hermouet for the Gi constructs, Prof. Lutz Hein and Prof. Stephen Lanier for $\alpha 2A$ -AR constructs. This work was supported by grants from INSERM, la Ligue nationale contre le cancer, le Ministère de l'éducation nationale, la Région Nord/Pas-de-Calais and INTAS 05-1000008-8223. Dr. Gkika was supported by a post-doctoral fellowship from the Institut National du Cancer (INCa).

The abbreviation used are: $\alpha 2A$ -AR, $\alpha 2A$ -adrenoreceptor(s); AC, adenylate cyclase; PKA, protein kinase A, ISO, isoproterenol; TRP, Transient Receptor Potential, TRPM8, TRP melastatin 8; DRG, dorsal root ganglion; I_{TRPM8} , current through TRPM8 channel ; HEK-293_{M8}, Human embryonic kidney 293 cells stably transfected with human TRPM8 ; HEK-293_{M8- $\alpha 2A$ -AR}, HEK-293 cells transiently transfected with $\alpha 2A$ -AR construct.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Co-expression of $\alpha 2A$ -adrenoreceptors ($\alpha 2A$ -AR) with TRPM8 channels in HEK-293 cells induces inhibition of TRPM8-carried current (I_{TRPM8}) by $\alpha 2A$ -adrenergic agonist, clonidine. *A.* Representative time-courses of I_{TRPM8} (measured as current density at +100 mV) in response to TRPM8-activating stimuli (shown by horizontal bars): temperature drop from 33° C to 20° C (cold), icilin (10 μ M) and menthol (500 μ M) in HEK-293_{M8} cells transiently transfected with $\alpha 2A$ subtype of $\alpha 2$ -adrenoreceptor (HEK-293_{M8- $\alpha 2A$ -AR}) under control conditions (black circles) or following treatment with clonidine (10 μ M, open circles). *B.* I-V plot of figure 1A. *C.* Quantification of the inhibitory effect of clonidine on cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293_{M8- $\alpha 2A$ -AR} cells (mean \pm s.e.m., $n = 5-10$ for each cell type and condition). Each TRPM8-activating stimulus was applied independently of each other; (**) and (***) denote statistically significant differences with $P < 0.02$ and $P < 0.01$, respectively.

Fig. 2. Functional link between $\alpha 2A$ -AR and TRPM8 involves Gi proteins, but not Gq proteins and phospholipase C (PLC). *A.* Quantification of the effects of HEK-293_{M8} cells' dialysis with constitutive G proteins activator, GTP- γ -S (100 μ M, white columns) and inhibitor, GDP- β -S (100 μ M, grey columns), on icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} (mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each cell type and condition). *B.* Average ramp-derived I-V relationships of menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293_{M8} cells dialyzed with GTP- γ -S-free (black triangles) and GTP- γ -S-containing pipette solution with (black circles) and without (open circles) cells' pretreatment with PLC inhibitor, U73122 (1 μ M); the inset shows quantification of I_{TRPM8} densities at + 100 mV under respective conditions (mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each condition). *C.* Quantification of the inhibitory effect of clonidine on the density of cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293_{M8- $\alpha 2A$ -AR} cells pretreated (grey columns) and not pretreated (open columns) with U73122 (mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each condition). *D.* Quantification of the effects of HEK-293_{M8} cells' transient transfection with the wild type (WT, light grey column), constitutively activated (Q205L, open column) or constitutively inactivated (G204A, grey column) forms of Gi α subunit on menthol-activated I_{TRPM8} densities; black column represents HEK-293_{M8} blank plasmid-transfected control (mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each cell type). *E.* Quantification of the effects of clonidine on the density of cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293_{M8- $\alpha 2A$ -AR} cells pretreated (grey columns) and not pretreated (open columns) with Gi inhibitor, PTX (500 ng/ml, mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each condition). On all graphs (*) and (**) denote statistically significant differences to control or between connected values with $P < 0.05$ and $P < 0.02$, respectively.

Fig. 3. $\alpha 2A$ -AR and TRPM8 are linked via adenylate cyclase (AC) and cAMP pathway. *A.* Quantification of the effects of HEK-293_{M8} cells pretreatment with AC inhibitor, SQ22536 (200 μ M, open column), AC activator, forskolin (10 μ M, light grey column), cell membrane-permeable cAMP analog, 8br-cAMP (1 mM, grey column) or combination of db-cAMP (1 mM) and phosphodiesterase inhibitor, IBMX (100 μ M, dark grey column) on menthol-activated I_{TRPM8} (mean \pm s.e.m., $n = 6-22$ for each condition). *B.* Quantification of the inhibitory effect of clonidine on the density of cold-, icilin-

and menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293_{M8- α 2A-AR} cells pretreated (grey columns) and not pretreated (open columns) with forskolin (mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each condition). *C.* Averaged time-courses of I_{TRPM8} (measured as current density at +100 mV) in response to TRPM8-activating stimuli (shown by horizontal bars) in the control HEK-293_{M8} cells (black circles) and HEK-293_{M8} cells pretreated with β -adrenoreceptor agonist, isoproterenol (1 μ M, open circles) (mean \pm s.e.m., $n = 6$ for each condition). *D.* Same as in panel *C*, but for HEK-293_{M8- α 2A-AR} cells under control conditions (black circles) and following treatment with clonidine (open circles) and clonidine plus isoproterenol (black triangles) (mean \pm s.e.m., $n = 6$ for each condition). *E.* Quantification of the effects of clonidine alone (open columns) and in combination with isoproterenol (grey columns) on the density of cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} (at +100 mV) in HEK-293_{M8- α 2A-AR} (mean \pm s.e.m., $n = 6-10$ for each condition). On all graphs (*) and (**) denote statistically significant differences to control with $P < 0.05$ and $P < 0.02$, respectively.

