

UNIVERSITE DE LILLE 1

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

Année 2011

N° d'ordre : 40690

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Discipline : Biologie-Santé

Rôles du calcium et des canaux TRP dans la croissance, la migration et la réponse au stress réticulaire des cellules cancéreuses prostatiques et urothéliales

dirigée par le Pr. Natalia PREVARSKAYA

présentée et soutenue publiquement par

Agathe OULIDI

le 1^{er} Décembre 2011

devant le jury composé de :

Présidente : **Pr. X. Le Bourhis**, Université de Lille 1

Rapporteurs : **Pr. H. Ouadid-Ahidouch**, Université de Picardie
Dr. L. Bresson-Bepoldin, INSERM U916

Examineurs : **Pr. F. Van Coppenolle**, Université de Lyon 1
Pr. B. Mauroy, Université Catholique de Lille
Pr. N. Prevarskaya, Université de Lille 1
Dr. V. Lehen'kyi, Université de Lille 1

**Thèse réalisée au sein du laboratoire INSERM U1003
Villeneuve d'Ascq-Lille**

Résumé

Les cellules cancéreuses acquièrent au cours de la cancérogenèse certaines caractéristiques tels qu'une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une résistance à l'apoptose et au stress réticulaire, l'acquisition d'un pouvoir invasif. De nombreux travaux montrent l'implication du calcium (Ca^{2+}) dans ces différentes caractéristiques et en particulier la dérégulation de la prolifération, de l'apoptose, de la réponse au stress réticulaire, et de la migration. Selon des données récentes, les canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential) sont des acteurs clés dans l'homéostasie calcique. Plusieurs travaux récents ont montré que les changements d'expression de certains canaux TRP pouvaient contribuer à la cancérisation, entre autres TRPV6 et TRPV2 dans les cancers urologiques de prostate et de vessie.

Les travaux effectués au cours de cette thèse nous ont permis de montrer que la vitamine D3, étudiée depuis de nombreuses années dans le cadre de thérapie anticancéreuse pour ses pouvoirs anti-prolifératifs, stimule la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses dans certaines conditions, cet effet pro-prolifératif étant associé à une surexpression du canal TRPV6 et une augmentation du Ca^{2+} entrant par ce canal. Ainsi, nos résultats remettent en cause l'utilisation de la vitamine D3 en thérapie contre le cancer de la prostate.

Nous montrons également que l'adrénomédulline (AM), connue pour être impliquée dans la progression tumorale vers les métastases, stimule la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques et urothéliales. Cet effet nécessite la présence du canal TRPV2 ; l'AM agit en induisant la translocation à la membrane plasmique du canal TRPV2 et de ce fait en augmentant la concentration en Ca^{2+} intracellulaire ce qui permet d'activer une voie de migration impliquant la kinase d'adhésion focale FAK (Focal Adhesion Kinase) et l'intégrine $\beta 1$.

Enfin, nous mettons en évidence que dans des conditions de stress réticulaire et d'induction de l'UPR dans les cellules prostatiques cancéreuses, le translocon est le canal de fuite calcique majoritaire du réticulum endoplasmique menant à la vidange des stocks réticulaires et à la mort cellulaire.

Abstract

Cancer cells acquire during carcinogenesis some characteristics such as insensitivity to the antiproliferative signals, resistance to apoptosis and reticular stress, the acquisition of invasive capacity. Numerous studies show involvement of calcium (Ca^{2+}) in these different characteristics and in particular in the deregulation of proliferation, apoptosis, response to reticular stress, and migration. According to recent data, the TRP channels (Transient Receptor Potential) are key players in calcium homeostasis. Several recent works have shown that changes of expression of some TRP channels could contribute to carcinogenesis, among other TRPV6 and TRPV2 in urogenital cancers prostate and bladder.

Here we show that vitamin D3, studied for many years in cancer therapy for its anti-proliferative capacity, stimulates proliferation of prostate cancer cells in certain conditions, this pro-proliferative effect being associated with overexpression of TRPV6 and an increase in the Ca^{2+} entering through this channel. Thus, our results challenge the use of vitamin D3 in prostate cancer therapy.

We also show that adrenomedullin (AM), known to be involved in tumor progression to metastasis, stimulates migration and invasion of prostate and urothelial cancer cells. This effect requires the presence of TRPV2; AM acts by inducing TRPV2 translocation to plasmamembrane and the subsequent increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ which allows the activation of a migration signaling pathway involving FAK (Focal Adhesion Kinase) and $\beta 1$ integrin.

Finally, we highlight that under conditions of reticular stress and induction of UPR in prostate cancer cells, the translocon represents the endoplasmic reticulum calcium leak channel leading to the emptying of reticular stocks and cell death.



Quelquefois, au milieu d'une bataille qui semble interminable, le guerrier a une idée subite et parvient à vaincre en quelques secondes. Alors il pense : « Pourquoi ai-je souffert aussi longtemps dans un combat que je pouvais régler avec moitié moins d'énergie que je n'en ai dépensé? » En réalité, tout problème, une fois qu'il est résolu, paraît très simple. La grande victoire, qui aujourd'hui semble facile, est le résultat d'une série de petit succès qui sont passés inaperçus. Alors le guerrier comprend, et il dort tranquille. Loin de se culpabiliser d'avoir mis si longtemps à arriver là où il voulait, il se réjouit de savoir qu'il est enfin arrivé.

Paulo Coelho (Manuel du Guerrier de la Lumière)



A la mémoire de mes Grands-Parents,

A mes Parents,

Pour tout ce que je vous dois,

Pour tout ce que je suis.

Remerciements

Aux membres du jury :

Mesdames, Messieurs les membres du jury veuillez accepter mes sincères remerciements pour avoir accepté de juger ma thèse.

Madame Le Professeur Le Bourhis, c'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de présider ce jury.

Madame le Professeur Ouadid-Ahidouch et Madame le Docteur Bresson-Bepoldin, recevez toute ma gratitude pour votre lecture critique de ce manuscrit de thèse, pour laquelle vous avez accepté de consacrer votre temps.

Monsieur le Professeur Van Coppenolle, Madame le Professeur Mauroy et Monsieur le Docteur Lehen'kyi, veuillez accepter mes remerciements pour votre participation à ce jury, et pour notre collaboration au cours de ces quatre années.

Madame le Professeur Prevarskaya, merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre encadrement, votre soutien et votre disponibilité tout au long de ces quatre années de thèse.

Remerciements généraux :

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du laboratoire U1003 pour leur professionnalisme, pour l'aide et les conseils qu'ils ont su me prodiguer. Chercheurs, enseignant-chercheurs, techniciens ou étudiants, ils ont tous, à leur façon, participé au bon déroulement de cette thèse.

Merci à *Matthieu* et aux membres du bureau « des filles », *Sandra, Marine, Alex (!), Maya* et *Maylis*, pour votre bonne humeur communicative et votre franche camaraderie, ainsi que pour les moments karaoké (et Grease!). Merci à *Loïc*, pour toutes ces discussions passionnantes et ton imagination débordante et délirante. Merci également

à *Fabien*, pour ton aide et tes précieux conseils au cours de cette thèse et de la rédaction de ce manuscrit; merci à *Charlotte*, pour ton soutien lors de la finalisation de ce manuscrit (et le moment kleenex) et pour ton enthousiasme qui ont rendu les western-blot plus folkloriques. Merci à *Mehdi*, j'ai apprécié de travailler avec toi et j'espère que d'autres collaborations suivront.

Comme quelqu'un l'a si bien dit : « Faire une thèse est une échappée solitaire aux milieux de compagnons de fortune (ou d'infortune). On ne se rend pas toujours compte à quel point ils peuvent être importants dans le travail et dans la vie, jusqu'au jour où nos chemins se séparent. » C'est pourquoi je tiens à remercier mes compagnons de galère des débuts déjà partis vers de nouvelles aventures. Merci à *Hélène* (je comprends mieux aujourd'hui le mécanisme de déclenchement des moments « Hulkiens »), merci pour ton amitié, pour nos discussions à bâtons rompus autour d'une bonne camomille (et les moments Grand-Mères), pour tous les bons moments passés ensemble et ton soutien dans les mauvais, même à distance. Merci à *Alexis* pour tous les bons moments passés ensemble et pour m'avoir un jour accordé ton amitié (je crois que Big Ben nous attend toujours !).

Un merci particulier à *Sandrine*, qui un beau jour de printemps 2006 m'a amenée dans ses bagages au laboratoire. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité et tes conseils avisés au cours de mon année de Master2. Je regrette seulement que nous n'ayons pas pu continuer l'aventure de la thèse ensemble.

Et enfin, *milles mercis à ma famille*. Pour leur amour, leur soutien inconditionnel et pour leur patience à écouter mes doléances, merci à *mes Parents*, ainsi qu'à *Cédric* et *Annabelle*, et à *Térence* et *Aurélié*, mes frères et (belles-)sœurs.

TABLE
DES
MATIÈRES

GLOSSAIRE	13
INTRODUCTION	16
I – Positionnement du sujet :	17
II – Cancers de prostate et de vessie :	19
A – La prostate :	19
1 – Anatomie et fonctions :	19
2 – Le cancer de la prostate :	20
3 – Classification oncologique :	21
3.1 – Système TNM :	21
3.2 – Le système de gradation de Gleason :	22
4 – Traitements :	22
B – La vessie :	24
1 – Anatomie et fonctions :	24
2 – Le cancer de la vessie :	25
3 – Classification oncologique :	25
3.1 – Système TNM :	25
3.2 – Le grade :	26
3.3 – Classification « clinique » :	26
4 – Traitements :	28
III – Le calcium :	30
A – Homéostasie calcique et signalisation calcique :	30
1 – Homéostasie calcique :	30
2 – Signature calcique :	31
2.1 – Espace (localisation) :	31
2.2 – Temps (cinétique) :	33
2.3 – Intensité (amplitude) :	33

B – Le calciosome :	34
1 – Généralités :	34
2 – La super-famille des canaux cationiques TRP (Transient Receptor Potential) :	37
2.1 – Généralités :	37
2.2 – Les canaux TRPV :	39
C – Calcium et cancer :	40
1 – Calcium et prolifération des cellules tumorales :	40
2 – Calcium et apoptose des cellules tumorales :	42
3 – Calcium, stress réticulaire et résistance à l’apoptose :	43
4 – Calcium et migration :	45
5 – Les canaux TRP et le cancer :	47
IV – Vitamine D et Adrénomédulline :	50
A – La vitamine D :	50
1 – Synthèse et mécanisme d’action :	50
2 – Fonctions de la vitamine D3 :	52
3 – Vitamine D3 et cancer : cancer de la prostate :	53
B – L’adrénomédulline :	54
1 – Synthèse :	55
2 – Récepteurs de l’adrénomédulline :	56
3 – Fonctions de l’adrénomédulline et mécanismes d’action :	57
4 – Adrénomédulline et cancer :	59
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	60
I – Le canal TRPV6 et la vitamine D3 :	62
II – Le canal TRPV2 et l’adrénomédulline :	62
III – Stress réticulaire, fuite calcique et apoptose des cellules prostatiques cancéreuses :	63

MATERIELS ET METHODES	65
I – Culture cellulaire :	66
A – Lignées cellulaires :	66
B – Conditions de culture :	67
C – Préparation du milieu déstéroïdé :	67
II – Mesure microfluorimétrique du calcium libre intracellulaire :	68
A – La sonde calcique Fura-2/AM :	68
B – Charge des cellules en Fura-2/AM :	68
C – Milieu d’enregistrement :	69
III – RT-PCR :	69
IV – Mesure de viabilité cellulaire :	70
V – Cycle cellulaire :	70
VI – Mesure de l’apoptose par la technique d’HOESCHT :	71
VII- Transfection :	71
VIII – Immunodétection et biotinylation :	72
A – Immunodétection :	72
B – Biotinylation :	72
IX – Immunofluorescence :	73
X – Migration et invasion :	73
RESULTATS	75
Article 1 : TRPV6 determines the effect of vitamin D3 on prostate cancer cell growth	76
Article 2 : TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of cancer cells adhesion, migration and invasion	86

Article 3 : Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response. Involvement of GRP78	104
DISCUSSION	136
I – Canaux TRP et cancers :	137
A – TRPV6 et Vitamine D3 dans les cellules cancéreuses prostatiques :	137
B – TRPV2 et Adrénomédulline dans les cellules cancéreuses prostatiques et urothéliales :	139
II – Translocon : canal de fuite majoritaire dans le stress réticulaire :	143
PERSPECTIVES	146
I – Les canaux TRP dans les cancers prostatiques et urothéliaux :	147
A – Prostate : Développement de modèles <i>in vivo</i> :	147
B – Canaux TRP et cancer de la vessie :	148
II – Stress réticulaire, calcium et cancer de la prostate :	152
PUBLICATIONS PERSONNELLES	155
BIBLIOGRAPHIE	157

GLOSSAIRE

1,25(OH) ₂ D3	1,25-dihydroxyvitamine D3
25(OH)D3	25-hydroxyvitamine D
AM	Adrénomédulline
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ATF6	Activating Transcription Factor 6
BiP	Binding immunoglobulin Protein
Ca ²⁺	Calcium
CaM/Ca ²⁺	calcium-calmoduline
CLR	Calcitonin receptor Like Receptor
CREB1	cAMP Responsive Element Binding protein 1
ECC	Entrée Capacitive de Calcium
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
FAK	Focal Adhesion Kinase
GRP78	Glucose Regulated Protein 78
IP3	Inositol TriPhosphate
IP3R	Récepteur à l'IP3
IRE1	Inositol Requiring 1
MMP	Matrix MetalloProteinase
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
PCNA	Proliférating Cell Nuclear Antigen
PERK	PKR like Endoplasmic Reticulum Kinase
PMCA	Plasma Membrane Calcium ATPase
PSA	Prostate Spécifique Antigen
PTP	Permeability Transition Pore
RAMP	Receptor Activity-Modifying Protein
RE	Réticulum Endoplasmique
ROC	Receptor-Operated Channels

RXR	Récepteur à l'acide rétinoïque
RyR	Récepteur à la ryanodine
SERCA	SarcoEndoplasmic Calcium ATPase
SMOC	Second Messenger-Operated Channels
SOC	Store-Operated Channels
SOCE	Store Operated Ca ²⁺ entry
TGF-β	Transforming Growth Factor β
TLC	Translocon
TNM	Tumor Node Metastasis
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucoipine
TRPP	Transient Receptor Potential Polycistin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
UPR	Unfolded Protein Response
VDR	Vitamin D Receptor
VOC	Voltage-Operated Channels

INTRODUCTION

I - Positionnement du sujet :

Le cancer est un terme générique qui regroupe plus de 100 maladies pouvant affecter n'importe quelle partie du corps. Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anormale de cellules malignes au sein d'un tissu sain. Les cellules cancéreuses ont acquis des modifications de leur génome induisant une perte de l'apoptose (mort programmée), une perte de la régulation de leur multiplication, un pouvoir d'invasion des structures voisines, une perte de la cohésion entre elles, parmi d'autres changements.

Actuellement, le cancer est la maladie la plus mortelle dans le monde. Il a représenté la première cause de décès en France chez l'homme (33 % de l'ensemble des décès masculins) et la deuxième cause chez la femme (23 % de l'ensemble des décès féminins) entre 2003 et 2007. L'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) estime à 357 700 le nombre de nouveau cas de cancer en 2010 (203 100 cas pour les hommes, et 154 600 pour les femmes) et le nombre de décès par cancer à environ 146 800 dont 84 800 chez l'homme et 62 000 chez la femme.

Les cancers des voies urinaires comprennent principalement le cancer de la prostate, de la vessie, des reins, et des uretères et parmi ceux-ci, les cancers de prostate et de vessie représentent respectivement les 1^{er} et 2^{ème} cancers urologiques.

Véritable phénomène de santé publique, **le cancer de la prostate** est due à la croissance anormale du tissu prostatique dont les cellules sont initialement androgéno-dépendantes. Les traitements actuels visent donc à supprimer au maximum les androgènes. Néanmoins, de tels traitements s'avèrent souvent inefficaces car il apparaît une récurrence, à plus au moins long terme, la tumeur évoluant vers un phénotype androgéno-indépendant et métastatique. Bien que le cancer localisé de la prostate puisse être traité, peu de traitements existent pour les cas avancés. La compréhension des phénomènes moléculaires impliqués dans l'évolution des cellules tumorales vers l'échappement hormonal et la formation des métastases représente un axe de recherche essentiel pour le contrôle clinique de l'échappement thérapeutique. La recherche de nouveaux marqueurs, cibles et agents thérapeutiques pour palier à ces phénomènes s'avère cruciale.

En ce qui concerne **le cancer urothélial de la vessie**, il représente une entité particulière en cancérologie tant sur le plan diagnostique que thérapeutique. Ces tumeurs sont dotées d'un potentiel évolutif très aléatoire dans la mesure où certaines récidivent sur

un mode superficiel alors que d'autres évoluent vers l'infiltration musculaire. Certains paramètres, comme le grade et le stade tumoral, l'invasion vasculaire et lymphatique, apportent des informations pronostiques. Cependant leur capacité à prédire le risque de récurrence, de progression, d'évolution métastatique, de réponse à un traitement, et de survie est faible. C'est pourquoi il semble utile de pouvoir mieux caractériser le potentiel agressif des différents types tumoraux. Pour ce faire, l'utilisation de marqueurs tumoraux paraît intéressante notamment pour l'instauration de thérapies ciblées. Ainsi, dans les tumeurs de vessie superficielles, ces marqueurs permettraient de dépister les tumeurs à risque de progression vers une forme infiltrante. Aussi, ils aideraient au dépistage des tumeurs de vessie infiltrantes à risque de récurrence et d'évolution métastatique à distance.

Le calcium est un second messager universel dont les variations de concentration intracellulaires sont à l'origine de processus physiologiques importants comme la prolifération, la différenciation, la migration et l'apoptose. De plus en plus d'études indiquent que des altérations de l'homéostasie calcique cytoplasmique, réticulaire et mitochondriale, et de la modulation du fonctionnement des canaux ioniques acteurs de cette homéostasie, joueraient un rôle important dans les mécanismes de cancérisation et d'évolution des cancers. Selon des données récentes, les canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential) sont des acteurs clés dans l'homéostasie calcique. De plus, plusieurs travaux récents ont montré que les changements d'expression de certains canaux TRP pouvaient contribuer à la cancérisation. De plus, de nombreuses molécules (facteurs de croissance, hormones ou peptides), dont les mécanismes d'action et les effets physiologiques impliquent une participation de la signalisation calcique, ont été très étudiées quant à leur potentiel thérapeutique dans les cancers. C'est le cas de **la vitamine D** (pour ses effets anti-cancéreux) et de **l'adrénomédulline** (comme cible thérapeutique).

Ainsi, nous allons dans une première partie rappeler les généralités concernant les cancers de prostate et de vessie. Dans un second temps, nous aborderont l'importance de l'homéostasie calcique et de sa régulation par les canaux ioniques. Enfin, nous présenterons la vitamine D et l'adrénomédulline.

II - Cancers de prostate et de vessie :

A - La prostate :

1 - Anatomie et fonctions :

La prostate est une glande exocrine qui appartient au système reproducteur masculin. Du grec prostatès, « qui se tient en avant », elle est située en avant du rectum sous la vessie et entoure la partie haute de l'urètre. On considère qu'il existe trois grandes zones prostatiques glandulaires fonctionnelles : **la zone centrale**, qui entoure l'urètre et occupe 25 % du volume prostatique ; **la zone périphérique**, qui englobe 70 % de la glande, elle est le siège privilégié de développement des cancers prostatiques (McNeal, 1969), et **la zone pré-prostatique ou zone de transition**, fine couche de tissu glandulaire située de part et d'autre de l'urètre dans la partie centrale de la prostate qui ne représente que 5 % de la glande.