Fig. 4. Functional link between α 2A-AR and TRPM8 is mediated via PKA-dependent phosphorylation. *A & B.* Quantification of the effects of HEK-293_{M8} cells pretreatment with PKA inhibitors, KT5720 (1 μ M, panel *A*) or H-89 (10 μ M, panel *B*), on the density of cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293_{M8} cells (mean \pm s.e.m., $n = 5-8$ for each condition). *C & D.* Same as in panels *A & B*, but for the activators of the serine/threonine protein phosphatase 2A, C2 (10 μ M, panel *C*) and C6 (10 μ M, panel *D*) ceramide (mean \pm s.e.m., $n = 8$ for each condition). On all graphs (*), (**) and (***) denote statistically significant differences to control with $P < 0.05$, $P < 0.02$ and $P < 0.01$, respectively.

Fig. 5. Effects of the mutation of TRPM8 PKA phosphorylation sites on the channel activity. *A.* Schematic representation of TRPM8 protein sequence and its putative PKA phosphorylation sites. *B.* Histogram summarizing icilin activated I_{TRPM8} (measured as current density at +100 mV) in HEK-293 cells transfected with TRPM8 (TRPM8) or the mutants S9A, T17A, T32A, S121A and S367A (mean \pm s.e.m., $n = 10-15$ for each condition). *C.* Histogram summarizing densities of cold-, icilin- and menthol-activated I_{TRPM8} in HEK-293 cells transfected with TRPM8 (TRPM8) or mutants S9D and T17D in presence or absence of clonidine (mean \pm s.e.m., $n = 5-8$ for each condition). On all graphs (*) and (**) denote statistically significant differences to control with $P < 0.05$ and $P < 0.02$, respectively.

Fig. 6. Functional link between α 2A-AR and TRPM8 in native rat DRG neurons. *A.* Representative tracings of the baseline current in DRG neurons, and currents in the presence of menthol (100 μ M) before and after exposure to clonidine (30 μ M) at room temperature. *B.* Averaged time-courses of menthol-activated I_{TRPM8} and effect on it of clonidine in 5 clonidine-responsive neurons; current was measured at +100 mV and normalized to the maximal value for each neuron (mean \pm s.e.m., $n = 5$). *C.* Averaged I-V relationships of menthol-activated I_{TRPM8} before (black circles) and after (open circles) exposure to clonidine (mean \pm s.e.m., $n = 5$); inset shows quantification of the effects of clonidine on the density of menthol-activated I_{TRPM8} at +100 mV, (*) denotes statistically significant differences with $P < 0.05$.

Fig. 7. Schematic depiction of TRPM8 regulation by α 2A- and β -adrenoreceptors. α 2A-ARs stimulation by clonidine initiates a sequence of intracellular events as follow: Gai protein activation following clonidine fixation on α 2A-AR leads to adenylate cyclase (AC) inhibition and decrease of cAMP production. By consequent, PKA transition from an inactive (i-PKA) to an active (PKA) form is reduced. In parallel, the intracellular serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) dephosphorylates TRPM8 S9 and T17 inhibiting the channel activity. This inhibitory pathway can be abolished by stimulation of β -AR with isoproterenol, since it would lead to a stimulation of Gas protein coupled to this receptor and to an up regulation of the adenylate cyclase activity. The subsequent increase in cAMP concentration would potentiate PKA phosphorylation which will fully maintain the functional activity of TRPM8.

Table 1. Primers used for the *in vitro* mutagenesis of TRPM8

Mutant	Mutagenesis primer 5'-3'
S9A	CGGGCAGCCAGGCTC GC CATGAGGAACAGAAGG
S9D	CGGGCAGCCAGGCTC GAC CATGAGGAACAGAAGG
T17A	GAAGGAATGAC G CTCTGGACAG
T17D	GGAACAGAAGGAATGAC GAT CTGGACAGCACCCGG
T32A	CGCGTCTCGGAGC GC CAGACTTGTCTTACAG
T32D	GCGCGTCTCGGAGC GAC GACTTGTCTTACAGTG
S121A	AGTATATACGTCTG GC CCTGCGACACGGACGCGG
S121D	GTATATACGTCTG GACT GCGACACGGACGCGG
S367A	CCCGCACGGT G CCCGGCTGCCTGAGG
S367D	CCCGCACGGT GAC CCGGCTGCCTGAGG

Characters in bold represent the nucleotides that were mutated.

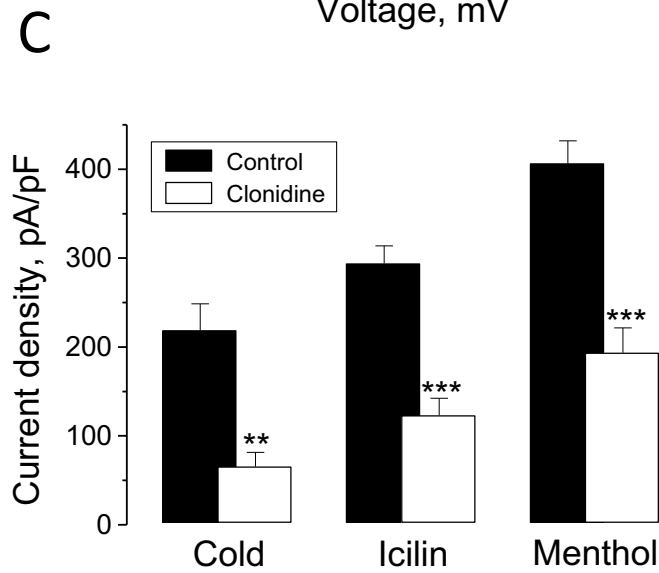
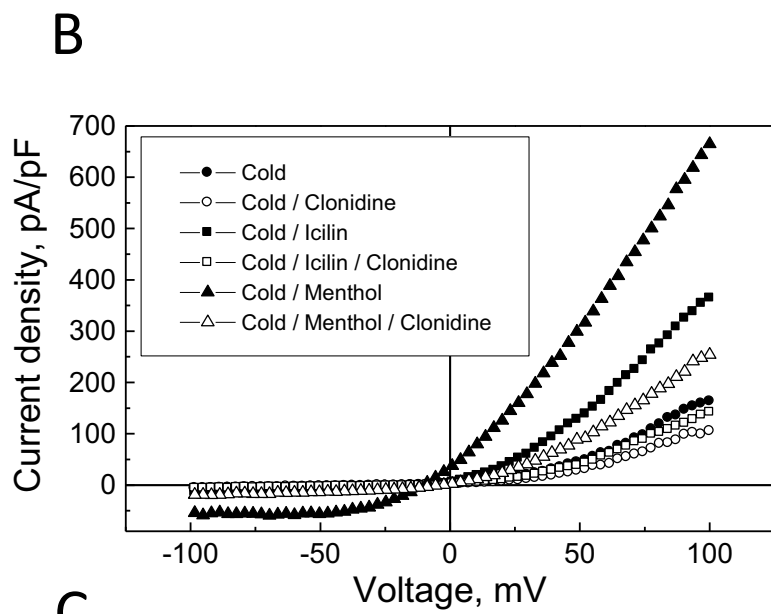
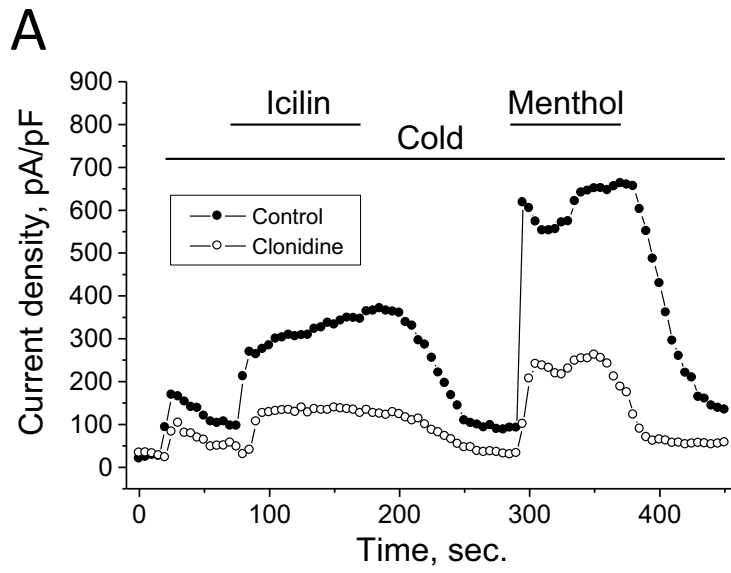