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

La partie glandulaire de la prostate est le siège d'une sécrétion exocrine qui constitue une partie du plasma séminal.

De par sa localisation, la prostate bénéficie d'une place privilégiée pour intervenir dans le processus mictionnel. Les deux sphincters urétraux intra-prostatiques permettent, en association avec la vessie, de stocker les urines et d'assurer la continence. Ces sphincters interviennent également lors de l'éjaculation. Après accumulation des différents composants du sperme dans la lumière de l'urètre prostatique, le sphincter lisse reste contracté pour empêcher l'éjaculation rétrograde dans la vessie, alors que le sphincter strié se relâche.

2 - Le cancer de la prostate :

Avec plus de 70 000 nouveaux cas et près de 9 000 décès en 2010 (source : invs.sante.fr), le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme en France et la troisième cause de décès par cancer. Dans les pays développés, l'incidence du carcinome de la prostate croît avec l'âge. Le nombre de cas total augmente donc parallèlement avec l'espérance de vie. Le cancer de la prostate se développe souvent très lentement et reste localisé dans les premiers stades de la maladie d'où une qualification de cancer « silencieux » ou « sournois ». La plupart des cancers se développent dans la zone périphérique de l'organe, environ 15% dans la zone transitionnelle et 5% dans la zone centrale. Quand le cancer évolue, il peut 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.

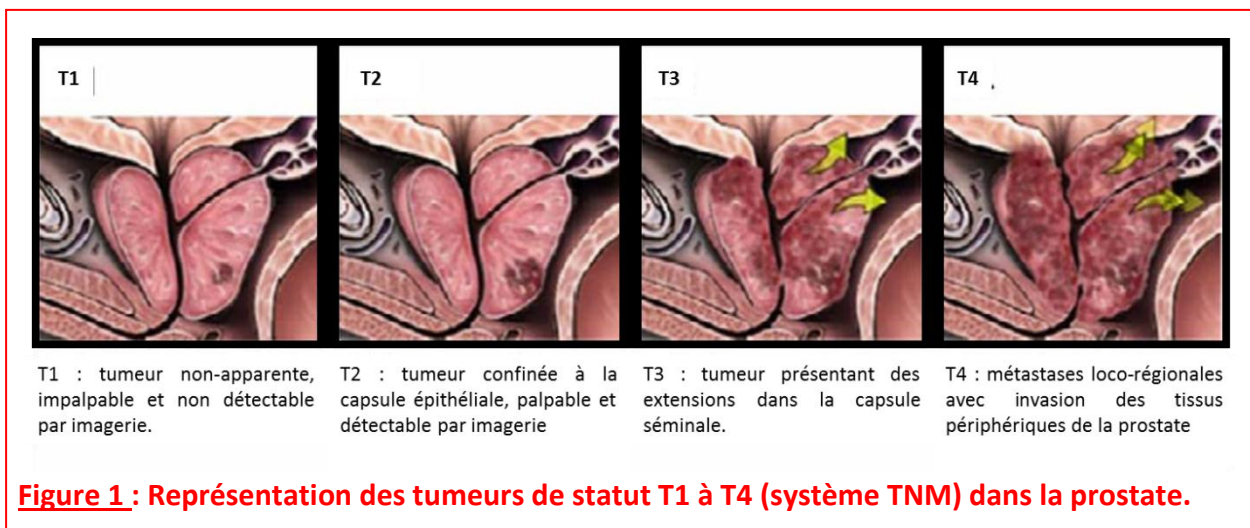
Il a été recensé un certain nombre de facteurs de risque influençant l'apparition et/ou l'évolution du cancer :

- **L'origine ethnique** : une forte incidence est retrouvée aux Etats-Unis, notamment dans la population noire américaine. Elle est par contre beaucoup plus faible en Asie et dans l'Europe de l'Est.
- **Les antécédents familiaux** : le cancer prostatique survient, le plus souvent, de manière sporadique mais un facteur génétique familial est tout de même retrouvé chez 20 % des malades. Le risque double lorsqu'un parent proche est atteint et augmente proportionnellement à l'augmentation du nombre de parents proches affectés.
- **L'âge** : 95 % des cancers prostatiques apparaissent entre 57 et 88 ans et l'Âge médian pour le diagnostic comme pour la mortalité est d'environ 73 ans.
- **Les facteurs alimentaires** : 80 % des cas de cancer de la prostate seraient liés à des régimes particuliers contenant, par exemple, trop de matières grasses dont les graisses animales seraient les plus dangereuses.

3 - Classification oncologique :

3.1 - Système TNM :

Le système de gradation TNM a été développé en 1977 par Ammon et collaborateurs (Ammon, Karstens, et Rathert, 1977). Ce système évalue la taille de la tumeur (T) et sa propagation extra-capsulaire, dans les ganglions lymphatiques (N) et dans les métastases lointaines (M). **Les différents stades T1** caractérisent de petites tumeurs impalpables et difficilement détectables par échographie. De nombreux foyers cancéreux resteront latents (Stade T1A) et d'autres évolueront localement, sans provoquer de trouble clinique, et sans être détectable au toucher rectal (Stades T1B et C). **Les tumeurs de stade T2** sont plus étendues, mais confinées à la capsule épithéliale. Elles sont détectables par palpation et peuvent être prélevées avec une aiguille à biopsie. **Le stade T3** représente des tumeurs ayant dépassées la barrière de la lame basale et se propageant dans la prostate et dans les vésicules séminales. **Le stade T4** définit les métastases loco-régionales, c'est à dire les métastases ayant gagnées des organes périphériques tels que la vessie (Figure 1). La propagation des métastases loco-régionales aux ganglions lymphatiques est définie par le **statut N** (N0-N3) en fonction de leur taille et de la distance de propagation, alors que le **statut M** (M0-M1) représente les métastases lointaines dans les organes comme le foie, les os et le cerveau.



3.2 - Le système de gradation de Gleason :

En 1974, Gleason et Mellinger créèrent leur système de gradation du cancer de la prostate (Gleason et Mellinger, 1974). Ce système repose sur les degrés de différenciation des cellules. Le système de gradation de Gleason est le plus utilisé. Il distingue 5 grades correspondant à des tumeurs de différenciation décroissante. Les caractéristiques des 5 grades sont présentées dans le **tableau 1**.






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

Tableau 1 : Caractéristiques et aspects histologiques des différents grades de cancer de la prostate.

4 - Traitements :

Il existe deux types de traitements utilisés contre le cancer prostatique : les traitements curatifs et les traitements palliatifs.

Les traitements curatifs consistent en une **prostatectomie chirurgicale** (technique chirurgicale visant à enlever la totalité du tissu pathologique prostatique) ou en une

radiothérapie externe (permet par irradiation de détruire des tissus ciblés (Rodriguez-Covarrubias *et al.*, 2008).

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

- **Des inhibiteurs de la 5 α - réductase** (finastéride) : La 5 α - réductase est l'enzyme responsable de la transformation de la testostérone en son métabolite actif : la 5 α -DHT au niveau prostatique (Thorpe *et al.*, 2007).

- **La castration ou rétrocontrôle chimique**, qui va diminuer les taux sériques d'androgènes grâce à des analogues de la LH-RH ce qui permet de réduire la synthèse de testostérone par les testicules en agissant sur l'axe hypothalamo-hypophysaire qui régule cette synthèse (Soga et Sugimura, 2007).

- **L'utilisation des œstrogènes** constitue une autre façon de provoquer un arrêt de synthèse de testostérone par les testicules par inhibition de la sécrétion hypophysaire de LH (Fluchter *et al.*, 2007).

- **Les antagonistes des androgènes** (avec les stéroïdiens : Androcur[®], Cyprostat[®] Megace[®] et les non stéroïdiens : Eulexin[®] Nilandron[®] Casodex[®]) quant à eux ont pour but d'empêcher l'action des androgènes au niveau des organes cibles en se liant à leurs récepteurs de façon compétitive (Baltogiannis *et al.*, 2004).

Le retrait des androgènes entraîne l'apoptose des cellules prostatiques androgéno-dépendantes (Colombel *et al.*, 1996). Cependant, il n'est pas rare que ces traitements provoquent l'émergence de cancers androgéno-indépendants devenant incurables par cette même stratégie.

B - La vessie :

1 - Anatomie et fonctions :

La vessie est un organe creux situé derrière le pubis. Chez l'homme, elle est localisée juste au-dessus de la prostate, en avant du rectum. Chez la femme, elle se situe sous l'utérus, en avant du vagin.

La paroi de la vessie est constituée de 3 couches : **la muqueuse** située sur la face interne de la vessie, **la musculieuse** et **l'adventice**. La muqueuse comporte un épithélium pseudostratifié polymorphe (ou dit de transition) reposant sur un chorion. Cet épithélium est un urothélium constitué de 3 couches de cellules superposées : une couche basale de cellules prismatiques, une zone intermédiaire et une couche superficielle ou luminale. Le chorion est fait de tissu conjonctif riche en fibres élastiques et en fibres nerveuses amyéliniques ainsi qu'en vaisseaux sanguins et lymphatiques. Il ne comporte pas de glandes. La musculieuse est formée par des faisceaux de cellules musculaires lisses séparées par des travées conjonctives. On distingue le muscle superficiel en contact avec le chorion et le muscle profond qui touche l'adventice. L'adventice est composé d'un tissu conjonctif contenant des vaisseaux, des nerfs et du tissu adipeux.

Les tumeurs de vessie sont représentées à plus de 90% par des carcinomes développés à partir de l'épithélium urothélial, et sont appelées tumeurs urothéliales.

La vessie possède une fonction de réservoir : elle stocke l'urine produite par les reins à travers deux conduits appelés uretères. Elle se dilate progressivement avec l'augmentation du volume d'urine collecté. Lorsque la vessie est pleine (300-600 ml), elle se contracte pour évacuer les urines vers l'urètre, un conduit qui débouche sur l'extérieur du corps par le méat urinaire.

Il existe un petit muscle très important à la jonction de la vessie et de l'urètre : il s'agit du sphincter qui se contracte pour retenir les urines dans la vessie, mais se relâche pour permettre l'émission d'urine (ou miction) vers l'extérieur.

2 - Le cancer de la vessie :

En France, avec près de 10 000 nouveaux cas annuels, dont 8 000 chez l'homme, les cancers de la vessie se placent au 5ème rang des cancers les plus fréquents. Généralement diagnostiqués après 50 ans, ils sont responsables de plus de 4 000 décès annuels soit 3% des décès par cancer. Ce cancer présente une incidence 3 fois plus importante chez l'homme que chez la femme. C'est le 2^{ème} cancer urologique après celui de la prostate.

Parmi les facteurs de risques recensés, **le tabac** est le plus important pour le cancer de la vessie, et le nombre de cancer lié au tabac est évalué à 40% (Zeeger *et al.*, 2000).

Le deuxième facteur de risque est lié aux **expositions professionnelles** qui sont à l'origine de 5 à 10% des cancers de vessie (Kogevinas *et al.*, 2003).

Des **irritations chroniques de l'appareil urinaire** induisent également une augmentation du risque de cancer de la vessie. Deux causes principales d'irritation chroniques sont connues : l'infection urinaire chronique ou bilharziose urinaire, causée par *Schistosoma haematobium* retrouvé principalement dans la population africaine (Hodder *et al.*, 2000) et le cathétérisme vésical chronique chez les paraplégiques (Groah *et al.*, 2002).

Certains agents chimiothérapeutiques, comme le cyclophosphamide, seraient associés à une augmentation du risque de cancer de la vessie (Knight *et al.*, 2002).

Il n'existe apparemment pas de formes héréditaires.

3 - Classification oncologique :

3.1 - Système TNM :

La classification anatomopathologique des tumeurs urothéliales de la vessie selon l'UICC (Union International Contre le Cancer, 2004) rend compte de l'extension en profondeur de la tumeur (T), de l'extension ganglionnaire (N) et métastatique (M) (**Tableau 2**).

La lettre T (Tumeur)	La lettre N (ganglion ou Node en anglais)
Tx Tumeur primitive non évaluable T0 Tumeur primitive non retrouvée Ta Carcinome papillaire non invasif Tis Carcinome <i>in situ</i> « plan » T1 Tumeur envahissant le chorion T2 Tumeur envahissant la musculature pT2a Tumeur envahissant le muscle superficiel (moitié interne) pT2b Tumeur envahissant le muscle profond (moitié externe) T3 Tumeur envahissant le tissu péri-vésical pT3a Envahissement microscopique pT3b Envahissement extra-vésical macroscopique T4 : Tumeur envahissant une structure péri-vésicale pT4a Prostate, vagin ou utérus pT4b Paroi pelvienne ou abdominale	Nx Ganglion non évaluable N0 Absence de métastase ganglionnaire régionale N1 Métastase ganglionnaire unique ≤ 2 cm N2 Métastase ganglionnaire unique > 2 cm et ≤ 5 cm N3 Métastase(s) ganglionnaire(s) > 5 cm La lettre M (Métastase) Mx Métastases non évaluables M0 Absence de métastase à distance M1 Métastases à distance

Tableau 2 : Classification TNM du cancer de la vessie. (D'après Sobin et Wittekind, 2002)

3.2 - Le grade :

Le grade repose sur l'aspect architectural et le degré de différenciation cellulaire des cellules tumorales : atypie, index mitotique, conservation de la polarité, maturation urothéliale. Le grade est évalué par le médecin anatomopathologiste parallèlement au stade grâce à l'observation microscopique des prélèvements.

Le grade histologique distingue trois niveaux de malignité : la tumeur de faible potentiel de malignité (FPM), le carcinome de bas grade et le carcinome de haut grade.

3.3 - Classification « clinique » :

Le stade d'infiltration est un élément pronostique déterminant et reste le critère le plus fiable et reproductible sur lequel sera basée la décision thérapeutique (Figure 2). Les tumeurs sont classées en deux groupes suivant leur invasion tissulaire : **les tumeurs superficielles (non infiltrantes, Tis, Ta et T1)** qui représentent environ 70% des tumeurs

urothéliales et restent localisées dans la muqueuse, et **les tumeurs invasives (infiltrantes, de stade T2 et supérieur)** qui représentent 30% des tumeurs et infiltrent la musculuse.

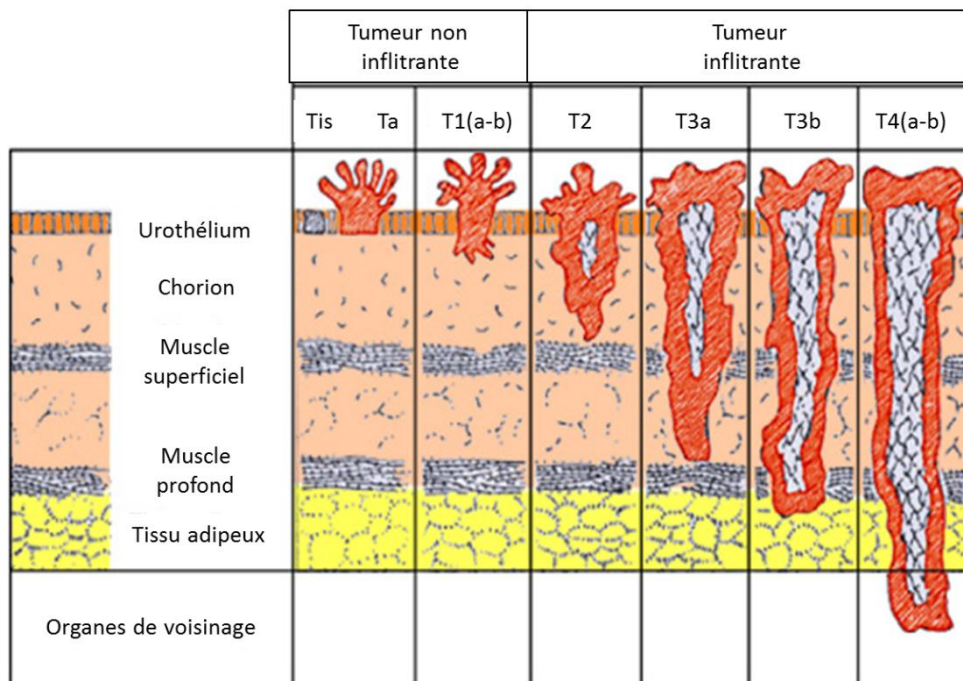


Figure 2 : Stade ou degré d'infiltration des tumeurs urothéliales. (D'après www.infocancer.org)

Parmi les tumeurs superficielles, environ 60% vont récidiver et 10 à 20% vont progresser. Ces tumeurs superficielles sont elles-mêmes classées selon leur risque évolutif : faible risque, risque intermédiaire et haut risque (**tableau 3**). Cette classification permet de déterminer le traitement adéquat à proposer aux patients (Irani *et al.*, 2007).

Risque évolutif	Tumeur superficielles de la vessie	Risque de progression à 5 ans
Groupe 1 : Faible risque	TaG1 unique (bas grade ou FPM), diamètre à 3 cm, non récidivé	7,1 %
Groupe 2 : Risque intermédiaire	TaG1-G2 (bas grade ou FPM) multifocal et/ou récidivante, T1G1-G2 (bas grade ou FPM)	17,4 %
Groupe 3 : Haut risque	TaG3 (haut grade), T1 récidivante, T1G3 (haut grade) Tis	41,6 %

Tableau 3 : Tumeurs superficielles classées selon leur risque évolutif (d'après Irani *et al.*, 2007).

4 - Traitements :

Pour les **tumeurs superficielles à faible risque évolutif**, la résection transurétrale de la vessie (RTUV) est suivie d'une simple surveillance par examen cytoscopique.

Pour les **tumeurs superficielles à risque intermédiaire d'évolution**, la RTUV est suivie d'une chimiothérapie intra-vésicale et/ou d'une instillation endovésicale de BCG. Le BCG ou Bacille de Calmette et Guérin est habituellement utilisé dans la vaccination contre la tuberculose (Mahairas *et al.*, 1996). Dans le cancer de la vessie ce bacille va agir comme un immunostimulant local. L'activation de la réponse immunitaire au BCG va se dérouler en trois phases. (i) le bacille est phagocyté par les macrophages qui vont présenter l'antigène et permettre le démarrage de la réaction inflammatoire grâce à la sécrétion de cytokines (IL-1, IL-6 et IL-8). (ii) les antigènes bactériens sont reconnus par les cellules CD4 (TH0) qui vont se différencier en lymphocytes TH1. (iii) ces lymphocytes TH1 vont activer et recruter des cellules cytotoxiques capables d'induire la mort des cellules tumorales (Brandau et Suttman, 2007).

Les **tumeurs superficielles à haut risque** (TaG3, T1G3, Tis) présentent un risque de récurrence de 80 % et un taux de progression de plus de 40 %. Après RTUV, ces tumeurs sont traitées par chimiothérapie intravésicale et/ou par instillation endovésicale de BCG. En cas de récurrence précoce, la cystectomie est envisagée afin d'éviter que la tumeur n'évolue vers un phénotype invasif et métastatique. Ces tumeurs posent un problème thérapeutique pour le médecin urologue puisqu'il n'existe pas de consensus sur leur traitement. Il est donc important pour ce groupe de tumeurs de définir des critères permettant d'établir le pronostic et de guider la thérapeutique.