Figure 1

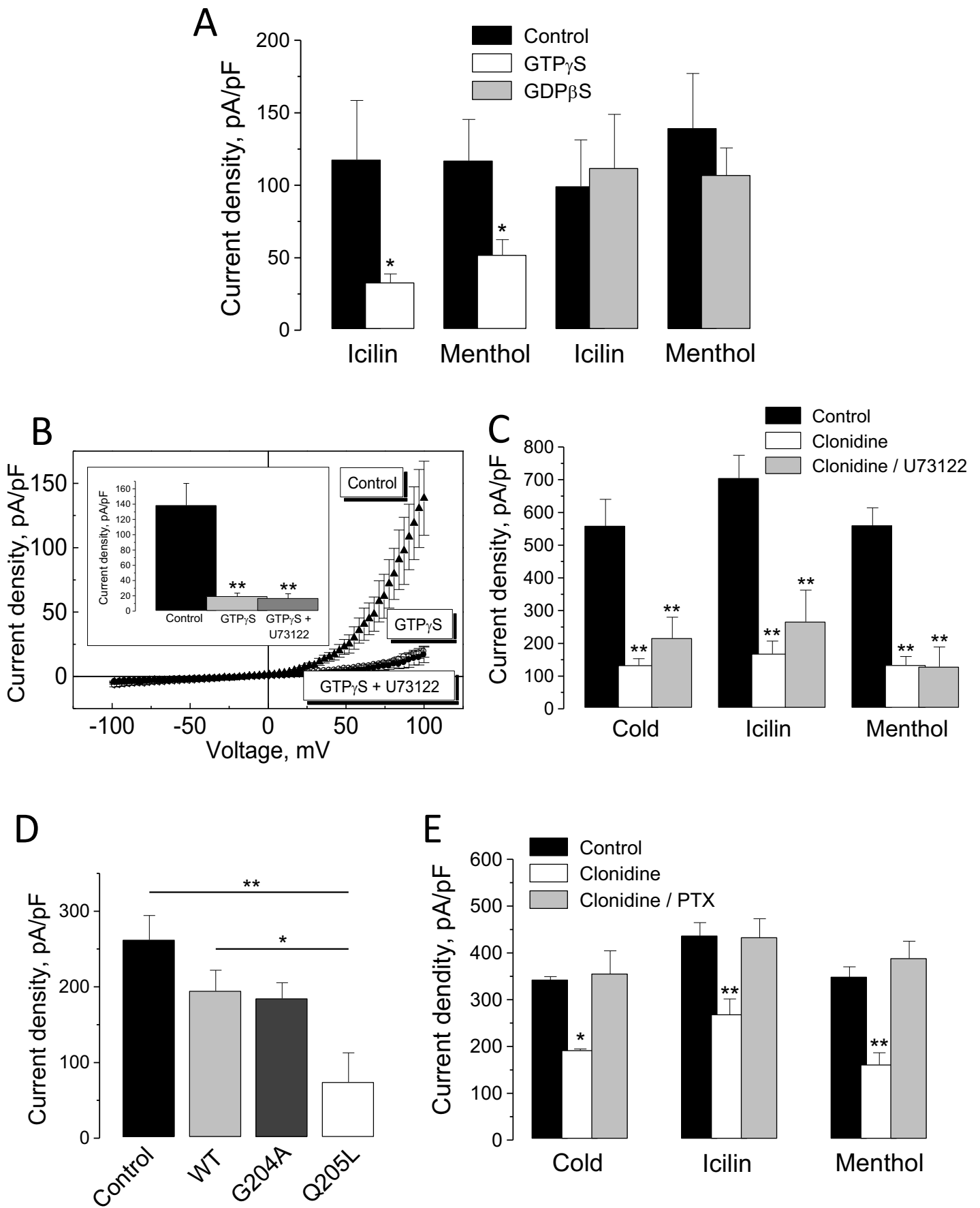


Figure 2

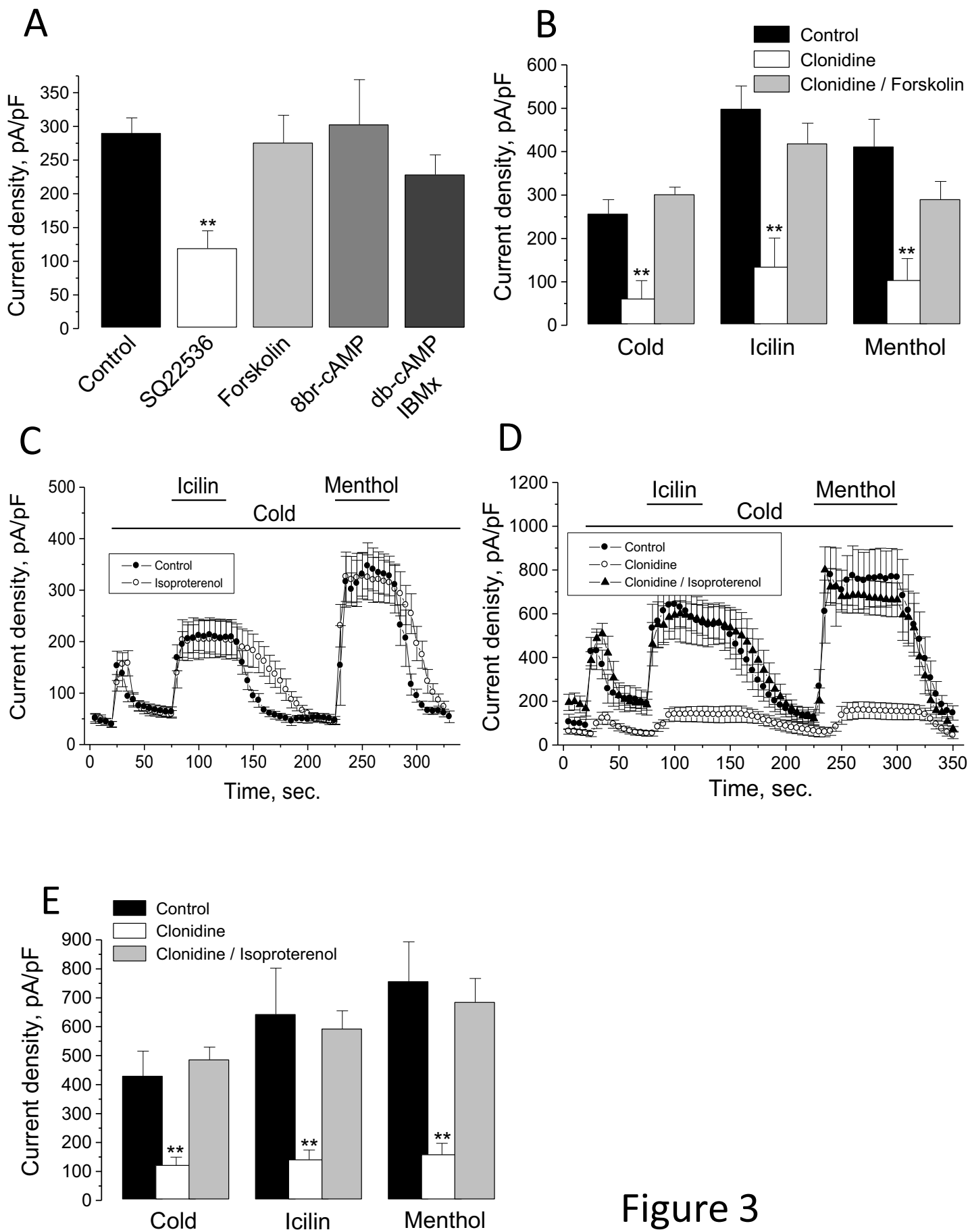


Figure 3

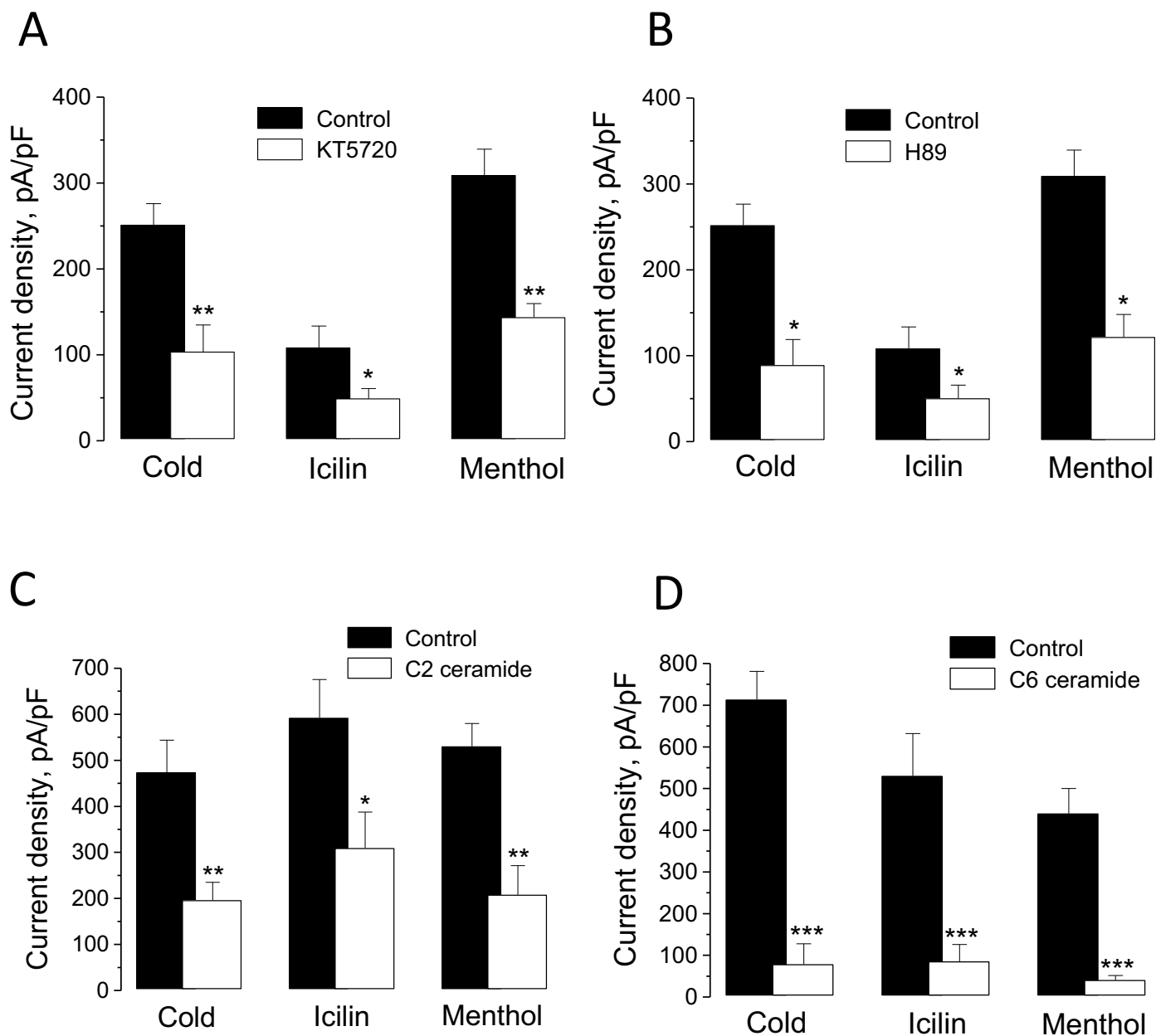