La plupart des **tumeurs invasives** (stade T2 et supérieur) et des tumeurs superficielles des groupes 2 et 3 sont traités par chimiothérapie. Pour les tumeurs superficielles, la chimiothérapie à base de mitomycine C est administrée comme le BCG par instillation endovésicale après RTUV. Elle est très souvent préconisée dans les 24 heures qui suivent la RTUV pour prévenir le risque de récurrence précoce. Pour les tumeurs invasives, elle est toujours utilisée après une cystectomie lorsque la tumeur a envahi les organes voisins et en particulier quand il existe une atteinte des ganglions lymphatiques. Dans ce cas, elle est administrée par voie intraveineuse. Les meilleurs taux de réponse et de survie ont été obtenus avec le protocole MVAC (méthotrexate, vinblastine, adriamycine et cisplatine).

D'autres protocoles sont également utilisés : le protocole CMV (cisplatine, méthotrexate et vinblastine) ou CISCA (cyclophosphamide, doxorubicine et cisplatine) (Irani *et al.*, 2007). La radithérapie est rarement utilisée seule. Elle peut être utilisée de façon concomitante à la chimiothérapie. Les tumeurs invasives sont presque toujours de grade élevé et associées à des carcinomes *in situ*. Leur développement engendre une augmentation de la diffusion micrométastatique et une infiltration des organes voisins de la vessie. La survie globale à 5 ans des patients présentant des tumeurs invasives est de seulement 50 % (Lebret *et al.*, 2000). Ces patients subissent une cystectomie partielle ou complète suivant l'importance de l'infiltration tumorale. Chez les femmes, la résection de la vessie signifie habituellement l'ablation de l'utérus, des trompes de Fallope, des ovaires et d'une partie du vagin. Chez les hommes, la cystectomie s'accompagne souvent d'une résection de la prostate et des vésicules séminales. La cystectomie peut être précédée d'un curage ilio-obturateur, opération qui consiste à retirer les ganglions lymphatiques situés de part et d'autre de la vessie.

III - Le calcium :

Il est bien établi que le calcium (Ca^{2+}) est un second messenger universel et un facteur clé de la signalisation intracellulaire impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que la sécrétion, l'apoptose, la fécondation, la contraction, la régulation de la transcription génique, la prolifération et la motilité cellulaire (Berridge *et al.*, 1998 ; Berridge *et al.*, 2000).

De nombreux organites intracellulaires comme les mitochondries, le noyau, l'appareil de Golgi fonctionnent comme des réserves calciques, mais, à ce jour, le réticulum endoplasmique (RE) semble constituer la plus importante réserve calcique intracellulaire ce qui fait que les cellules ont deux sources principales de calcium, l'une contenue dans ces stocks réticulaires et l'autre provenant du milieu extracellulaire.

Le calcium, messenger des plus versatiles, représente la plus petite « molécule » qui soit aussi bien compartimenté dans la cellule. Il est présent à une concentration d'environ 1 mM dans la matrice extracellulaire ainsi que dans le réticulum endoplasmique et de 100 nM dans le cytoplasme. Cependant, sa répartition dans un même compartiment peut être très hétérogène car il est présent sous forme libre ou liée à des protéines dites chélatrices qui sont présentes aussi bien dans le réticulum endoplasmique (ex : la calréticuline, la calbindine) que dans le cytoplasme (ex : la calmoduline, la calcineurine). Cette répartition hétérogène lui confère une dynamique importante au sein de la cellule et un rôle de messenger primordial.

A - Homéostasie calcique et signalisation calcique :

1 - Homéostasie calcique :

L'homéostasie calcique cellulaire est, par définition, l'équilibre entre les entrées (influx), les sorties (efflux) et le stockage du Ca^{2+} . L'homéostasie calcique est donc directement responsable du maintien de la compartimentation du Ca^{2+} dans la cellule et

ainsi du maintien de la possibilité pour cet ion de jouer un rôle de second messenger. En effet, au repos, les différents acteurs impliqués dans l'homéostasie calcique maintiennent une concentration de Ca^{2+} cytosolique très faible par rapport au milieu extracellulaire et aux stocks intracellulaires. Un signal calcique correspond donc à un ou plusieurs flux de Ca^{2+} entre compartiments à l'origine d'un message à l'échelle moléculaire qui conduit à la modulation d'une fonction cellulaire. Dès qu'un canal laissant passer du Ca^{2+} s'active, l'ion accède au cytoplasme de la cellule et peut interagir avec des protéines partenaires sensibles au Ca^{2+} . Ces acteurs spécifiques intègrent le signal, entraînant l'activation ou la modulation d'une fonction cellulaire.

2 - Signature calcique :

La signature calcique d'une fonction cellulaire désigne les propriétés d'un ou plusieurs signaux calciques à l'origine de cette fonction. La signature calcique est définie par trois paramètres fondamentaux, caractérisant cette modification de Ca^{2+} intracellulaire, à savoir l'espace, le temps et l'intensité, ce qui, au niveau du signal calcique se traduit par la localisation, la cinétique, et l'amplitude du flux calcique (Figure 3).

2.1 - Espace (localisation) :

La localisation de l'entrée de Ca^{2+} peut être soit limitée à une petite région sous-membranaire de la cellule, soit étendue à la globalité de la cellule. Cette différence spatiale peut engendrer des réponses physiologiques différentes, par exemple une entrée localisée peut être à l'origine de phénomènes sécrétoires (sécrétion de neurotransmetteurs) (Llinas *et al.*, 1992) et à l'inverse, une vague calcique peut être à l'origine de contraction musculaire (contraction du muscle lisse du colon chez l'homme) (Kovac *et al.*, 2008).

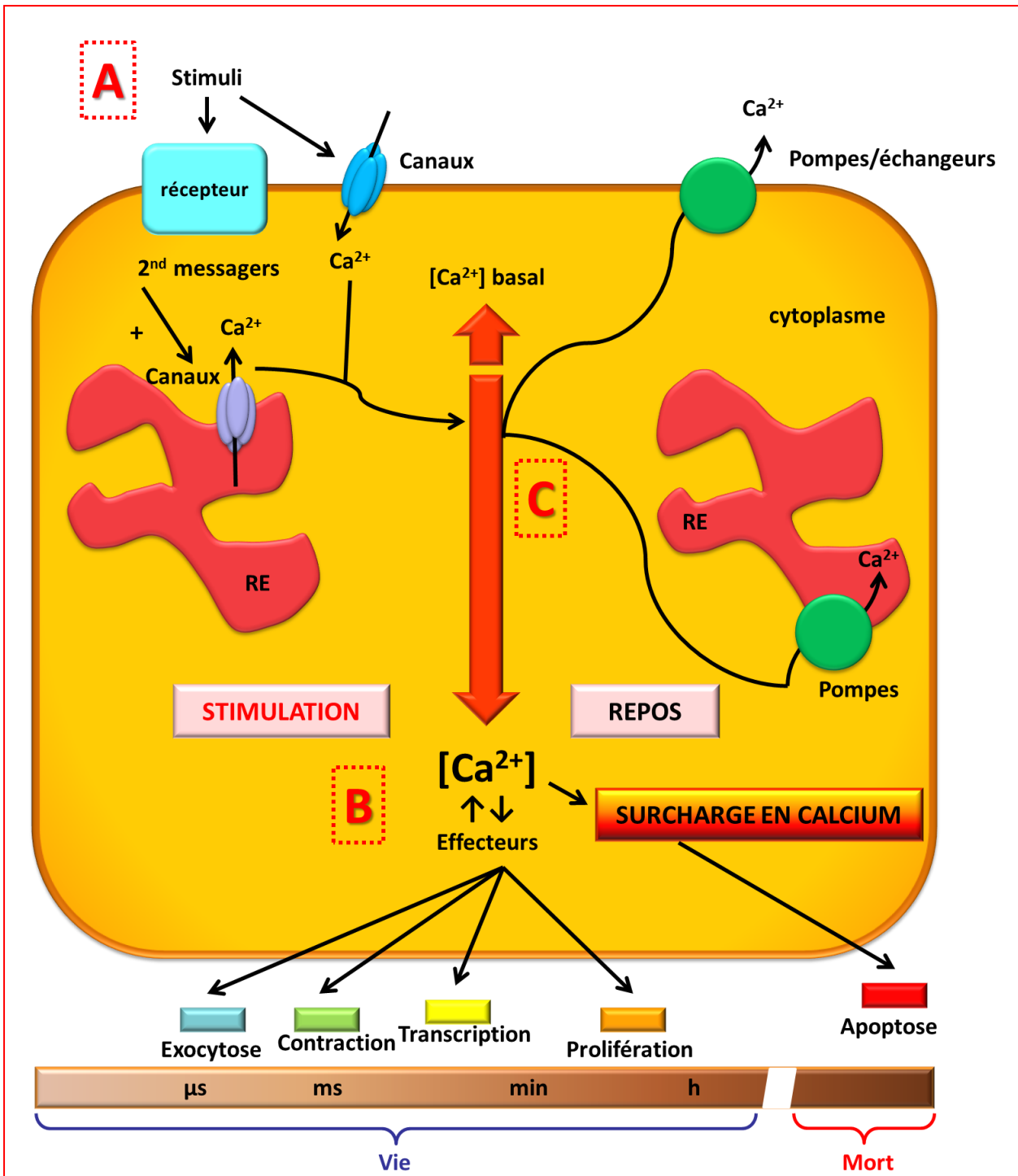


Figure 3 : Représentation schématique de la signalisation calcique. (A) : entrée de calcium ou production de seconds messagers qui provoquent la libération du calcium contenu dans les stocks intracellulaires ; (B) : variété de processus physiologiques induits par le calcium ; (C) : retour à l'état de repos grâce à l'action combiné de pompes et d'échangeurs. (Adapté de Berridge *et al.*, 2003)

2.2 - Temps (cinétique) :

Les réponses physiologiques peuvent varier en fonction de la fréquence et du temps de l'entrée calcique. A titre indicatif, des signaux transitoires calciques, également appelés oscillations calciques, peuvent être à l'origine de la translocation de certains facteurs de transcriptions comme le NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) (Shuttleworth *et al.*, 2004), par contre, une entrée calcique soutenue peut jouer un rôle majeur dans la prolifération des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et des cellules endothéliales humaines de l'artère pulmonaire (Abdullaev *et al.*, 2008) voire à l'inverse, dans l'apoptose des cellules prostatiques cancéreuses (Vanoverberghe *et al.*, 2003).

2.3 - Intensité (amplitude) :

Pour déclencher une réponse biologique (prolifération, apoptose, sécrétion,...) les activités des événements calciques élémentaires doivent se sommer pour obtenir un signal d'amplitude supérieure au seuil d'activation des protéines effectrices.

Chaque protéine senseur de Ca^{2+} possède une affinité spécifique pour ce dernier ce qui détermine un seuil de concentration calcique à partir duquel suffisamment de protéines senseur pourront être activées. Ainsi, la calcium-calmoduline possède deux sites senseur avec des affinités différentes pour le Ca^{2+} ce qui fait que l'un des deux lobes ou les deux de cette protéine seront activés en fonction de la somme des signaux calciques et joueront leurs rôles respectifs (Liang *et al.*, 2003). Enfin, bien que plus difficile à estimer, la régulation en amplitude des signaux calciques est toutefois décrite, notamment dans l'activation de gènes (Dolmetsch *et al.*, 1997).

Le calcium est impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques. De ce fait, divers acteurs et différentes voies de transduction sont nécessaires pour bien décoder le signal calcique.

B - Le calciosome :

Le calciosome se définit comme l'ensemble des protéines impliquées dans l'homéostasie calcique et/ou dans les signaux calciques. Il existe différents types de canaux et pompes calciques qui régulent les échanges d'ions calcium (Roderick, 2008).

1 - Généralités :

Au niveau de la membrane plasmique, des pompes appelées **PMCA**s (**Plasma Membrane Ca²⁺ATPase**) et des **transporteurs** (comme l'échangeur **Na⁺/Ca²⁺**) sont chargés de faire sortir le Ca²⁺ hors de la cellule. Il existe également des canaux calciques classés en fonction de leur stimulus d'activation et qui sont chargés de faire entrer le calcium dans la cellule. Les canaux de type **ROC** (**Receptor-Operated Channels**) sont par définition des récepteurs-canaux. Leur ouverture est directement stimulée par la fixation du ligand sur son récepteur. L'ouverture du canal n'est donc pas tributaire de voies de signalisation intracellulaires. Les canaux de type **VOC** (**Voltage-Operated Channels**) sont des canaux dont l'ouverture se produit consécutivement au changement du potentiel de membrane. Les canaux de type **SMOC** (**Second Messenger-Operated Channels**) sont, quant à eux, activés par l'intermédiaire de seconds messagers générés suite à l'activation d'un récepteur membranaire. Enfin, les canaux de type **SOC** (**Store-Operated Channels**) sont, par définition, des canaux ioniques activés consécutivement à la déplétion des stocks de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique (RE). Ils sont responsables de l'entrée capacitive de Ca²⁺ (ECC), aussi appelée SOCE (Store Operated Ca²⁺ entry), qui constitue l'entrée principale de Ca²⁺ dans les cellules non-excitables (Putney, 2011). Outre les protéines présentes sur la membrane plasmique, il existe également des protéines intracellulaires permettant de réguler les échanges d'ions calcium au niveau des membranes réticulaires, golgiennes, mitochondriales et lysosomiales (Roderick, 2008). **Le réticulum endoplasmique représente la réserve majeure de calcium pour la cellule** (Berridge, 1998). Au niveau de celui-ci, des canaux et pompes calciques contrôlent les flux d'ions Ca²⁺ entre le cytosol et le milieu intra-réticulaire (Berridge, 1998 ; Roderick, 2008). Les **récepteurs canaux à la ryanodine** ainsi que les **récepteurs canaux à l'IP3** permettent, suite à leur activation, la libération du calcium contenu dans le réticulum.

Des pompes calciques appelées **SERCAs** vont, suite à cette vidange, utiliser l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP, afin d'accumuler des ions calcium dans le réticulum et ainsi restaurer les réserves calciques intra-réticulaires (Figure 4).

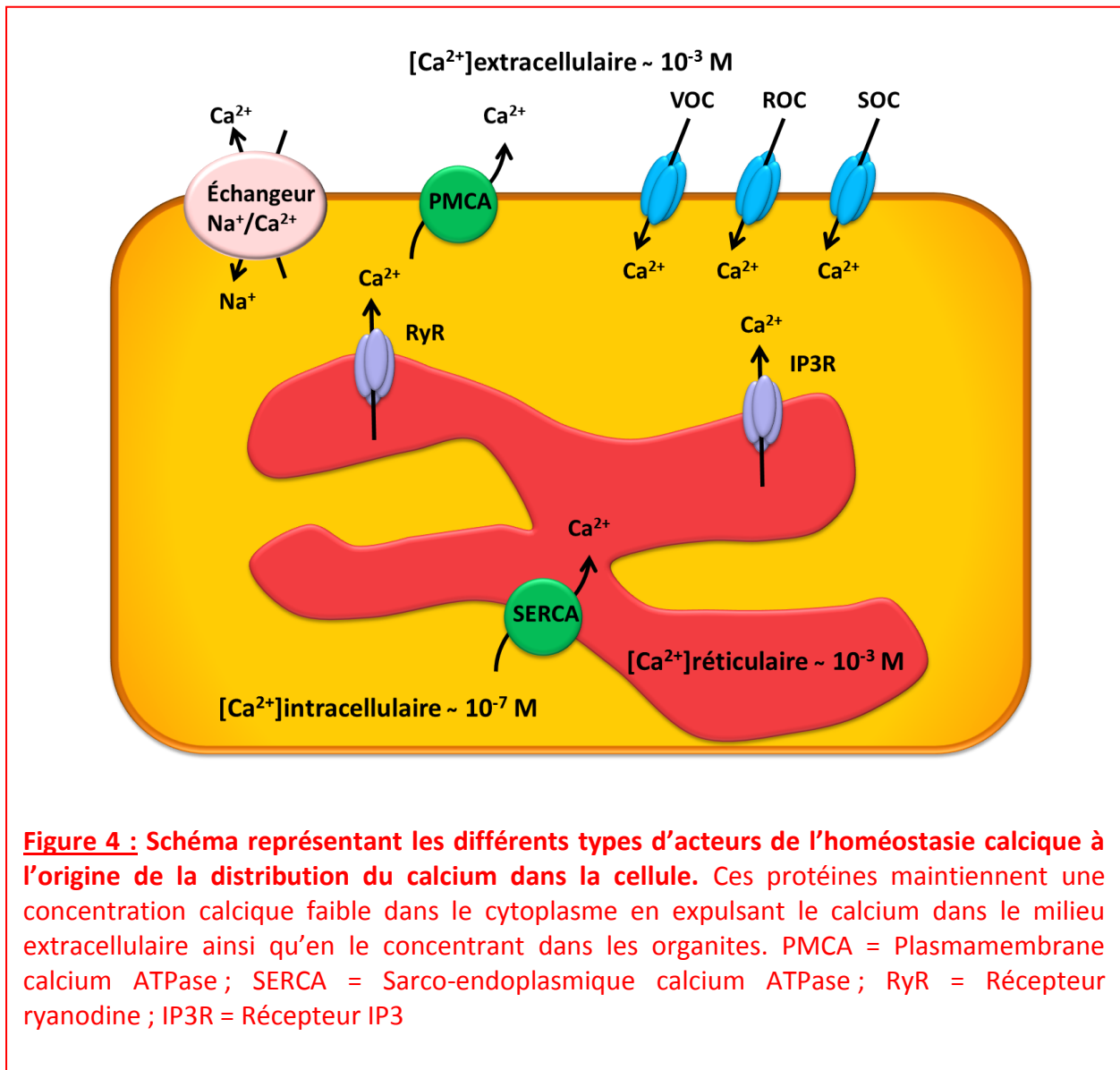


Figure 4 : Schéma représentant les différents types d'acteurs de l'homéostasie calcique à l'origine de la distribution du calcium dans la cellule. Ces protéines maintiennent une concentration calcique faible dans le cytoplasme en expulsant le calcium dans le milieu extracellulaire ainsi qu'en le concentrant dans les organites. PMCA = Plasmamembrane calcium ATPase ; SERCA = Sarco-endoplasmique calcium ATPase ; RyR = Récepteur ryanodine ; IP3R = Récepteur IP3

Il a également été décrit une fuite passive du Ca^{2+} réticulaire compensant la recapture permanente du Ca^{2+} par les pompes présentées ci-dessus (Hofer *et al.*, 1998; Mogami *et al.*, 1998). Un des candidats majeurs jouant le rôle de canal de fuite est le complexe ribosome-translocon (Van Coppenolle *et al.*, 2004 ; Flourakis *et al.*, 2006). Le **translocon** est un complexe de plusieurs protéines. Les sous-unités Sec61 α, β et γ forment le pore du canal. D'autres protéines sont associées à ces sous-unités comme TRAM et Sec63p. Les sous-unités ribosomales viennent se lier au translocon. La synthèse protéique peut alors débiter. La

chaîne peptidique néosynthétisée « descend » dans la lumière du RE (Figure 5). Le translocon est à la fois impliqué dans la traduction et la fuite calcique passive du RE, mais également dans la réponse UPR (Unfolded Protein Response) suite à un stress réticulaire.

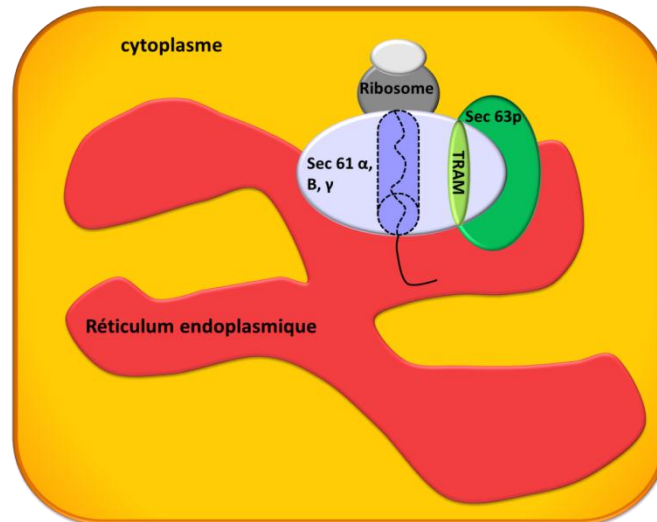


Figure 5 : Représentation schématique du complexe ribosome-translocon.

La nature moléculaire exacte des canaux impliqués dans l'entrée de calcium dans la cellule reste encore matière à débats. **De nombreux travaux indiquent que les canaux cationiques non voltage-dépendants de la famille TRP (Transient Receptor Potential) sont des acteurs clés de l'homéostasie calcique (Clapham, Runnels, et Strubing, 2001; Montell, 2001).** Les gènes des canaux de la famille TRP encodent une vingtaine de canaux plus ou moins sélectifs au Ca^{2+} pouvant être impliqués dans l'entrée de Ca^{2+} après stimulation de récepteur et dans le remplissage des réserves intracellulaires après leur vidange (Hofmann *et al.*, 2000).

2 - La super-famille des canaux cationiques

TRP (Transient Receptor Potential) :

2.1 - Généralités :

Le terme TRP a été initialement utilisé pour caractériser un mutant de drosophile montrant une réponse de photo-transduction perturbée (Minke *et al.*, 1977). Environ 30 membres de la superfamille TRP ont été identifiés chez les mammifères et sont classés dans six différentes familles : **TRPC** pour «Canonical» ou «Classique», **TRPV** pour «Vanilloïde», **TRPM** pour «Mélastatin», **TRPML** pour «Mucolipin», **TRPP** pour « Polycystin » et **TRPA** pour « Ankyrin » (Figure 6).

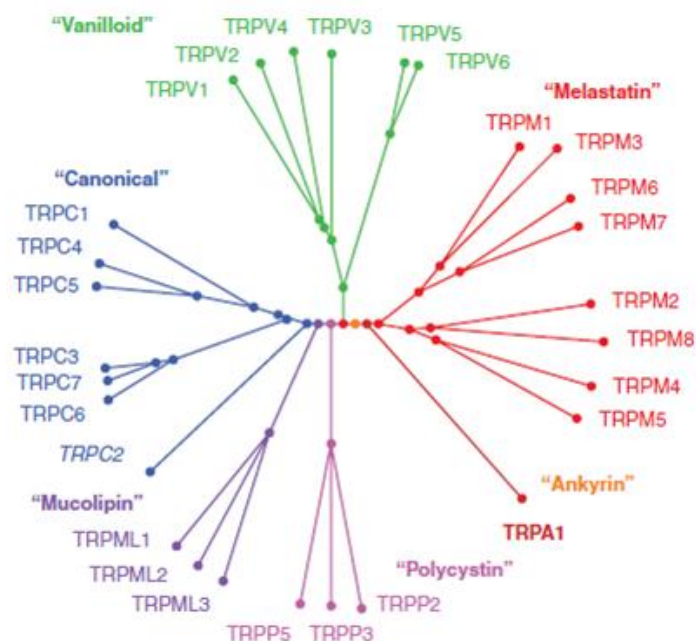


Figure 6 : Arbre phylogénétique de la famille des canaux TRP humains. (Le gène humain codant pour le canal TRPC2 étant un pseudogène, son orthologue murin a été utilisé). (Gees *et al.*, 2010)

Les TRP sont composés de monomères comprenant six segments transmembranaires hydrophobes, chacun séparé par de petites boucles hydrophiles (figure 7). La séquence comprise entre les segments transmembranaires 5 et 6 comprend une

boucle « P-loop » impliquée dans la sélectivité ionique du canal. Leurs parties N et C-terminales sont cytoplasmiques et contiennent différents domaines. Par exemple, il existe d'une part un domaine ankyrine (dans certaines sous-familles de TRP) et un domaine CC-N (coil-coil N-terminal) en N-terminal et d'autre part, un domaine CC-C (coil-coil C-terminal) en C-terminal. Il existe également différents motifs communs aux TRPC et V (les motifs ankyrine présents en N-terminal) et des motifs impliqués dans des interactions protéiques (CIRB et PDZ) (pour revue : Vassort et Fauconnier, 2008). Quatre monomères de TRP se multimérisent et forment une structure tétramérique (homo ou hétéro-tétramères) (Kedei *et al.*, 2001 ; Amiri *et al.*, 2003 ; Hoenderop *et al.*, 2003 ; Chubanov *et al.*, 2004).

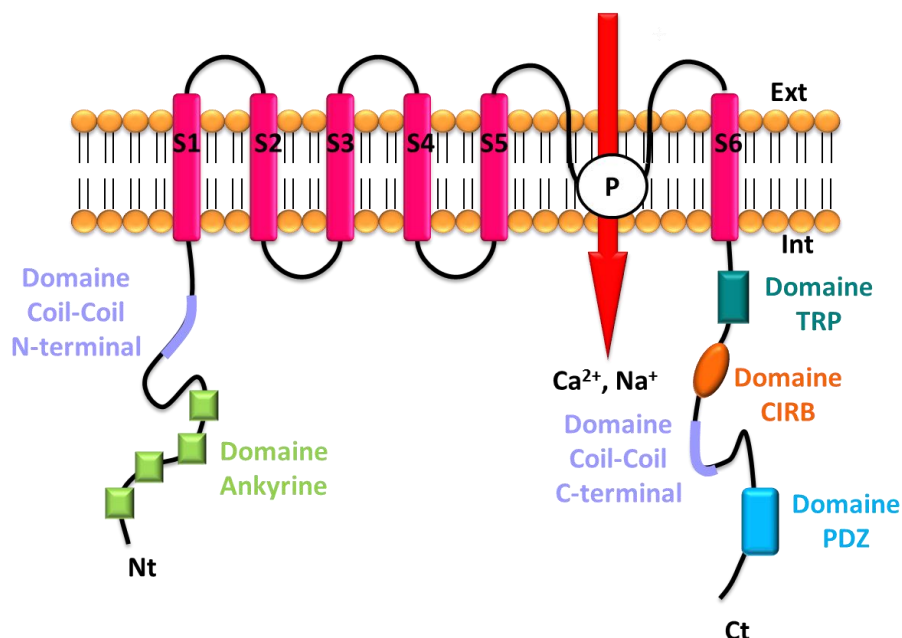


Figure 7 : Représentation schématique de la structure secondaire générale d'un monomère de TRP.

Les canaux TRP sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques dont la liste est régulièrement mise à jour (Owsianik *et al.*, 2006) ; ces canaux sont notamment impliqués dans la thermosensation (TRPV1 à V4, TRPM8, TRPA1), dans la mécanosensation (TRPV4, TRPML3), ou encore dans la gustation (TRPM5). Il a par ailleurs été démontré que des altérations fonctionnelles des canaux TRP ainsi que des variations quantitatives de leur expression peuvent perturber la physiologie de la cellule jusqu'à l'apparition de pathologies (Nelson *et al.*, 2011).

2.2 - Les canaux TRPV :

Quatre membres de la famille des canaux TRPV (TRPV1-4) fonctionnent en tant que détecteurs de chaleur. Exprimé dans les petits neurones sensoriels, TRPV1 s'active rapidement pour des températures avoisinant les 43°C et est sensible aux composés vanilloïdes alors que TRPV2, présent dans les grands neurones sensoriels est actif pour des températures nocives supérieures à 53°C. TRPV3, principalement exprimé dans le système nerveux central, les neurones sensoriels et les kératinocytes, est sensible à la température à des seuils inférieurs à ceux observés pour TRPV1 et 2 (entre 22 et 40°C). TRPV4 constitue un canal sensible à de faibles variations de température ainsi qu'à des changements d'osmolarité (Benham, Gunthorpe, et Davis, 2003; Caterina *et al.*, 2000). Son activation semble dépendre de sa localisation et d'un (de) messenger(s) intracellulaire (Watanabe *et al.*, 2002a; Watanabe *et al.*, 2002b). Les canaux TRPV2, TRPV3 et TRPV4 ont été isolés de par leur forte homologie de séquence par rapport à TRPV1. Leurs modes d'activation sont divers mais semblent tous en relation avec les mécanismes de perception sensorielle tels que la thermoception (TRPV1, V2 et V3) ou l'osmoception (TRPV4). De plus il apparaît que ces canaux peuvent être activés par différents types d'acides gras intracellulaires tels que l'anandamide pour TRPV1 ou l'acide époxyicosatriénoïque, un produit de dégradation de l'anandamide. Néanmoins les mécanismes moléculaires permettant à ces molécules d'ouvrir ces canaux restent encore à élucider. TRPV5 et TRPV6 sont des membres plus éloignés des précédents. Ils forment des canaux hautement sélectifs pour le calcium découverts initialement dans les épithélia intestinaux, rénaux et placentaire où ils permettraient la réabsorption de calcium (Gunthorpe *et al.*, 2002; Hoenderop *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 1999).

C - Calcium et cancer :

Les cellules cancéreuses acquièrent au cours de la cancérogenèse certaines caractéristiques comme : une autosuffisance pour les signaux de croissance, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une résistance à l'apoptose, un potentiel réplicatif augmenté, une capacité à stimuler l'angiogenèse, l'acquisition d'un pouvoir invasif et métastatique et une instabilité génétique (Hanahan *et al*, 2000). De nombreux travaux montrent l'implication du calcium dans ces différentes caractéristiques et en particulier la dérégulation de la prolifération, de l'apoptose, et de la migration (Roderick *et al*, 2008 ; Prevarskaya *et al*, 2010).

1 - Calcium et prolifération des cellules tumorales :

Les données actuelles s'accordent sur le fait que le calcium cytosolique joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en intervenant à des points stratégiques tels que : le début de phase G1, la transition G1/S et G2/M (Roderick *et al*, 2008) (figure 8). Il permet l'expression de gènes précoces en phase G1, tel que fos, jun et myc mais aussi la phosphorylation de Rb1 (protéine du rétinoblastome1) en G1/S. La phosphorylation de Rb1 est dépendante du complexe calcium-calmoduline (CaM/Ca²⁺) et de la concentration en calcium cytosolique. Ces mécanismes sont nécessaires à la progression des cellules dans la phase G1 puis à la transition G1/S. Il existe d'autres acteurs majeurs de cette régulation de la prolifération par le calcium : la calcineurine et CREB1 (cAMP Responsive Element Binding protein 1) (Roderick *et al*, 2008). La calcineurine régule la voie NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). Sous sa forme inactive phosphorylée, NFAT est localisé dans le cytoplasme. Une augmentation du calcium intracellulaire permet l'activation de la calcineurine qui déphosphoryle NFAT. NFAT est alors transloqué vers le noyau où il régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération. CREB1 est également un facteur de transcription et il peut se lier au promoteur de la cycline D1 et stimuler sa transcription. CREB1 serait activé par le complexe Ca²⁺-CaM kinase 2.

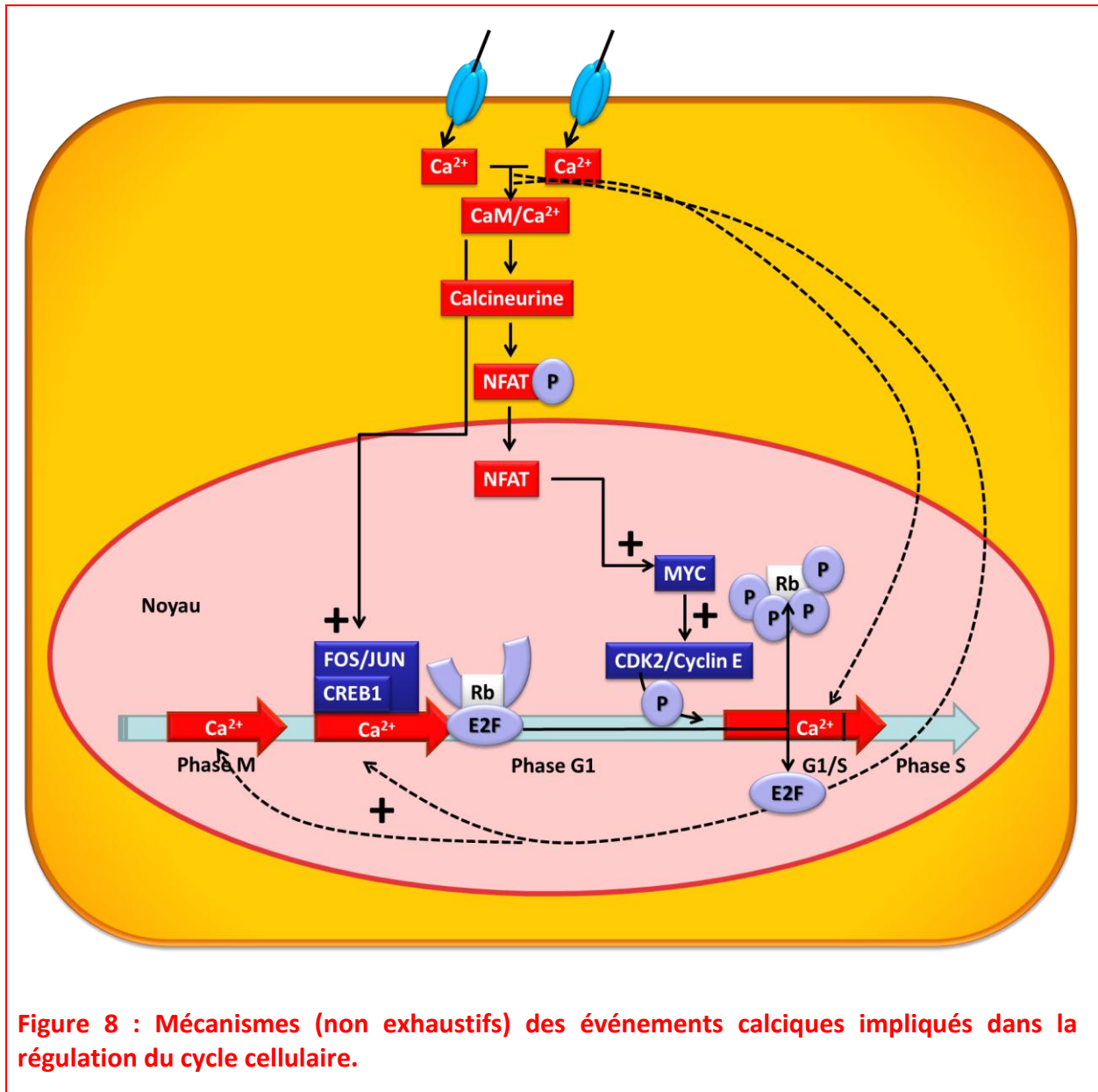


Figure 8 : Mécanismes (non exhaustifs) des événements calciques impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

Au cours de la cancérogenèse, la régulation de la prolifération par le calcium est modifiée en réponse à des perturbations de l'expression et/ou de l'activité des protéines régulant les signaux calciques (Prevarskaya *et al*, 2010). Par exemple, dans le cancer de la prostate, l'entrée de calcium dans la cellule tumorale est connue pour activer le facteur NFAT et stimuler la prolifération (Lehen'kyi *et al*, 2007). Le laboratoire a montré le rôle crucial de canaux ioniques calciques surexprimés dans ces cellules cancéreuses et qui entraînent un influx anormal de calcium stimulant la prolifération (Thébault *et al*, 2006 ; Lehen'kyi *et al*, 2007).

2 - Calcium et apoptose des cellules

tumorales :

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène bien décrit faisant intervenir de nombreuses protéines. Plusieurs voies principales de signalisation sont répertoriées comme étant inductrices de l'apoptose. On peut citer la voie des récepteurs à domaine de mort activés par leurs ligands spécifiques (TGF- β , Fas ligand), qui représente la voie extrinsèque et la voie mitochondriale impliquant les protéines de la famille Bcl-2, qui représente la voie intrinsèque. Ces deux voies, une fois activées, font intervenir des aspartate-protéases appelées caspases qui dirigent alors l'apoptose.

Plusieurs études ont rapporté le pouvoir pro-apoptique du Ca^{2+} . Ainsi, il est connu que des événements tels que la surcharge mitochondriale en Ca^{2+} , qui induit l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore) menant à un relargage du cytochrome c et d'autres protéines pro-apoptotiques (pour revue : Bernardi et Rasola, 2007), ou l'activation de la calcineurine par le Ca^{2+} à l'origine de la déphosphorylation de la protéine proapoptotique Bad et ainsi de son activation et de sa translocation dans la mitochondrie (Wang *et al.*, 1999 ; Shou *et al.*, 2004) sont autant d'événements qui peuvent déclencher l'apoptose.

Dans le cas du cancer de la prostate, il est montré que l'entrée de calcium par les canaux SOC est un élément clés intervenant dans le contrôle de l'apoptose des cellules saines et cancéreuses (Vanden Abeele *et al.*, 2002). La fonction normale de ces canaux SOC est de faire entrer du calcium dans la cellule afin de reconstituer les stocks calciques réticulaires (ECC). Cependant, une ouverture prolongée de ces canaux conduit à une accumulation de calcium dans le cytoplasme ce qui induit l'entrée en apoptose des cellules. Les canaux SOC sont inhibés dans les cas de cancers avancés (Vanden Abeele *et al.*, 2002 ; Vanden Abeele *et al.*, 2004), et leur expression *de novo* dans les cellules cancéreuses prostatiques correspondant à des cancers avancés restaure la sensibilité à l'apoptose (Flourakis *et al.*, 2010).

3 - Calcium, stress réticulaire et résistance à

l'apoptose :

Un stress réticulaire peut mener à la mort cellulaire par différents mécanismes déclenchant notamment l'apoptose, l'autophagie ou encore la nécrose (Tabas *et al.*, 2011 ; Chen et Yin, 2011 ; Valentin-Acevedo *et al.*, 2011 ; Janssen *et al.*, 2009). Dans le cadre de nos recherches, nous nous intéressons à l'apoptose liée au stress réticulaire.

La vidange prolongée du Ca²⁺ réticulaire peut induire un stress réticulaire. En effet, une diminution de la concentration en calcium réticulaire est un signal de stress important pour la cellule en perturbant notamment la bonne conformation des protéines en cours de synthèse. La cellule répond à ce stress en activant la réponse UPR (Unfolded Protein Response). L'UPR permet d'intégrer l'intensité de ce stress et de diriger la cellule vers sa survie ou l'apoptose. Cette réponse englobe une signalisation très complexe se déroulant sur quatre étapes : (i) la synthèse protéique est diminuée afin de contrer une accumulation supplémentaire de protéines. (ii) la synthèse de protéines chaperonnes est augmentée afin de renforcer la capacité de maturation des protéines néosynthétisées. (iii) les gènes impliqués dans la fonction ERAD (ER Associated Degradation) sont largement transcrits dans le but d'éliminer du RE des protéines mal repliées. (iv) l'apoptose est engagée lorsque la cellule est soumise à un stress trop important et que l'UPR est dépassé.