Figure 4

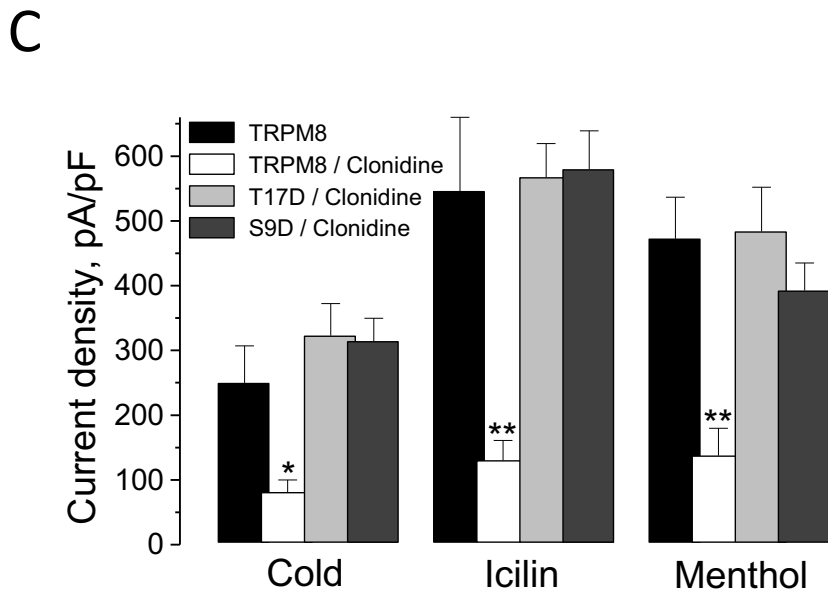
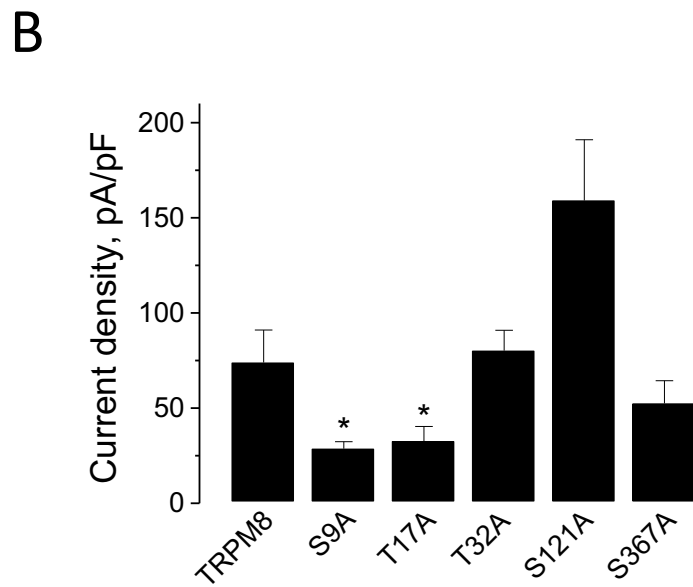
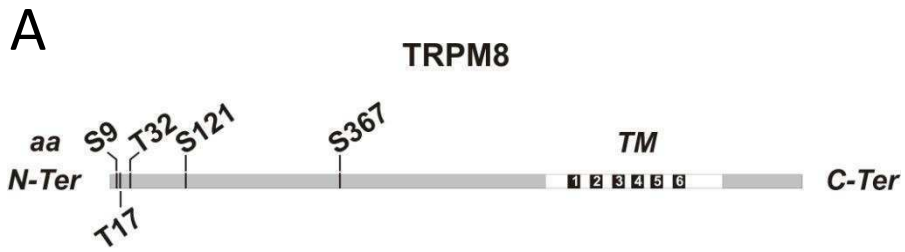