L'UPR est induite par l'activation de trois protéines 'senseurs' du stress du RE: **PERK (PKR like Endoplasmic Reticulum Kinase)**, **ATF6 (Activating Transcription Factor 6)**, **IRE1 (Inositol Requiring 1)**. Ces senseurs sont ancrés à la membrane du RE et exposent une partie de leur séquence peptidique dans sa partie luminale. Cette région, commune aux trois senseurs, contient des motifs hydrophobes qui sont reconnus par la protéine chaperonne **GRP78 (Glucose Regulated Protein 78) ou BiP (Binding immunoglobulin Protein)**. En se fixant sur les senseurs, GRP78 les maintient dans un état inactif (Ma *et al.*, 2002 ; Shen *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2003). Lorsqu'un stress du RE apparaît, GRP78, en libérant les senseurs, permet l'activation de l'UPR. GRP78 est également connu pour se lier au translocon (qui est le canal de fuite majoritaire du RE), au niveau des sous-unités Sec61, et ainsi en bloquer le pore (Haigh et Jonhson, 2002 ; Alder *et al.*, 2005). De plus, il a été montré une surexpression de GRP78 dans les cellules tumorales, qui agirait en faveur de la survie cellulaire et de la

progression tumorale et apporterait une résistance à la chimiothérapie (pour revue, Li et Lee, 2006).

Quand tous les efforts mis en œuvre pour prendre en charge l'excès de protéines dans le RE ont échoué, la réponse UPR conduit alors, à l'apoptose de la cellule. Trois mécanismes sont impliqués. Le premier implique les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax qui subissent un changement de conformation lors d'un stress du RE entraînant un efflux de calcium dans le cytosol. Ce calcium va activer la m-calpaïne qui à son tour clive et active la procaspase 12 conduisant à l'apoptose. La seconde voie apoptotique implique la protéine CHOP qui inhibe BCL-2. Finalement, IRE-1 en formant un complexe hétérotrimérique avec TRAF-2 et ASK-1, active JNK et la mort cellulaire (Figure 9).

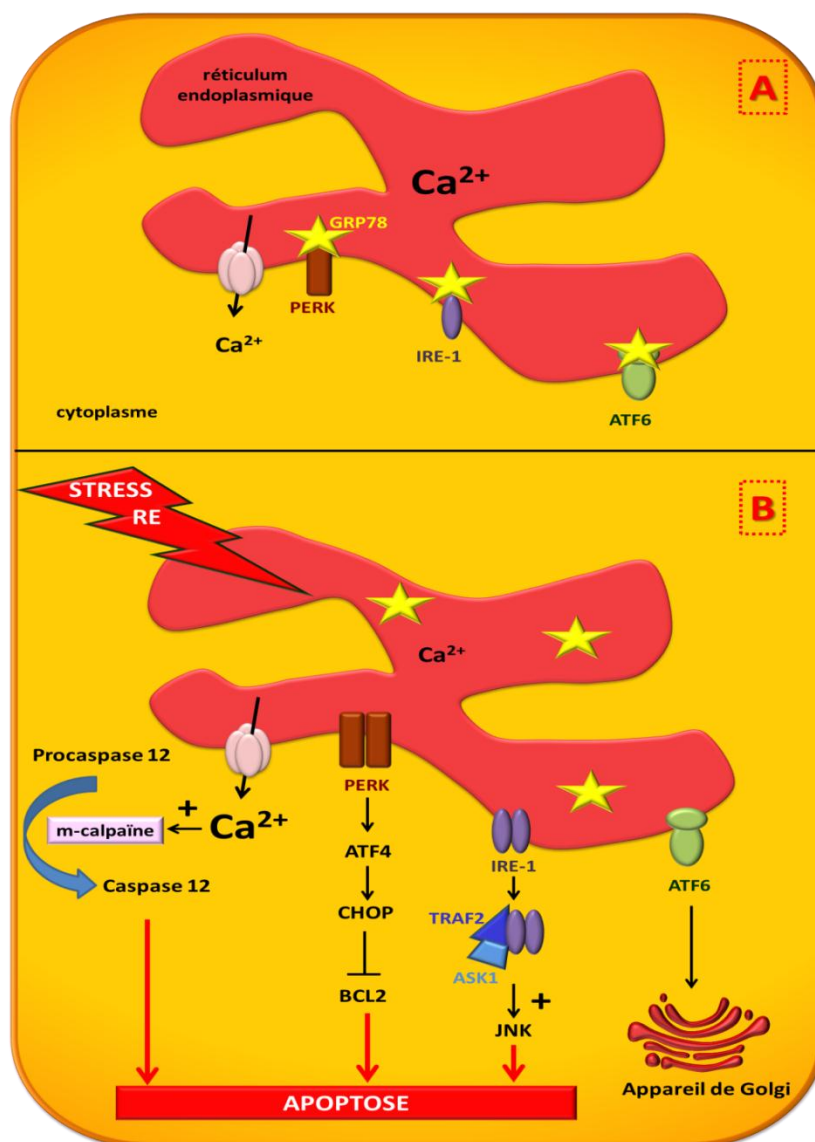


Figure 9 : Mécanismes des événements menant à l'apoptose suite à un stress réticulaire et à la réponse UPR. A) Condition normale. B) Condition de stress réticulaire.

Les travaux du laboratoire ont mis en évidence que l'apoptose des cellules prostatiques métastatiques LNCaP androgéno-dépendantes pouvait être induite par la seule vidange des stocks intracellulaires sans nécessiter l'activation des canaux SOC ni l'augmentation du taux de calcium cytoplasmique (Mariat *et al.*, 2000; Skryma *et al.*, 2000). D'autres travaux ont montré que dans les cellules LNCaP transfectées avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et qui, de par ce fait, ont un phénotype androgéno-indépendant, la capacité d'induction de l'apoptose par la vidange réticulaire endoplasmique était diminuée (Vanden Abeele *et al.*, 2002). Ce phénomène est expliqué par la diminution de la quantité des stocks calciques réticulaires mobilisables dans les cellules surexprimant Bcl-2. Ainsi, la vidange de calcium réticulaire dans ces cellules reste d'amplitude inférieure au seuil de déclenchement de l'apoptose.

Comme nous l'avons vu précédemment, les canaux SOC sont inhibés dans les cas de cancers avancés, ce qui se traduit par une diminution de la quantité de calcium présent dans le réticulum endoplasmique. Or, de plus en plus d'études montrent que des agents chimiothérapeutiques pourraient aussi impliquer un stress calcique réticulaire et ainsi libérer directement ou indirectement le calcium contenu dans le RE (pour revue : Boelens *et al.*, 2007) ; la diminution du taux de calcium réticulaire dans les cas de cancers avancés pourrait donc expliquer la résistance à l'apoptose induite par les chimiothérapies qui apparaît avec le temps.

Cependant, les mécanismes de résistance à l'apoptose induite par un stress calcique réticulaire de même que les canaux calciques du RE impliqué dans la modulation de l'homéostasie calcique lors d'un stress réticulaire ne sont pas encore bien connus.

4 - Calcium et migration :

Il a été montré que des influx de calcium sont nécessaires à la migration de nombreux types cellulaires (Komuro et Rakic, 1993 ; Lee *et al.*, 2000 ; Marks et Maxfield, 1990 ; Nishiyama *et al.*, 2003 ; Yang et Huang, 2005). La motilité cellulaire est un aspect important de l'invasion tumorale et de la migration ; invasion et migration constituant une étape critique dans la formation des métastases. La migration cellulaire est un processus complexe

comportant de multiples étapes, impliquant notamment la formation de structures adhésives organisées (adhésions focales, contenant des récepteurs aux intégrines liés à l'extrémité de fibres d'actine (Schoenwaelder et Berridge, 1999; Carragher et Frame, 2004)) (Figure 10) et de protrusions membranaires (lamellipodes/invadopodes), ainsi qu'une régulation fine entre adhésion et détachements (Ridley *et al.*, 2003). Une façon simple de détacher des cellules adhérentes en culture est de diminuer la concentration en calcium extracellulaire. Les cadhérines sont très importantes pour l'adhésion cellulaire, et couplées au caténines, à la vinculine et à l'actine, pour le développement et la morphologie cellulaire (Bamji, 2005). La partie extracellulaire des cadhérines lie 3 ions calcium ; la libération de ce calcium modifie la structure de la protéine et l'expose aux protéases. Comme les cadhérines, les intégrines peuvent également lier des ions calciques extracellulaires (sur les sous-unités α). Du côté intracellulaire, la paxilline et l' α -actinine régule la FAK (Focal Adhesion Kinase), une tyrosine kinase jouant un rôle central dans la migration cellulaire (Mitra *et al.*, 2005). Elle a été montrée pour coordonner la formation des lamellipodes/invadopodes et le turnover des adhésions focales (Webb *et al.*, 2004; Tilghman *et al.*, 2005), et son activité a été montrée pour être dépendante du calcium.

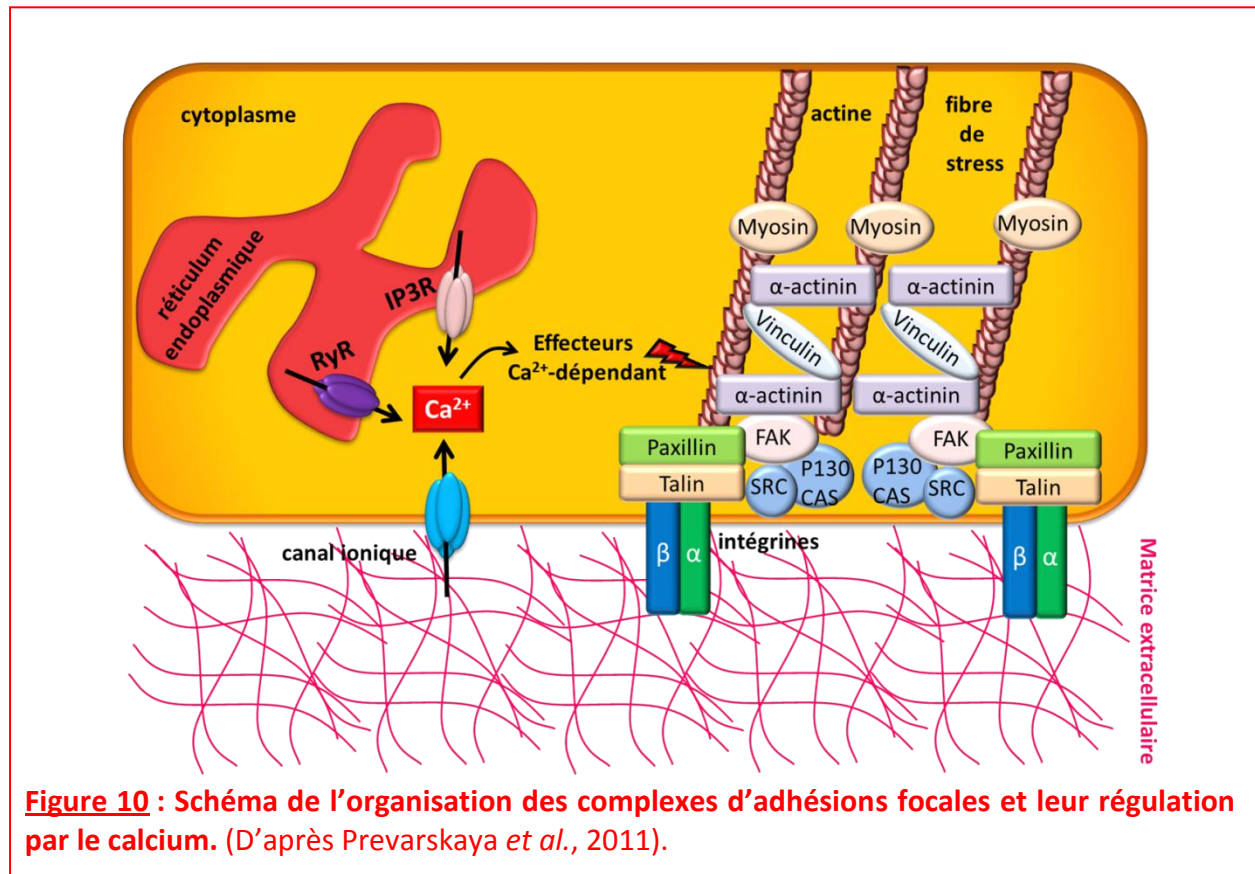


Figure 10 : Schéma de l'organisation des complexes d'adhésions focales et leur régulation par le calcium. (D'après Prevarskaya *et al.*, 2011).

Une augmentation de l'expression de FAK a été détectée dans les tumeurs métastatiques du sein, de la prostate, du colon et du cerveau (Owens *et al.*, 1995; Cance *et al.*, 2000; Gabarra-Niecko *et al.*, 2003; Lark *et al.*, 2005). Des études montrent que la FAK est impliquée dans la migration et l'invasion des cellules prostatiques cancéreuses et de cancer du sein (Johnson *et al.*, 2008 ; Mitra *et al.*, 2005 ; El Haibi *et al.*, 2010 ; Chan *et al.*, 2009).

La signalisation calcique intracellulaire est connue pour être impliquée dans l'invasion tumorale (Amuthan *et al.*, 2002 ; Prevarskaya *et al.*, 2011) ; il a été montré que des influx de calcium sont nécessaires à la migration de nombreux types cellulaires incluant les cellules tumorales (Komuro et Rakic, 1993 ; Lee *et al.*, 2000 ; Marks et Maxfield, 1990 ; Nishiyama *et al.*, 2003 ; Yang et Huang, 2005). Des études de notre laboratoire ont pu mettre en évidence l'implication du canal calcique TRPV2 dans la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Monet *et al.*, 2009 ; Monet *et al.*, 2010). Dans le cancer du sein, il a été mis en évidence le rôle des protéines Orai1 et STIM1 dans les métastases et la migration des cellules tumorales (Yang *et al.*, 2009). Le calcium extracellulaire est quant à lui associé avec les métastases osseuses notamment dans le cancer de la prostate (Liao *et al.*, 2006) et le cancer du sein (Saidak *et al.*, 2009).

5 - Les canaux TRP et le cancer :

Plusieurs travaux récents ont montré que les changements de l'expression des canaux calciques de type TRP jouaient un rôle important dans de nombreuses maladies (Kiselyov *et al.*, 2007) telles que les cancers.

Dans le mélanome : L'expression du gène *trpm1* est inversement corrélée avec l'agressivité des cellules malignes de mélanome, ce qui pourraient refléter les capacités de TRPM1 à agir comme un gène suppresseur des tumeurs (Duncan *et al.*, 1998 ; Fang et Setaluri, 2000). Récemment, il a été montré que cette diminution d'expression est due à la régulation transcriptionnelle par le MITF, facteur essentiel dans la transcription de mélanocyte (Zhiqi *et al.*, 2004).

Dans le cancer de la prostate : Le gène *trpm8* n'est pas exprimé dans la prostate saine et hyperplasique mais serait exclusivement transcrit dans la prostate cancéreuse (Tsavaler *et al.*, 2001). De plus, il semblerait que sa spécificité d'expression soit identique à celle du Prostate Specific Antigen (PSA) (Fuessel *et al.*, 2003). Le canal TRPM8 est à peine discernable dans le tissu sain prostatique (Tsavaler *et al.*, 2001). Une autre étude (Henshall *et al.*, 2003) montre une augmentation importante de l'expression de *trpm8* dans les cancers prostatiques androgéno-dépendants, en revanche, l'expression de *trpm8* est perdue dans les cancers prostatiques avancés androgéno-indépendants.

Le canal **TRPV6** est fortement exprimé dans des stades avancés du cancer de la prostate avec peu ou pas d'expression dans le tissu sain et bénin (Bodding, Fecher-Trost, et Flockerzi, 2003; Bodding, Wissenbach, et Flockerzi, 2002; Fixemer *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2001). De plus, une étroite corrélation entre une surexpression de l'ARNm des canaux de type TRPV6 et le degré de malignité des tumeurs a été démontrée (Wissenbach *et al.*, 2004; Wissenbach *et al.*, 2001). Dans un modèle de cellules prostatiques cancéreuses androgéno-dépendantes, les cellules LNCaP, nous avons montré au laboratoire que ce canal est directement impliqué dans la prolifération des cellules LNCaP. En effet, nous avons mis en évidence que l'extinction de l'expression de la protéine TRPV6 inhibe la croissance des cellules LNCaP en diminuant le taux de prolifération, le nombre de cellules en phase S et l'expression de la protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Nos résultats montrent également que l'entrée de calcium induite par le canal TRPV6 contribue à l'activation du facteur de transcription NFAT (connu pour induire l'expression de protéines impliquées dans la prolifération). Les traitements visant à diminuer l'expression de la protéine TRPV6 augmente également l'entrée en apoptose des cellules LNCaP. Ces résultats suggèrent que l'expression du canal TRPV6 dans les cellules cancéreuses prostatiques représente un mécanisme permettant de maintenir un haut taux de prolifération, mais également d'augmenter la survie cellulaire et la résistance à l'apoptose (Lehen'kyi *et al.*, 2007).

Le canal **TRPV2** est exprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques les plus agressives, et son expression est augmentée par des traitements inducteurs de la différenciation neuroendocrine. Précisément, TRPV2 est exprimé dans plusieurs lignées androgéno-indépendantes (PC-3, DU 145) et androgéno-résistante (LNCaP C4-2). De plus, l'expression de l'ARNm de TRPV2 est multipliée par 12 chez les patients présentant un

cancer métastatique (stade M1) par rapport à ceux atteints de tumeurs solides (stades T2a et T2b). Nous avons montré au laboratoire que l'inhibition de l'expression de ce canal diminue très fortement la migration des cellules prostatiques cancéreuses, alors que sa surexpression augmente la migration. Par son activité constitutive, TRPV2 maintient un niveau de calcium cytosolique élevé, ce qui lui permet de jouer un rôle dans l'invasion ; son activité permettant de réguler directement les marqueurs d'invasion MMP2, MMP9 et cathepsine B.

Dans le cancer de vessie : Une étude a mis en évidence une perte d'expression de **TRPV1** à mesure que le stade du cancer augmente et que la différenciation cellulaire diminue (Lazzeri, Vannucchi *et al.* 2005). Une équipe a étudié l'expression de **TRPV2** dans le cancer de la vessie et a montré une augmentation progressive de la forme complète de TRPV2 (hTRPV2) en corrélation avec le grade et le stade du cancer (Caprodossi, Lucciarini *et al.* 2007). Elle met également en évidence une forme non connue de TRPV2 : s-TRPV2 (short splice variant) qui est une forme tronquée du canal dans laquelle manque les 5^{ème} et 6^{ème} domaines transmembranaires entre lesquels se situe le pore. Ce variant pourrait avoir une fonction régulatrice négative sur TRPV2, comme il a été démontré pour la forme tronquée du canal TRPV1 (Wang *et al.* 2004). Au cours de l'évolution du cancer de la vessie, une diminution progressive de s-TRPV2 est observée avec une perte complète d'expression dans les stades les plus avancés (Caprodossi, Lucciarini *et al.* 2007). TRPV2 semble donc impliqué dans l'évolution du cancer de la vessie vers les stades plus agressifs ; cependant, une équipe a récemment montré que l'activation de ce canal par des agonistes et l'entrée de calcium en résultant induirait l'apoptose des cellules urothéliales cancéreuses (Yamada *et al.*, 2010), les auteurs suggèrent ainsi que l'activation de TRPV2 pourrait apporter une stratégie thérapeutique potentielle contre les tumeurs urothéliales.