Figure 5

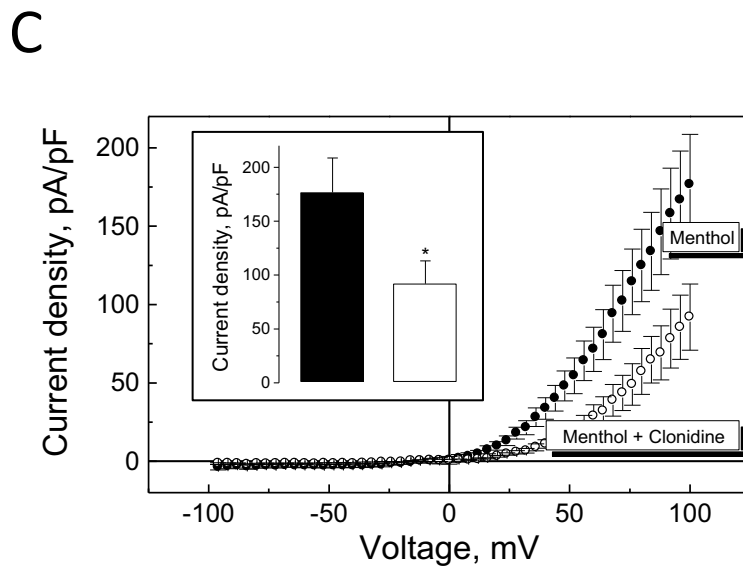
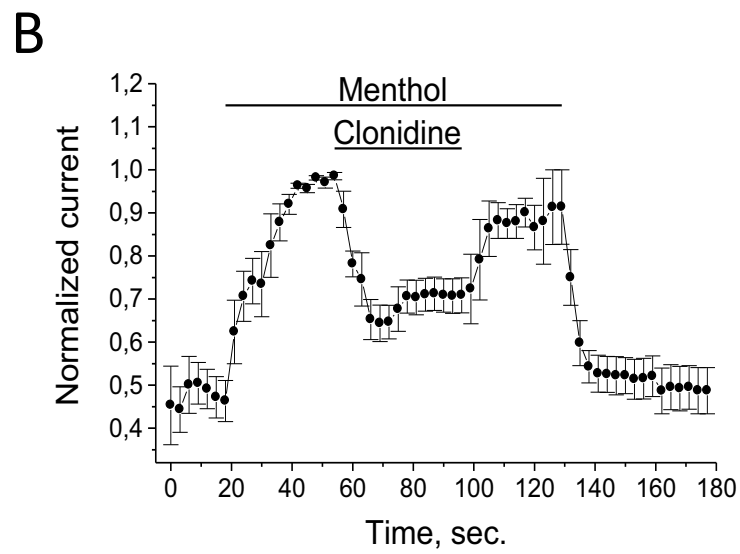
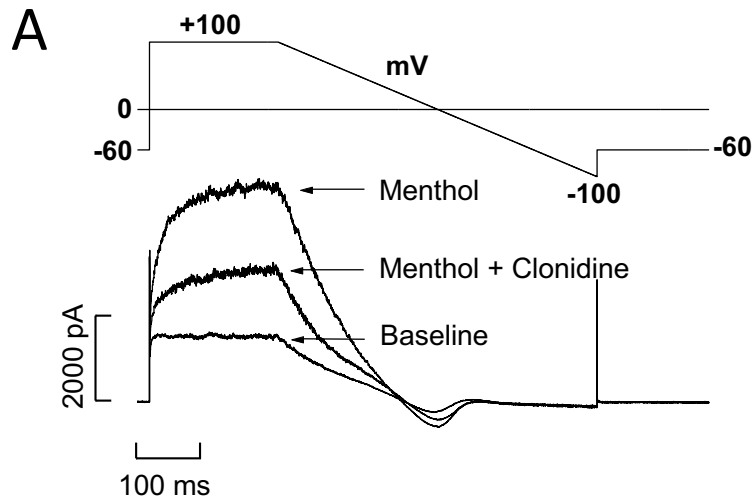