IV - Vitamine D et Adrénomédulline :

A - La vitamine D :

La vitamine D joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie phospho-calcique, et est essentielle au développement et au maintien de la minéralisation osseuse. Sa carence a des conséquences biologiques et cliniques pouvant aboutir à des signes de rachitisme chez l'enfant et d'ostéomalacie chez l'adulte, avec troubles du métabolisme phospho-calcique, déformations osseuses, et hypotonie musculaire. En plus des fonctions déjà citées, la 1,25-dihydroxyvitamine D, forme active de la vitamine D est maintenant considérée comme étant un régulateur physiologique de la prolifération-différenciation de nombreux types cellulaires, et comme un modulateur des défenses immunitaires de l'organisme. La vitamine D apparaît ainsi de plus en plus comme un des facteurs environnementaux influençant le risque de survenue de certains cancers et de certaines maladies auto-immunes notamment le diabète de type I.

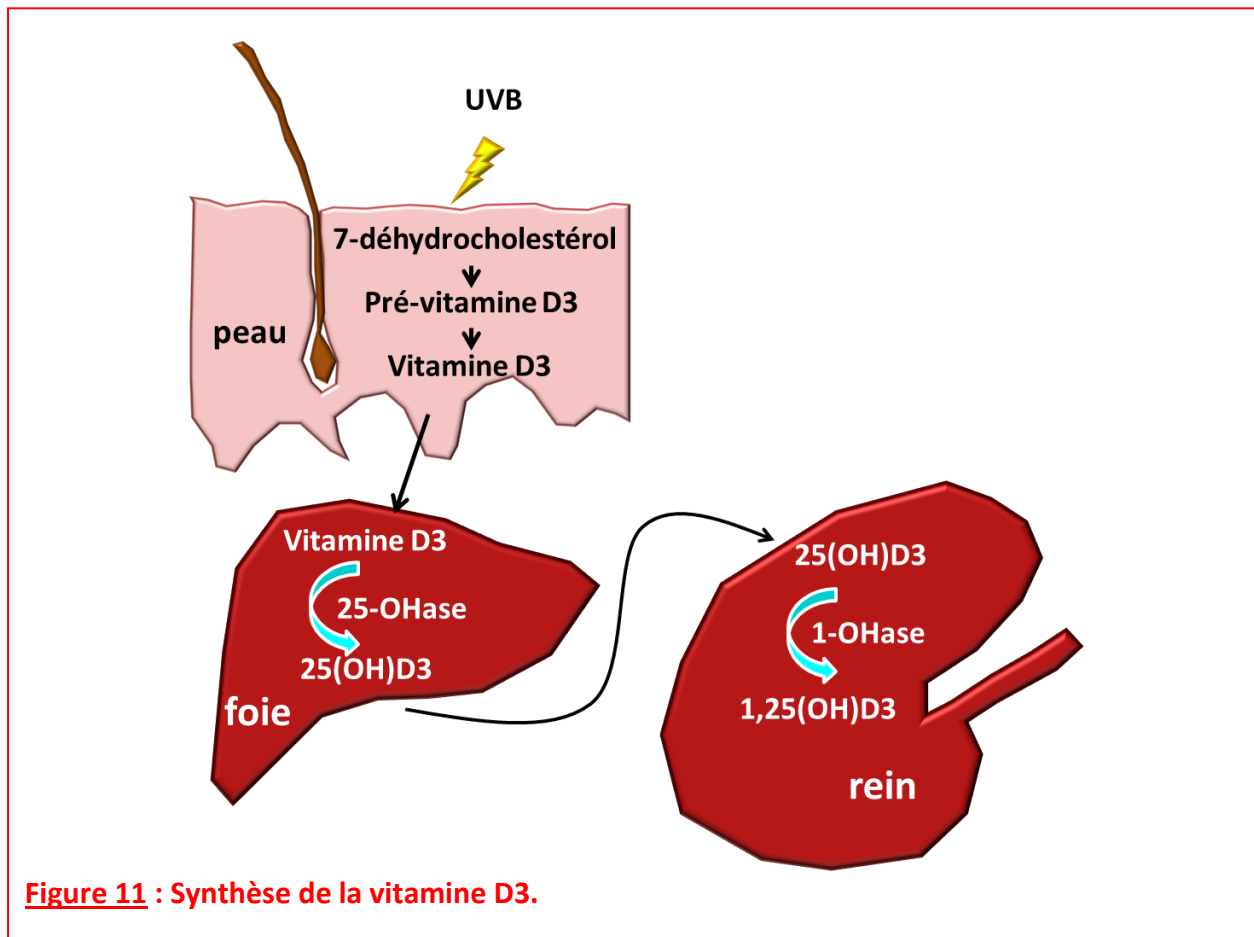
1 - Synthèse et mécanisme d'action :

Il existe 2 formes de vitamine D : **la vitamine D2** ou ergocalciférol et **la vitamine D3** ou cholécalciférol.

La **vitamine D2** est d'origine fongique. Elle est produite grâce à l'irradiation par les rayons ultraviolets d'un précurseur, l'**ergostérol**, présent dans les levures. On peut la retrouver dans le corps humain par le biais de l'alimentation ou d'une supplémentation médicamenteuse.

La **vitamine D3**, encore appelée **cholécalciférol** est la vitamine D d'origine animale. Elle est synthétisée dans l'épiderme à partir d'un précurseur, le **7-déhydrocholesterol** ou **pro-vitamine D3**, sous l'influence de rayons ultraviolets de basse longueur d'onde, des UVB de 290 à 315 nm. Les UVB transforment le 7-déhydrocholesterol en pro-vitamine D3, laquelle est ensuite transformée passivement en vitamine D3, sous l'influence de la chaleur (Fraser, 1995).

Une fois l'une ou l'autre de ces deux formes de vitamine D présentes dans l'organisme, par le biais de l'alimentation ou d'une synthèse dans l'épiderme, elles sont soit stockées dans les cellules graisseuses, soit relarguées dans la circulation sanguine, liées à une protéine appelée Vitamin D Binding Protein (Holick, 2007 ; Souberbielle, 2008). Cette protéine est captée par le foie, où la vitamine D est hydroxylée pour former la **25-hydroxyvitamine D** ou **calcifédiol [25(OH)D]**. La 25(OH)D entre ensuite dans les cellules du tubule proximal rénal, où elle est hydroxylée formant ainsi le métabolite actif de la vitamine D qui est la **1,25-dihydroxyvitamine D** ou **calcitriol [1,25(OH)₂D]**. Cette molécule a toutes les qualités d'une hormone stéroïde, c'est pourquoi il conviendrait mieux de la nommer « hormone D » (Souberbielle, 2008) (Figure 11).



La 1,25(OH)₂D agit via un récepteur cytosolique, le **VDR** (Vitamin D Receptor), présent dans de nombreux tissus (Holick, 2007). Une fois dans la cellule, la 1,25(OH)₂D se lie au VDR et le complexe VDR-1,25(OH)₂D est dirigé vers le noyau où il s'associe au **récepteur de l'acide rétinoïque** (RXR). Le complexe RXR-VDR-1,25(OH)₂D se lie à l'ADN en des sites

appelés « éléments de réponse à la vitamine D » (VDRE), proches de gènes dont l'expression est ainsi, soit activée, soit réprimée (Holick, 2007).

A ce jour, le VDR a été retrouvé dans plus de 35 tissus différents, à savoir, outre les classiques organes du métabolisme osseux : le tissu cérébral, le tissu mammaire, les intestins, les cellules β du pancréas, la peau, la prostate, le placenta ou les cellules endothéliales. Tous ces organes ont montré leur capacité à produire leur propre $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, qui n'est pas détectable dans la circulation sanguine mais qui a bel et bien des effets cliniques.

2 - Fonctions de la vitamine D₃ :

Le rôle principal de la vitamine D est de maintenir l'homéostasie phospho-calcique.

Au niveau intestinal : la $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ stimule l'absorption du calcium (Bouillon *et al.*, 2003) en induisant la synthèse d'un canal calcique, le canal TRPV6, au sommet des cellules de la bordure en brosse (Holick, 2007), et d'une protéine transporteuse du calcium à l'intérieur de l'entérocyte. De plus, une absorption passive a également lieu, par transport para-cellulaire. En parallèle, la $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ stimule l'absorption des phosphates inorganiques au niveau du jéjunum (Rizzoli *et al.*, 1977).

Au niveau rénal : le principal effet de la $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ est un rétro-contrôle négatif sur sa propre synthèse avec une inhibition de son hydroxylation. Elle augmente également la réabsorption du calcium en augmentant l'expression des calbindin-D28k, protéines de transport du calcium mais aussi et surtout celle du canal calcique TRPV5 (Yamauchi *et al.*, 2005).

Au niveau osseux : la $1,25-(\text{OH})_2\text{D}$ augmente les concentrations extracellulaires de calcium et phosphates, favorisant ainsi la minéralisation des matrices osseuse et cartilagineuse. Elle a une activité locale sur les cellules responsables de la croissance et du

renouvellement osseux en participant à la différenciation et la minéralisation des ostéoblastes. Associée à d'autres facteurs tels que la PTH (hormone parathyroïde), elle stimule la fusion/différenciation des préostéoclastes en ostéoclastes (Bouillon *et al.*, 1995). La stimulation des ostéoclastes permet la libération des minéraux contenus dans la matrice osseuse et ainsi déplacent le calcium et le phosphore contenu dans l'os vers la circulation sanguine augmentant la phospho-calcémie (Holick, 2007).

Sur les glandes parathyroïdiennes : la 1,25-(OH)₂D exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant la synthèse et la sécrétion de PTH. Elle exerce également un rétrocontrôle sur la croissance des cellules parathyroïdes (Cantley, 1985).

3 - Vitamine D₃ et cancer : cancer de la prostate :

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent que la vitamine D pourrait jouer un rôle dans la prévalence géographique de certaines formes de cancer. En effet, il a été observé que la prévalence de certains cancers (côlon, sein, ovaires, oesophage, prostate) est plus importante dans les zones de latitude géographique élevée (Schwartz, 1990). Aux Etats-Unis, le taux de mortalité dû au cancer de la prostate est en relation inverse avec le degré d'exposition régional au rayonnement UV (Grant, 2002). Le risque de développer une insuffisance en vitamine D est plus élevé dans les régions de haute latitude, probablement en raison d'une exposition moindre au rayonnement solaire UV (Holick, 2003).

Dans les **cellules prostatiques non cancéreuses**, la 1 α -hydroxylase est exprimée, permettant la conversion de la 25(OH)D en 1,25(OH)₂D et son accumulation intracellulaire. Dans le tissu prostatique normal, la **1,25(OH)₂D inhibe la prolifération cellulaire et favorise la différenciation** (Schwartz *et al.*, 1998 ; Barreto *et al.*, 2000). Les **cellules prostatiques cancéreuses** expriment le récepteur de la vitamine D et peuvent donc lier la 1,25(OH)₂D. L'exposition de ces cellules à la **1,25(OH)₂D inhibe la prolifération, la capacité invasive et**

celle de générer des métastases, observations faites *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de souris présentant les caractéristiques du carcinome prostatique humain. Toutefois, certaines cellules cancéreuses prostatiques mises en culture résistent à l'action antiproliférative de la 1,25(OH)₂D, ce qui suggère qu'une **résistance à l'action de la 1,25(OH)₂D pourrait survenir avec la progression du cancer de la prostate** (Miller, 1998 ; Peehl et Feldman, 2003).

Ces observations ont conduit à considérer **dans un premier temps** que la 1,25(OH)₂D pourrait être utilisée dans le traitement du cancer de la prostate. Mais les concentrations requises pour inhiber la prolifération de cellules cancéreuses entraînent des hypercalcémies rendant impossible cette approche thérapeutique (Peehl *et al*, 2003). **Une deuxième stratégie** a été de développer des analogues de la 1,25(OH)₂D dépourvus d'activité hypercalcémiant, mais conservant une capacité antiproliférative. Jusqu'à présent, cette approche n'a pas débouché sur le développement d'un médicament efficace et dépourvu d'effets secondaires majeurs. **Une troisième voie** a exploré la possibilité d'utiliser la 25(OH)D à des doses non hypercalcémiantes en tablant sur une activité 1 α -hydroxylasique dans les cellules prostatiques cancéreuses suffisante pour augmenter localement la 1,25(OH)₂D à des concentrations assez élevées pour inhiber la prolifération cellulaire ; et **enfin** une dernière stratégie consiste à associer la 1,25(OH)₂D à des agents chimio-thérapeutiques, et semble donner des résultats positifs. (Pour revue : Schartz, 2009).

B - L'adrénomédulline :

L'adrénomédulline (AM) est un peptide vasodilatateur découvert dans les phéochromocytomes, par Kitamura *et al.* (Kitamura *et al.*, 1993). L'ARNm s'exprime non seulement dans les glandes surrénales, mais aussi dans de nombreux organes, comme le coeur, le rein ou les vaisseaux sanguins (Sakata *et al.*, 1993). De plus, il a été montré que des concentrations significatives d'AM existent dans le plasma circulant humain (Kitamura *et al.*, 1994). Les taux plasmatiques d'AM sont élevés dans diverses pathologies comme l'hypertension artérielle, l'infarctus aigu du myocarde, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance rénale, le diabète, mais aussi les chocs septiques et certaines pathologies cancéreuses (Bell *et al.*, 2010 ; Niu *et al.*, 2004 ; Zudaire *et al.*, 2003) .

1 - Synthèse :

L'AM est un peptide de 52 acides aminés avec un pont disulfure entre les résidus cystéine 16 et 21, qui forme un anneau de 6 résidus d'acides aminés et une tyrosine amidée en position C-terminale (CONH₂) dont dépend son activité biologique (Kitamura *et al.*, 1993). Le fragment (22-52) de l'AM qui ne possède pas de boucle intramoléculaire peut se lier aux récepteurs de l'AM et inhiber de façon compétitive les effets de l'AM (Gumusel *et al.*, 1998).

Le précurseur de l'AM humaine (prépro-adrénomédulline), constitué de 185 acides aminés (Kitamura *et al.*, 1993b), génère un peptide de 164 acides aminés (pro-adrénomédulline) par scission du peptide signal. Après clivage par des endoprotéases, deux peptides vasoactifs sont libérés : le « N-terminal pro-adrenomedullin 20 peptide » ou PAMP dans la portion Nterminale et l'AM mature qui correspond à 52 acides aminés. La composition en acides aminés de l'AM est hautement conservée entre les espèces : l'adrénomédulline de rat, constituée de 50 acides aminés, ne diffère de la forme humaine que par 6 acides aminés. Comme observée pour l'AM, la composition en acides aminés du PAMP est hautement conservée entre les espèces (Sakata *et al.*, 1993). Ces deux peptides, qui présentent un résidu glycine en position C-terminale, sont amidés sous l'action de la PAM (peptidyl-glycine α -amidating monooxygenase) (Ishimitsu *et al.*, 1994) (figure 11).

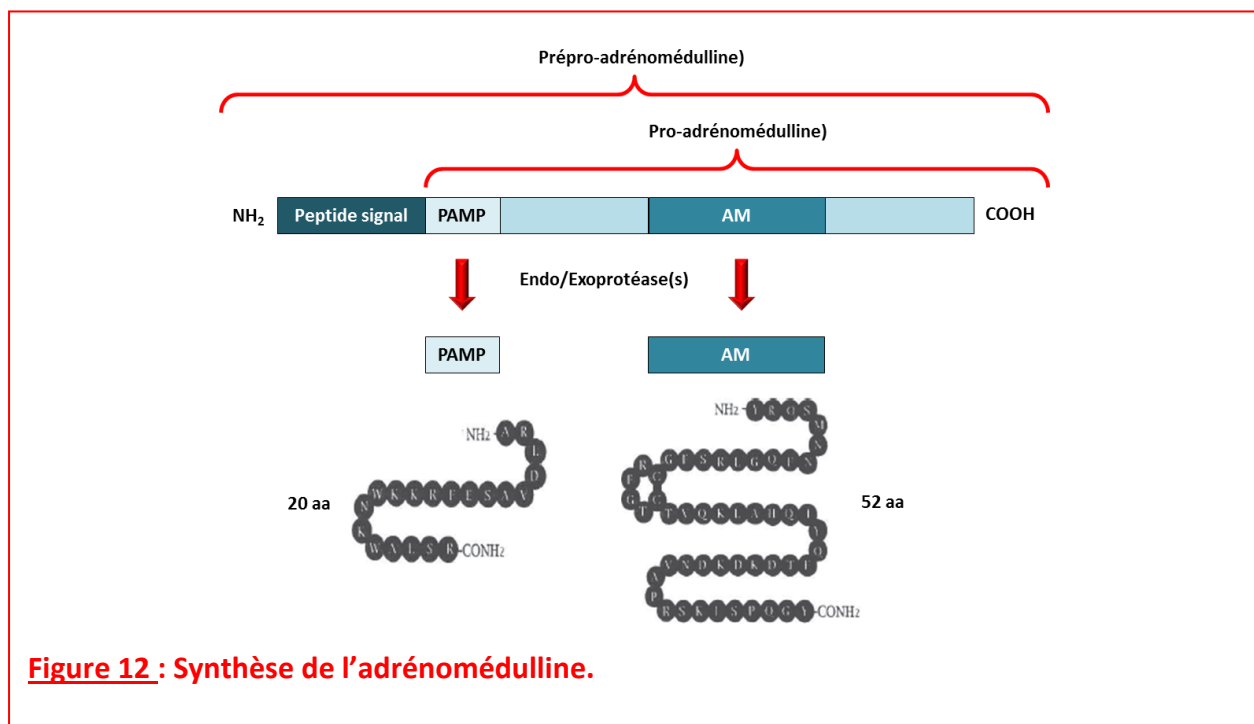


Figure 12 : Synthèse de l'adrénomédulline.

2 - Récepteurs de l'adrénomédulline :

Les récepteurs de l'AM sont des complexes multiprotéiques composés de deux éléments (McLatchie *et al.*, 1998), le **CLR (Calcitonin receptor Like Receptor)** et des molécules associées appelées **RAMP (Receptor Activity-Modifying Protein)**.

Le CLR est un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G (RCPG) identifié en 1993 (Njuki *et al.*, 1993). Il fut nommé ainsi à cause de sa similitude avec le récepteur de la calcitonine.

Pendant quelques années, une certaine confusion a régné quant à la nature exacte du récepteur de l'AM du fait de l'homologie de l'AM avec le CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) et son appartenance à la famille des peptides Calcitonine / CGRP / Amyline. En 1998, McLatchie *et al.* ont démontré que le récepteur CLR peut générer deux récepteurs pharmacologiquement distincts par association à une famille de protéines, de 160 acides aminés (14-21 kDa), à un seul domaine transmembranaire, nommées RAMP (McLatchie *et al.*, 1998). Le CLR n'est correctement mature qu'à l'état de dimères avec les RAMP.