Figure 6

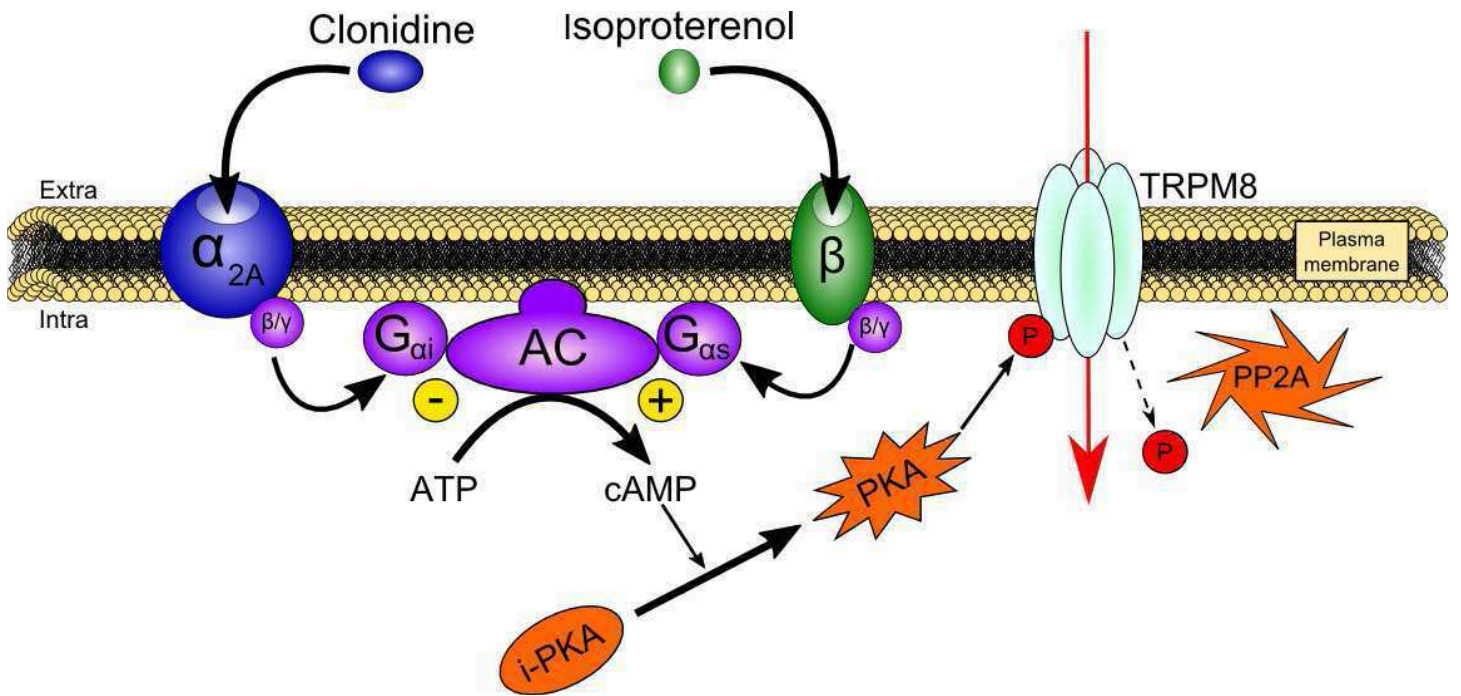


Figure 7

Supplementary data

Material and Methods

RT-PCR – Total mRNA was isolated from cells as described (1). DNA amplification conditions included an initial denaturation step of 7 min at 95° C, and 36 cycles of 30 sec at 95° C, 30 sec at 60° C, 30 sec at 72° C, and finally 7 min at 72° C. Primers used are listed in the Table 2.

Table 2. Primers used in RT-PCR

Gene	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'
Human α 2A-AR	AACGAGGTCATGGGCTACTG	CTGGTAGATGCGCACGTAGA
Rat TRPM8	AGTACCACATATGACTTCTCCCAC	ACAAGGTAATTCTCCTTCATGACG
Human HPRT	GGCGTCGTGATTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
Rat α 2A-AR	ATTTTCAACCACGACTTCCG	TGTCCCTCTCAGCCAGAACT
Rat HPRT	TAAGTTCTTTGCTGACCTGCTG	CCCGTTGACTGGTCATTACA

Biotinylation assay and immunoblotting – HEK-293_{M8} cells were subjected to cell surface biotinylation as described in (2). Next, cells were precipitated after lysis with neutravidin-agarose beads (Pierce Rockford, IL, USA). Immunoblot analysis was performed for TRPM8 expression in the plasma membrane fraction (TRPM8_{PM}) and in the total cell lysates (TRPM8_{TL}). As negative control, non-induced (NI) HEK-293_{M8} or non-transfected HEK-293 (NT) cells were used.

For the immunoblot analysis we have used the anti-TRPM8 antibody (1/2000, Abcam), Anti- α 2A adrenergic receptor (1:250, sc-28983, Santa Cruz Biotechnology) and Anti-calnexin (1:1000, MAB3126, Milipore).

Legend

Supplementary data figure S1. *A.* RT-PCR analysis of the α 2A-ARs (h α 2A-AR) expression in HEK-293_{M8} cells. Human form of Hypoxanthine-Guanine-Phospho-Ribosyl- Transferase (h HPRT) is used as control. *B.* Immunoblotting showing co-detection of human forms of α 2A-ARs (h α 2A-AR) and TRPM8 (h TRPM8) in HEK-293_{M8} cells transfected with α 2A-AR plasmid. The human form of calnexin (h calnexin) is used as expression control. *C.* RT-PCR analysis of TRPM8 and α 2A-ARs expression in cultured rat DRG neurons. *D.* Biotinylation assay showing plasma membrane expression of TRPM8 channels (TRPM8_{PM}) in HEK-293_{M8} cells non induced by tetracycline (NI) or induced (TRPM8), in presence or not (CTRL) of PKA inhibitors H9 and KT5720. *E.* Biotinylation assay showing plasma membrane expression of TRPM8 channels (TRPM8_{PM}) in HEK-293 cells transfected with TRPM8 (TRPM8) or mutants S9A and T17A. Non-transfected HEK-293 (NT) cells were used as negative control. Expression of TRPM8 in total cell lysates (TRPM8_{TL}) is shown below the TRPM8_{PM} blot for both D and E panels.

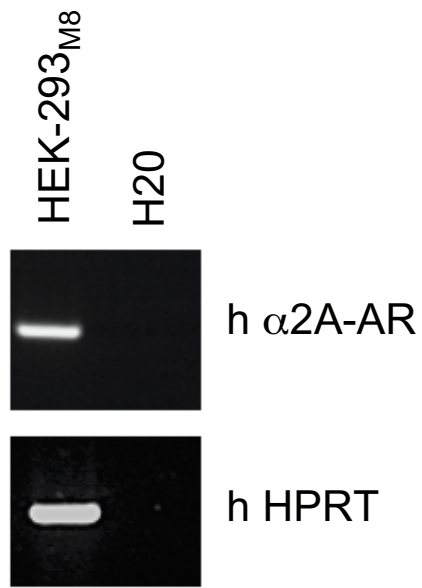
Supplementary data figure S2. *A.* Averaged I-V relationships of menthol (triangles) and cold (circles)-activated I_{TRPM8} before (black) and after (open) exposure to a short pretreatment of clonidine (1-3 minutes, mean \pm s.e.m., n = 8). *B.* quantification of the effects of a short incubation of clonidine on the density of menthol and cold-activated I_{TRPM8} at + 100 mV (mean \pm s.e.m., n = 8 for each condition). *C.* Quantification of the inhibitory effect of clonidine in HEK-293_{M8- α 2A-AR} cells with TRPM8-activating stimuli perfused successively (mean \pm s.e.m., n = 5-10 for each condition); (*), (**) and (***) denote statistically significant differences with P<0.05, P<0.02 and P<0.01, respectively.