Les protéines RAMP : il en existe trois isoformes : **RAMP1, 2 et 3**. Les protéines RAMP sont constituées d'un seul domaine transmembranaire, d'une extrémité N-terminale extracellulaire relativement longue jouant un rôle important dans la spécialisation et la fonctionnalité du récepteur (CGRP ou AM) (Kuwasako *et al.*, 2001). La protéine RAMP1 est caractérisée par l'absence de sites de N-glycosylation. Les protéines RAMP2 et RAMP3 présentent des sites de N-glycosylation dont le nombre est variable en fonction de l'espèce (Sexton *et al.*, 2001). Certains acides aminés pourraient participer à la formation de la « poche de liaison » de l'AM (Kuwasako *et al.*, 2001) : ainsi ce domaine, les acides aminés 86-92 de hRAMP2 et 59-65 de hRAMP3, sont essentiels à la liaison du ligand et à la fonctionnalité du récepteur. L'extrémité C-terminale cytoplasmique est courte. Le rôle fondamental des protéines RAMP est de définir la spécificité du ligand qui interagit directement à la surface cellulaire. La spécialisation du récepteur pour chacun des neuropeptides (CGRP, AM, amyline) a été démontrée par des expériences de transfection à

l'aide de constructions chimères (Bühlmann *et al.*, 1999). **RAMP1 associée au CLR forme le récepteur du CGRP**, tandis que l'association avec RAMP 2 ou 3 donne les récepteurs de l'AM. (McLatchie *et al.*, 1998 ; Bühlmann *et al.*, 1999; Sexton *et al.*, 2001) (Figure 12).

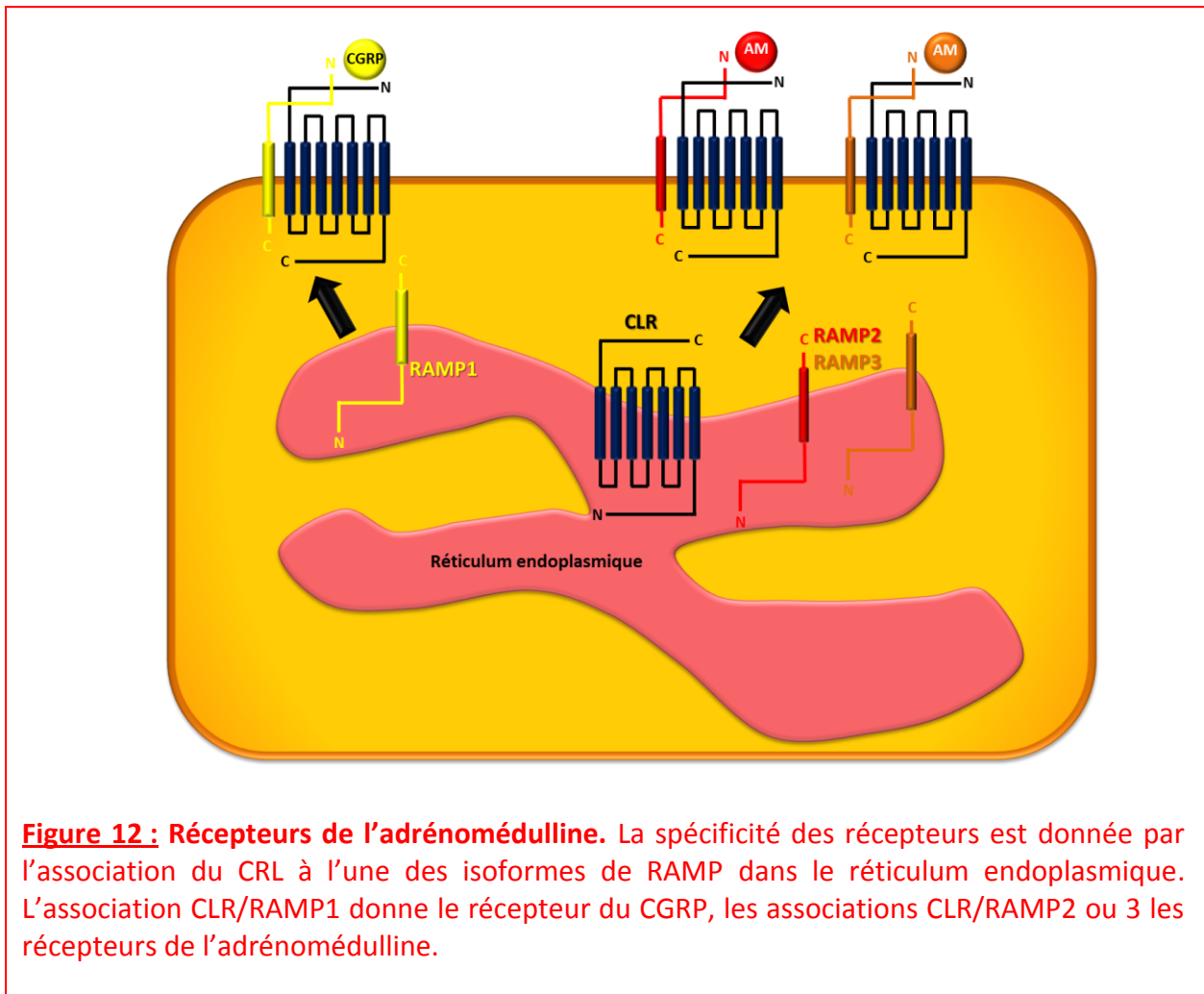


Figure 12 : Récepteurs de l'adrénomédulline. La spécificité des récepteurs est donnée par l'association du CLR à l'une des isoformes de RAMP dans le réticulum endoplasmique. L'association CLR/RAMP1 donne le récepteur du CGRP, les associations CLR/RAMP2 ou 3 les récepteurs de l'adrénomédulline.

3 - Fonctions de l'adrénomédulline et mécanismes d'action :

Décrite initialement comme un peptide vasodilatateur, les études des actions biologiques de l'AM ont largement été focalisées tout d'abord sur le système cardiovasculaire où elle s'est avérée être un peptide vasorelaxant efficace et durable (Kitamura *et al.*, 1993 ; Lainchbury *et al.*, 1997 ; Meeran *et al.*, 1997 ; Eto *et al.*, 1999). Le **tableau 4** présente une liste (non exhaustive) des différentes fonctions physiologiques de l'adrénomédulline.

Tissu/type cellulaire	Fonction
Plaquettes	Élévation de l'AMPc
Réseau vasculaire	Vasodilatation et hypotension Stimulation de la synthèse d'oxyde nitrique
Cœur	Effet inotropique Vasodilatation de l'artère coronaire
Rein	Augmentation de l'écoulement rénal de sang Diurèse et natriurèse Augmentation de la synthèse d'oxyde nitrique
Glandes surrénales	Inhibition de la sécrétion d'aldostérone Inhibition de la synthèse de cortisol
Hypophyse	Inhibition de la sécrétion d'ACTH
Système nerveux central	Inhibition de la consommation sodique Inhibition de la consommation hydrique

Tableau 4 : Fonctions physiologiques de l'adrénomédulline (liste non exhaustive). (D'après Nishikimi *et al.*, 2005)

L'AM, *via* ses récepteurs, peut activer de nombreuses voies de signalisation (Figure 13) impliquant dans la vasodilatation, la migration, la croissance cellulaire, ainsi que dans la progression tumorale (Nikitenko *et al.*, 2006).

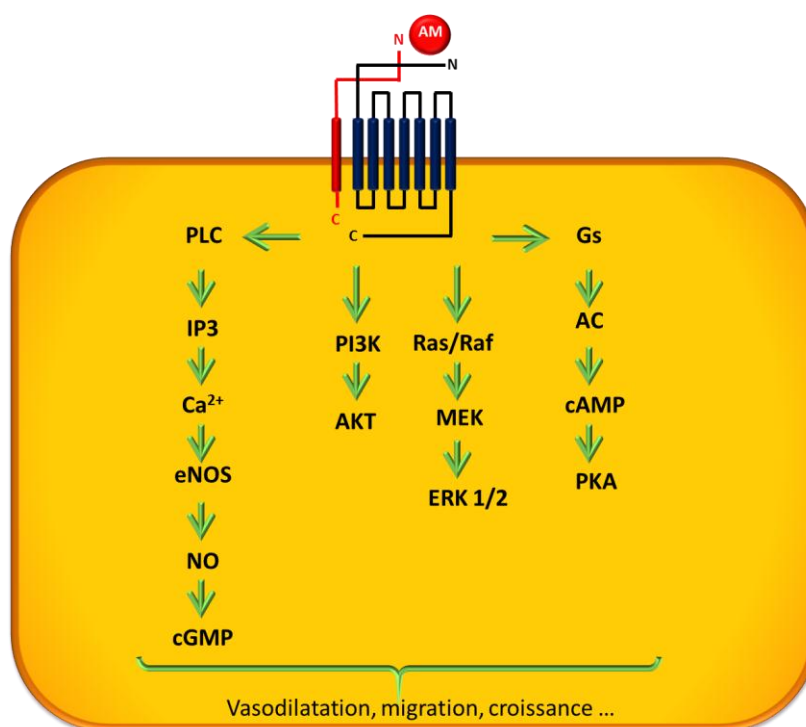


Figure 13 : Exemples de voies de signalisation activées par l'adrénomédulline.

4 - Adrénomédulline et cancer :

Depuis la mise en évidence de l'AM au sein d'une tumeur de la médullo-surrénale humaine (Kitamura *et al.*, 1993), plusieurs études ont montré l'expression de l'AM dans une variété de tumeurs et lignées cellulaires tumorales et ont décrit l'AM comme un maillon important dans la carcinogenèse et la progression tumorale dans divers cancer et notamment le cancer de la prostate (Rocchi *et al.*, 2001 ; Ouafik *et al.*, 2002 ; Ishikawa *et al.*, 2003 ; Nikitenko *et al.*, 2006 ; Miseki *et al.*, 2006) ; cependant à ce jour, **rien n'est connu à propos de l'adrénomédulline dans le cancer de la vessie.**

Dans le cas de la prostate, les deux lignées androgéno-indépendantes PC-3 et DU 145 produisent et sécrètent l'AM contrairement à la lignée androgéno-dépendante LNCaP. L'AM induit la prolifération de la lignée DU 145 *in vitro*, suggérant l'existence d'une boucle de régulation autocrine qui pourrait potentialiser la croissance néoplasique. L'analyse de l'AM par PCR quantitative dans le modèle de xénogreffe LuCaP 23.1 montre une expression plus importante de l'ARNm dans les stades androgéno-indépendants. Dans les tumeurs humaines, une nette distinction entre les pathologies bénignes et tumorales sont remarquées (Rocchi *et al.*, 2001). L'expression de l'AM par PCR quantitative dans ces tissus n'est détectée que dans les pathologies tumorales et semble corrélée au score de Gleason. **L'AM semble être impliquée dans le développement de l'androgéno-indépendance du cancer de la prostate.**

La différenciation de type neuroendocrine du cancer de la prostate est associé à un statut androgéno-indépendant ; cette différenciation pourrait être médiée par une voie de signalisation impliquant l'AM. Il a en effet été rapporté que la castration pouvait induire l'expression de l'AM *in vivo* et l'AM provoquer la différenciation neuroendocrine. Le traitement des cellules LNCaP avec soit des anticorps bloquants dirigés contre les récepteurs de l'AM ou contre l'AM prévient l'acquisition du phénotype neuroendocrine (Berenguer *et al.*, 2008). **Ces différentes données laissent suggérer que des antagonistes de l'AM pourraient être utiles chez les patients commençant un traitement de castration chimique pour un cancer de la prostate, en prévenant l'acquisition de l'androgéno-indépendance.**

PROBLEMATIQUE

ET

OBJECTIFS

Parmi les cancers urologiques, les cancers de prostate et de vessie sont en fréquence les 1^{er} et 2^e cancers.

Le cancer de la prostate représente la seconde cause de mortalité par cancer chez l'homme ; malgré les approches thérapeutiques (hormonales ou non), l'efficacité des traitements reste médiocre. Actuellement, les traitements des cancers de la prostate consistent à réduire au maximum le taux d'androgène circulants. Bien que les traitements soient très efficaces à court terme, ils restent inefficaces à long terme, ces cancers devenant androgéno-indépendants. La recherche de nouvelles stratégies pharmacologiques s'avère donc cruciale.

Le cancer de la vessie est en fréquence le deuxième cancer urologique après le cancer de la prostate. Ce cancer est un défi en cancérologie à la fois sur le plan diagnostique et sur le plan thérapeutique ; en effet le potentiel évolutif de ces tumeurs est aléatoire, et il reste difficile de prédire le risque de récurrence et de progression. Ainsi, de nouveaux marqueurs pronostic qui permettraient de juger de l'évolutivité d'une tumeur et de sa probabilité de récidiver seraient un apport important dans la prise en charge et la surveillance des patients.

Des études indiquent que les altérations de l'homéostasie calcique et des canaux ioniques, acteurs de cette homéostasie, jouent un rôle dans l'oncogenèse. Selon des données récentes, les canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential) sont des acteurs clés dans l'homéostasie calcique. De plus, plusieurs travaux récents ont montré que les changements d'expression de certains canaux TRP pouvaient contribuer à la cancérisation, entre autres TRPV6 et TRPV2 dans les cancers urologiques de prostate et de vessie.

Au cours de cette thèse nous nous sommes intéressés aux rôles des canaux TRPV6 et TRPV2 dans la croissance et la migration cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques et urothéliales ; mais également dans le cadre d'une thématique de collaboration au rôle de la fuite calcique du réticulum endoplasmique dans le stress réticulaire et l'apoptose des cellules prostatiques cancéreuses.

I - Le canal TRPV6 et la vitamine D3 :

Depuis plus de 20 ans maintenant, la vitamine D3 et ses métabolites font l'objet d'études quant à leurs potentiels thérapeutiques dans de nombreux cancers et notamment le cancer de la prostate. La 1,25(OH)₂D3 semble présenter des effets réels comme agent antiprolifératif contre les cellules prostatiques cancéreuses ; cependant une résistance à ce traitement apparaîtrait dans les cas les plus avancés (Peehl et Feldman, 2003). Parmi ses rôles biologiques, la vitamine D3 participe à l'absorption du calcium au niveau intestinal, et pour ce faire elle induit l'expression du canal TRPV6 qui assure à ce niveau le rôle physiologique de « capteur de Ca²⁺ » qui a mené à sa découverte (Holick, 2007). Or, des données du laboratoire démontrent que ce canal est impliqué dans la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules prostatiques cancéreuses (Lehen'kyi *et al.*, 2007), ce qui semble incompatible avec un effet anti-prolifératif de la vitamine D3.

Aux vues de ces différentes données, **le premier objectif de cette thèse a consisté en l'étude du rôle du canal TRPV6 dans l'effet de la vitamine D3 sur la croissance des cellules prostatiques cancéreuses.**

II - Le canal TRPV2 et l'adrénomédulline :

Des résultats récents, à la fois *in vitro* et *in vivo*, suggèrent que des antagonistes de l'adrénomédulline ou des anticorps contre l'adrénomédulline et/ou ses récepteurs, représenteraient une nouvelle voie en thérapie anti-cancéreuse, et notamment dans le cas du cancer de la prostate. En effet, de nombreuses données indiquent un rôle de l'adrénomédulline dans la progression tumorale vers les métastases, notamment par des effets sur l'angiogenèse et la migration cellulaire (Deville *et al.*, 2010 ; Nikitenko *et al.*, 2006). Des données du laboratoire montrent le rôle du canal TRPV2 dans la migration et le potentiel invasif des cellules prostatiques cancéreuses (Monet *et al.*, 2010). De plus, l'équipe de Caprodossi montre que l'expression de TRPV2 dans la vessie augmente en corrélation avec le grade et le stade du cancer (Caprodossi *et al.*, 2007).

Ainsi, le deuxième objectif de cette thèse a été d'étudier l'implication du canal TRPV2 dans les effets de l'adrénomédulline sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques PC-3 et urothéliales T24/83.

III - Stress réticulaire, fuite calcique et apoptose des cellules prostatiques cancéreuses :

Le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle très important dans l'homéostasie calcique et la physiopathologie cellulaire. La dérégulation des mécanismes contrôlant cette homéostasie réticulaire est associée avec l'apparition des cancers les plus avancés. Notamment, suite à l'adaptation au stress calcique réticulaire une résistance à l'apoptose se produit. Un stress réticulaire mène à l'UPR (Unfolded Protein Response), qui permet d'intégrer l'intensité de ce stress et diriger la cellule vers la survie, ou l'apoptose si le stress est trop important comme lors de chimiothérapie.

A ce jour, les mécanismes de résistance à l'apoptose induite par un stress calcique réticulaire de même que les canaux calciques du RE impliqué dans la modulation de l'homéostasie calcique lors d'un stress réticulaire ne sont pas encore bien connus. Il est donc nécessaire de comprendre ces mécanismes de façon à pouvoir moduler la capacité cellulaire d'entrer ou non en apoptose suite à un stress calcique réticulaire.

L'UPR est caractérisée par la production de protéines chaperonnes, calcium-dépendantes, dont notamment GRP78 (Glucose Regulated Protein 78) ou BiP (Binding immunoglobulin Protein). Cette protéine est également connue pour se lier au translocon, complexe protéique impliqué dans la synthèse des protéines et dans la réponse UPR, et qui a été montré pour être un canal de fuite calcique réticulaire important (Vancoppenolle *et al.*, 2004 ; Flourakis *et al.*, 2007). De plus, il est prouvé que l'expression de GRP78 augmente dans les cancers, et notamment dans le cas du cancer de la prostate, son expression est

associée avec l'androgéno-résistance des cellules tumorales ainsi qu'à la résistance à la chimiothérapie (Li et Lee, 2006).

Nous nous sommes donc intéressés à **l'étude du rôle du translocon et de GRP78 dans la modulation du stress réticulaire et de l'apoptose par la fuite calcique du RE lors de l'UPR dans les cellules prostatiques cancéreuses.**

MATERIELS
ET
METHODES

I - Culture cellulaire :

A - Lignées cellulaires :

La lignée prostatique cancéreuse androgéno-dépendantes LNCaP provient de l'ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'une lignée établie à partir d'une biopsie d'un ganglion sous-axillaire métastasé prélevé sur un homme de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes, sont caractérisé par leur androgéno-dépendance et nécessitent donc la présence d'androgènes dans leur milieu de culture. Ces cellules expriment également le PSA (prostate specific antigen).

La lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante LNCaP C4-2 fut créé par l'équipe de Leland et Chung qui cherchait à développer des lignées dérivées de LNCaP (Thalmann et al., 1994; Wu et al., 1994; Wu et al., 1998). Celles-ci ont été obtenues par co-injection chez l'animal de cellules LNCaP avec des fibroblastes d'origine osseuse. La lignée C4-2 établie in vitro est capable in vivo de métastaser au ganglion et parfois à l'os après injection soit orthotopique, soit sous-cutanée. Ces cellules sont caractérisées par leur androgéno-résistance: elles ont acquis la capacité de survivre mais prolifère faiblement en absence d'androgènes.

La lignée prostatique cancéreuse androgéno-indépendantes PC-3 provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Elle est établie à partir d'une métastase localisée au niveau des vertèbres lombaires d'un patient caucasien âgé de 62 ans présentant un adénocarcinome prostatique peu différencié. Les cellules PC-3 n'expriment ni le PSA, ni le récepteur aux androgènes (AR). Ces cellules sont capables de former chez l'animal une tumeur extrêmement agressive in vivo et qui est caractérisée par son hormonoinsensibilité. Les cellules PC-3 ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes.

La lignée cancéreuse prostatique androgéno-indépendante DU145 est également commercialisée par l'ATCC et est cultivée au laboratoire. Elle est établie à partir d'un ganglion métastatique du cerveau d'un patient de 65 ans atteint d'un cancer prostatique. Les DU145 n'expriment ni le PSA, ni le AR. Ces cellules sont caractérisées par leur hormono-

insensibilité: elles ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes.

La lignée urothéliale cancéreuse T24/83 provient de l'ECACC. Elle dérive de la lignée T24, établie à partir d'un carcinome de vessie de grade 3 chez une patiente âgée de 81 ans. Ces cellules sont hautement invasives.