References

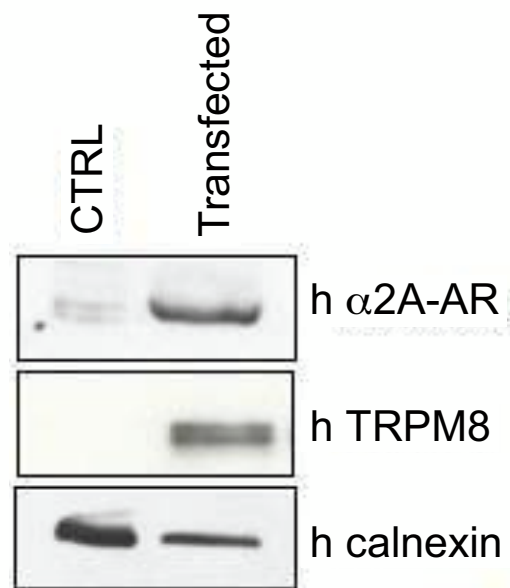
1. Thebault, S., Lemonnier, L., Bidaux, G., Flourakis, M., Bavencoffe, A., Gordienko, D., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Panchin, Y., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2005) *J Biol Chem* 280(47), 39423-39435
2. Gkika, D., Topala, C. N., Chang, Q., Picard, N., Thebault, S., Houillier, P., Hoenderop, J. G., and Bindels, R. J. (2006) *Embo J* 25(20), 4707-4716

Supplementary data S1

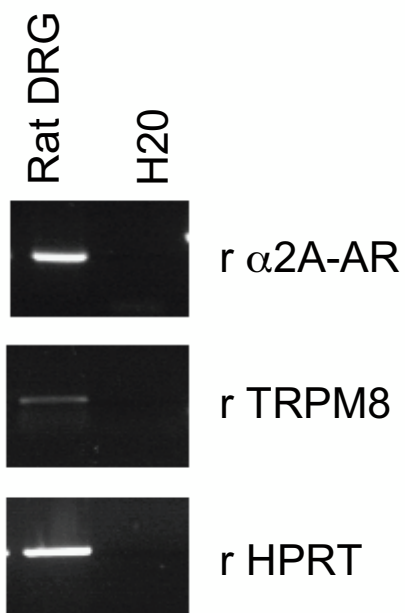
A



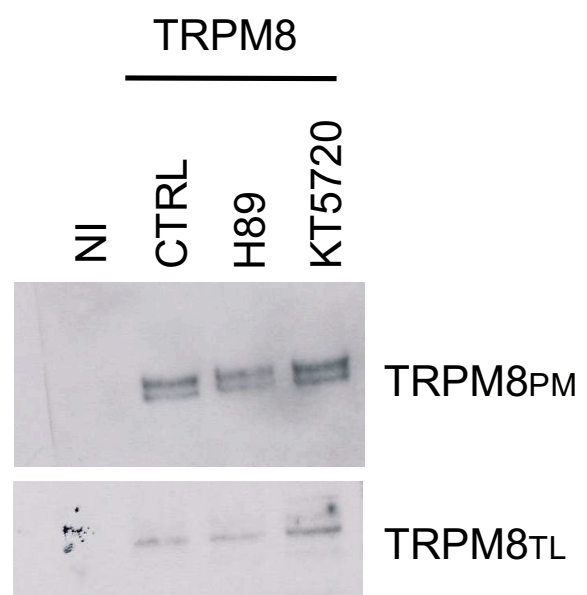
B



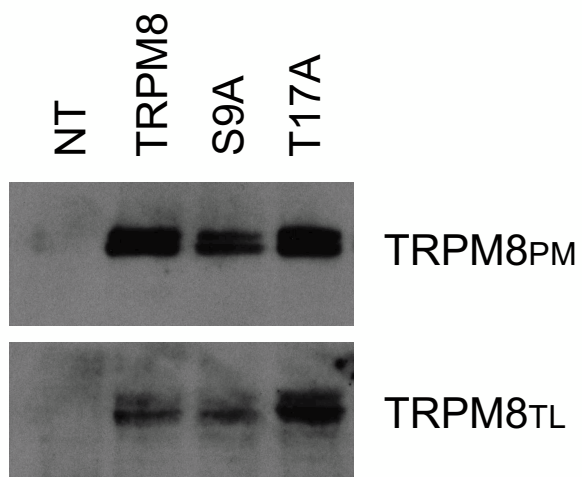
C



D

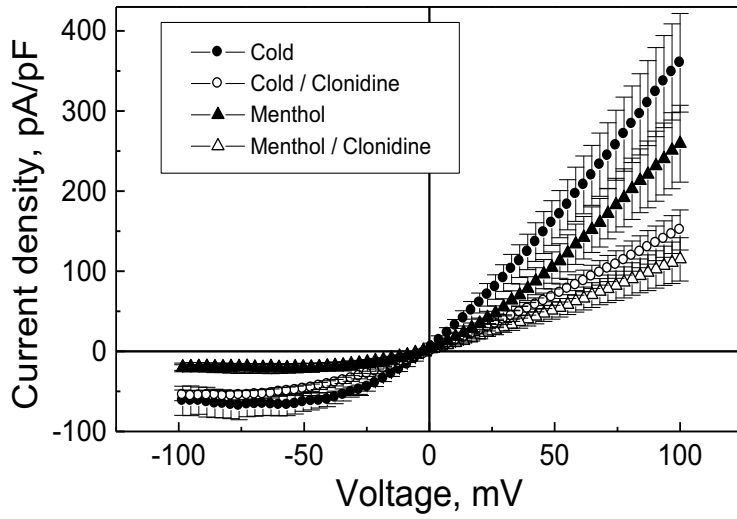


E

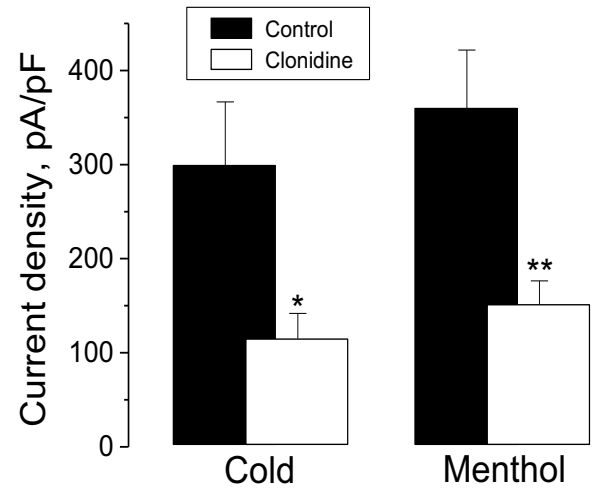


Supplementary data S2

A



B



C