B - Conditions de culture :

Les cellules cancéreuses prostatiques sont cultivées dans des flacons plastiques de 75 cm² (Falcon) dans une étuve à 37°C saturée en humidité et enrichie à 5% de CO₂. Ces cellules sont cultivées dans un milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Seromed, Strasbourg), de la L-Glutamine (2mM, Sigma, L'Isle d'Abeau, France), et, comme antibiotique, de la Kanamycine (10mg/ml). Le milieu de culture est renouvelé deux fois par semaine. Pour les cellules urothéliales cancéreuses le milieu de culture et le McCoy's 5A Glutamax[®], supplémenté en SVF à 10%.

C - Préparation du milieu déstéroïdé :

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

II - Mesure microfluorimétrique du calcium libre intracellulaire :

A - La sonde calcique Fura-2/AM :

C'est une sonde fluorescente affine pour le calcium. Elle existe sous deux formes. Une forme perméante, estérifiée : l'acétoxyméthylester de Fura-2 (Fura-2/AM). Cette forme lipophile non chargée traverse la membrane plasmique, pénètre dans la cellule où des estérases cytoplasmiques endogènes la clivent, libérant la forme chargée du Fura-2. Cette seconde forme hydrophile et anionique présente une forte affinité pour le calcium ($K_D=225$ nM).

Le Fura-2 est une sonde à double longueur d'onde d'excitation et une seule longueur d'onde d'émission. Le Fura-2 non complexé au calcium possède une excitation maximale à une longueur d'onde de 380 nm. Le Fura-2 complexé au calcium quant à lui présente un pic d'excitation à 340 nm. La sonde est alternativement excitée à 340 nm puis à 380 nm tout au long de l'expérience. La longueur d'onde d'émission est mesurée à 510 nm dans les deux cas. De ce fait, une augmentation de la fluorescence émise lors d'une excitation à 340 nm (F_{340}) accompagnée d'une diminution de la fluorescence émise lors d'une excitation à 380 nm (F_{380}) traduit une augmentation du calcium cytoplasmique. Les variations du rapport $R=F_{340}/F_{380}$ reflètent donc les variations en calcium intracellulaire et peuvent être calculées comme des mesures directes du calcium libre intracellulaire grâce à l'équation de Grynkiewicz (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

B - Charge des cellules en Fura-2/AM :

La charge des cellules en Fura-2/AM est réalisée de la manière suivante : le milieu de culture est remplacé par une solution HBSS 2 mM Ca^{2+} (Hank's Balanced Salt Solution composée de : NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 0,3 mM, KH_2PO_4 0,4 mM, Glucose 5 mM, $NaHCO_3$ 4 mM, HEPES 10 mM, $CaCl_2$ 2 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 7,3) contenant 2,5 μ M de Fura-

2/AM pendant 45 minutes à 37°C dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite rincées avec une solution HBSS afin d'éliminer toutes traces de sonde non incorporée.

C - Milieu d'enregistrement :

Il a été utilisé un milieu HBSS 0 mM Ca²⁺ obtenu par addition de 3 mM de MgCl₂ et un milieu HBSS 2mM Ca²⁺ (pH 7.3-7.4).

III - RT-PCR :

Les cellules cultivées dans des flacons de 25 cm² sont décollées par une incubation dans du PBS-EDTA (500 µM) à 4°C. Les ARN totaux sont extraits par la technique guanidium thiocyanate-phénol-chloroforme. Succinctement, cette méthode consiste à lyser les cellules dans une solution D (4 M Guanidine Thiocyanate, 30 mM disodium citrate, 30 mM β-mercaptoethanol, pH 7.0-7.5). Les acides nucléiques sont ensuite séparés des autres constituants cellulaires (lipides, protéines) par une extraction dans une solution de Phénol/Chloroforme/Isoamyl alcool. Finalement, les acides nucléiques sont précipités dans l'éthanol absolu (2 volumes) + acétate de sodium (0,1 volume). Puis, après centrifugation, ils sont lavés par de l'éthanol 75% avant d'être séchés puis repris dans de l'eau.

Après un traitement à la désoxyribonucléase I visant à détruire l'ADN génomique, 2µg d'ARN sont soumis à une transcription inverse. Les ARN sont tout d'abord incubés à 42 °C en présence d'amorces hexamériques aléatoires (Perkin Helmer) puis la réaction de transcription inverse est amorcée par l'ajout de dNTP, de l'ARN polymérase MULV (Perkin Helmer) ainsi que d'un inhibiteur de RNase (Perkin Helmer).

Les ADNc sont utilisés pour l'amplification par PCR en utilisant le kit Taq Gold (Perkin Helmer). Les produits de PCR sont analysés sous UV sur un gel d'agarose de 1,5% contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/ml). Les différentes amorces utilisées dans ce travail ainsi que les conditions d'amplification sont indiquées dans chaque article. La Q-PCR (Quantitative real-time PCR) est réalisée à l'aide du kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus

for SYBR Assay (Eurogentec, France) utilisant le système Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection.

IV - Mesure de viabilité cellulaire :

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

V - Cycle cellulaire :

Les expériences en cytométrie en flux sont effectuées sur des cellules cultivées en flacon 25 cm². Environ 1.10⁶ cellules sont fixées avec 1 ml de méthanol 70% glacée pendant 30 min. Après fixation, les cellules sont centrifugées pour éliminer le fixateur, le culot cellulaire est ensuite lavé 3 fois avec du PBS (phosphate-buffered saline) à 4 °C, puis resuspendu dans 100 µl de PBS, traité avec 100 µl de RNase A (1mg/ml, Sigma), et marqué avec de l'iodure de propidium (PI, Sigma) à la concentration final de 50 µg/ml. Les cellules marquées sont conservées à 4 °C à l'obscurité et analysées dans les 2 h. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un cytomètre en flux FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Les données sont analysées à l'aide d'un logiciel CellQuest Software pour estimer le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire (subG1 (apoptose), G0/G1, S et G2/M).

VI - Mesure de l'apoptose par la technique d'HOESCHT :

Le bisbenzimidazole (Hoescht 33342 Sigma) est un agent intercalant de l'ADN permettant la visualisation de la chromatine en microscopie à fluorescence. Pour ce faire, les cellules cultivées sur des lamelles traitées au collagène sont fixées au méthanol (-20°C) pendant 10 minutes. Elles sont ensuite rincées trois fois au PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), et incubées à l'obscurité avec la solution de Hoescht (1mg/ml), pendant 30 minutes à température ambiante. Après ces 30 minutes d'incubation, la solution de Hoescht est aspirée et les cellules sont de nouveau rincées 2 fois par du PBS 1X. Les lamelles sont alors montées sur lame (au glycergel) et conservées à l'obscurité. Les différentes morphologies des noyaux apoptotiques telles que la condensation périnucléaire de la chromatine, l'hypercondensation de la chromatine et la formation de vésicules apoptotiques, sont observées au microscope à épifluorescence Olympus BH2 à une longueur d'onde d'excitation de 435nm.

VII- Transfection :

Les transfections de siARN (petits ARN interférants) par lipofection furent réalisées avec le Geneporter™2 (Gene Therapy System) ou l'HiPerFect (Qiagen). Selon la procédure conseillée par le fournisseur, le Geneporter est d'abord mélangé avec 4 volumes de milieu de culture sans sérum et mixé pendant que l'ARN est mélangé dans le « RNA diluent ». Après 3 minutes d'incubation, les deux mélanges sont rassemblés et laissés à incuber pendant 8 minutes. Finalement, le mélange est déposé sur les cellules dans un milieu sans sérum. Après environ 10 heures d'incubation, un volume de milieu complémenté est ajouté sur les cellules pendant une demi-journée. Le milieu est ensuite remplacé par du nouveau milieu complémenté. Les cellules peuvent alors être utilisées dans les 12 à 48 heures suivantes. En ce qui concerne l'HiPerFect, pour 2 mL de solution finale le protocole est le suivant : 182 µL de milieu de culture sans SVF, 2 µL de siARN à 50 µM, 16 µL de HiPerfect® Transfection Reagent. Après 10 min d'attente, on ajoute ce mélange (pour un volume final complété à 2 mL) dans une boîte de 35 mm ø à 50% de confluence.

Les séquences des différents siARN utilisés dans ce travail sont décrites dans chaque article.

VIII - Immunodétection et biotinylation :

A - Immunodétection :

Les cellules sont lysées sur la glace avec un tampon contenant : 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40 et un ensemble d'anti-protéases (Sigma). Le lysat est centrifugé à 15 000 g pendant 20 min à 4°C, et mélangé avec un tampon contenant 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4 % SDS, 5% β -mercaptoéthanol, 20 % glycerol, 0,01% bleu de bromophénol, et porté à 95°C pendant 5 min. Les protéines totales sont ensuite analysées en SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose par électrotransfert semi-sec (BioRad). La membrane est mise à saturer sur la nuit à température ambiante dans du TNT-lait (Tris-HCl pH 7.5, 140 mM NaCl, 0,05% Tween 20, 5% de lait en poudre écrémé) pour éviter les fixations aspécifiques. Après plusieurs lavages en TNT, la membrane est incubée avec les anticorps primaires spécifiques (décrits dans chaque article). Après plusieurs lavages en TNT, la membrane est placée dans du TNT-lait en présence d'anticorps secondaires correspondants couplés à la peroxydase. La révélation se fait par chimioluminescence à l'aide du substrat Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Chemical Co., Rockford, IL) selon les recommandations du fabricant. La membrane sera enfin exposée sur des films BioMax Light (Eastman Kodak Co., Rochester, NY) et la densité du signal est évaluée à l'aide du système d'acquisition d'image BioRad (BioRad Laboratories).

B - Biotinylation :

Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS glacé puis incubées 30 min à 4°C en présence de biotine (Pierce). Après incubation les cellules sont rincées 2 fois avec une solution de PBS contenant du BSA (Bovine Serum Albumine, afin de lier les molécules de

biotine encore libres). Les cellules sont ensuite lysées et les protéines totales récupérées comme décrit précédemment. Ces dernières sont incubées sur la nuit à 4°C et sous agitation avec des billes d'agarose couplées à l'avidine, molécule ayant une haute affinité pour la biotine, afin de ne garder que les protéines biotinylées. Ensuite la solution contenant les billes d'avidine et les protéines est centrifugée ; le surnageant est éliminé et remplacé par un tampon d'éluion pendant 30 min à 37°C. Les protéines biotinylées sont récupérées après centrifugation et analysé selon le protocole de western blot.

IX - Immunofluorescence :

Les cellules, cultivées sur des lamelles, sont fixées et perméabilisées dans de l'acétone pendant 15 minutes à -20°C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline). Les lamelles sont alors recouvertes de PBS et mises à saturer avec une solution contenant du BSA (0.2%), du triton X-100 (0.1%) et du sérum d'âne (2-5%) 30 minutes à 37°C. La saturation se fait avec le sérum de l'animal chez qui a été fait l'anticorps secondaire. S'ensuit une incubation d'1h à 37°C avec l'anticorps primaire d'intérêt (décrits dans les articles). Les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS-gélatine, puis incubées 1h à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) ou à la Rhodamine RedX dilué au 1/50ème. Les cellules sont rincées 4 fois dans du PBS-gélatine et une fois dans du PBS. Les lamelles sont montées dans du Mowiol. Elles sont finalement observées en microscopie à épifluorescence (Zeiss Axiophot).

X - Migration et invasion :

La migration et l'invasion cellulaire sont étudiées par de expériences en chambre de Boyden (technique Transwell).

Un insert transwell comportant un filtre dont les pores sont de 8µm (Falcon) est placé dans un puits de plaque 24 puits. Les cellules sontensemencées dans l'insert, dans un milieu sans SVF, à la densité requise. Après 1h, la molécule d'intérêt est ajoutée. Pour les essais d'invasion, le compartiment supérieur est coatée avec 50 µg de Matrigel (BD Biosciences). 500 µl de milieu complet (10% SVF) sont placés dans le compartiment inférieur, jouant le

rôle de chimioattractant. Après 8h pour la migration et 24h pour l'invasion, les cellules n'ayant pas migrées sont enlevées du compartiment supérieur par grattage, alors que les cellules ayant migré à travers les pores du filtre vers la face inférieure des inserts sont fixées avec 4% paraformaldehyde dans du PBS, marquées au Hoescht (5 mg/ml) et comptées au microscope à fluorescence (Leica DMIRB (×200)).

RESULTATS

Article 1

TRPV6 Determines the Effect of Vitamin D₃ on Prostate Cancer Cell Growth

V'yacheslav Lehen'kyi*, Maylis Raphaël*, **Agathe Oulidi***, Matthieu Flourakis, Sergii Khalimonchuk, Artem Kondratskyi, Dmitri V. Gordienko, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Roman Skryma, Natalia Prevarskaya
(* co-auteurs)

PLoS ONE, 2011

Depuis de nombreuses années, la vitamine D₃ fait l'objet d'essai clinique en thérapie contre le cancer de la prostate en tant qu'agent anti-prolifératif, néanmoins les résultats restent controversés, et pour les cas de cancers les plus avancés, la vitamine D₃ se révèle inefficace. Il est montré que le gène *trpv6* est une cible du récepteur de la vitamine D₃, cette dernière pouvant augmenter l'expression du canal. Or, nous avons montré au laboratoire que TRPV6 est impliqué positivement dans le contrôle de la prolifération et de la résistance à l'apoptose des cellules prostatiques cancéreuses, ce qui semble incompatible avec un effet anti-prolifératif de la vitamine D₃.

Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés au rôle de TRPV6 dans l'effet de la vitamine D₃ (plus particulièrement son métabolite actif la 1,25-dihydroxyvitamine D₃) sur la croissance des cellules prostatiques cancéreuses, afin de comprendre comment les effets anti-prolifératif de la vitamine D₃ pouvaient être compatibles avec la régulation positive de l'expression du canal TRPV6.

Nous avons ainsi montré que dans certaines conditions, la vitamine D₃ présentait en fait un effet pro-prolifératif, celui-ci étant associé à une surexpression du canal TRPV6 et une augmentation du calcium entrant par ce canal. Ces résultats remettent en cause l'utilisation de la vitamine D₃ en thérapie contre le cancer de la prostate.

TRPV6 Determines the Effect of Vitamin D3 on Prostate Cancer Cell Growth

V'yacheslav Lehen'kyi^{1,2*}, Maylis Raphaël^{1,2*}, Agathe Oulidi^{1,2*}, Matthieu Flourakis^{1,2}, Sergii Khalimonchik^{1,2}, Artem Kondratskiy^{1,2}, Dmitri V. Gordienko³, Brigitte Mauroy⁴, Jean-Lois Bonnal⁴, Roman Skryma^{1,2}, Natalia Prevarskaya^{1,2*}

1 Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France, **2** Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France, **3** Division of Basic Medical Sciences, St. George's University of London, Cranmer Terrace, London, United Kingdom, **4** Université Catholique de Lille, Service d'Urologie, Lille, France

Abstract

Despite remarkable advances in the therapy and prevention of prostate cancer it is still the second cause of death from cancer in industrialized countries. Many therapies initially shown to be beneficial for the patients were abandoned due to the high drug resistance and the evolution rate of the tumors. One of the prospective therapeutical agents even used in the first stage clinical trials, 1,25-dihydroxyvitamin D3, was shown to be either unpredictable or inefficient in many cases. We have already shown that TRPV6 calcium channel, which is the direct target of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor, positively controls prostate cancer proliferation and apoptosis resistance (Lehen'kyi *et al.*, *Oncogene*, 2007). However, how the known 1,25-dihydroxyvitamin D3 antiproliferative effects may be compatible with the upregulation of pro-oncogenic TRPV6 channel remains a mystery. Here we demonstrate that in low steroid conditions 1,25-dihydroxyvitamin D3 upregulates the expression of TRPV6, enhances the proliferation by increasing the number of cells entering into S-phase. We show that these pro-proliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 are directly mediated via the overexpression of TRPV6 channel which increases calcium uptake into LNCaP cells. The apoptosis resistance of androgen-dependent LNCaP cells conferred by TRPV6 channel is drastically inverted when 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects were combined with the successful TRPV6 knockdown. In addition, the use of androgen-deficient DU-145 and androgen-insensitive LNCaP C4-2 cell lines allowed to suggest that the ability of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to induce the expression of TRPV6 channel is a crucial determinant of the success or failure of 1,25-dihydroxyvitamin D3-based therapies.

Citation: Lehen'kyi V, Raphaël M, Oulidi A, Flourakis M, Khalimonchik S, et al. (2011) TRPV6 Determines the Effect of Vitamin D3 on Prostate Cancer Cell Growth. *PLoS ONE* 6(2): e16856. doi:10.1371/journal.pone.0016856

Editor: Janine Santos, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, United States of America

Received: September 15, 2010; **Accepted:** January 16, 2011; **Published:** February 11, 2011

Copyright: © 2011 Lehen'kyi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Ministère de l'Éducation Nationale et Ligue Nationale Contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Prostate cancer remains the most common noncutaneous human malignancy and the second most lethal tumor among men with the highest incidence in industrialized countries [1]. The androgen receptor and other steroids regulate vital aspects of prostate cellular growth and function including proliferation, differentiation, apoptosis, lipid metabolism, and secretory action [2]. Androgen suppression has been the leading treatment and currently the most successful [3]. However, prostate carcinomas eventually become androgen-irresponsive, and the cancer is refractory to hormonal therapy — the most important reason for prostate cancer mortality [4].

Different nuclear receptors have been targeted for therapy and among them 1,25-dihydroxyvitamin D3 which exerts a multitude of anti-tumor activities against cultured prostate cancer cells and xenografts [5]. Normal and malignant prostatic epithelial cells express vitamin D3 receptor (VDR), and activation of VDR by 1,25-dihydroxyvitamin D3 generally results in inhibition of proliferation and cell cycle arrest [6]. However, to prevent or

treat prostate cancer, the interactions of other nuclear receptors and signaling pathway need to be considered [7].

The function of ion channels has been discussed in relation to proliferation and apoptosis. More recently, store operated Ca^{2+} channels and the Ca^{2+} pool in the endoplasmic reticulum have also been related to prostate cancer development [8]. Proliferation of the prostate cancer cell lines LNCaP and PC3 was inhibited by TH-1177, a substance which blocks Ca^{2+} entry [9]. Alterations in Ca^{2+} pool and cytosolic Ca^{2+} have not only been described to increase proliferation and sarcoendoplasmic Ca^{2+} -ATPase (SERCA) expression in LNCaP cells [10], but also to induce apoptosis [11]. Thus, Ca^{2+} homeostasis is critically involved in cancer development and progression.

Our attention has been drawn by the observation that a transient receptor potential highly Ca^{2+} -selective channel subfamily V member 6, TRPV6 is strongly expressed in advanced prostate cancer and significantly correlates with the Gleason >7 grading representing a strong marker of tumor progression and subsequent invasion into the healthy tissues [12,13]. We have previously shown that TRPV6 forms highly calcium selective

channels in prostate cells, whose current amplitude and inactivation behavior are tightly regulated by the intracellular calcium concentration [10,14]. Besides we have already shown that TRPV6 channel is involved in the control of prostate cancer proliferation and apoptosis resistance [15]. However, the precise role of TRPV6 in prostate pathophysiology remains illusive, and its regulation by androgen – contradictory [16]. Moreover, VDR being a direct activator of *trpv6* promoter [17], and 1,25-dihydroxyvitamin D3 a widely used anticancer treatment have completed an intriguing hypothesis for TRPV6 regulation and significance in prostate cancer. Our studies were based on the fact that 1,25-dihydroxyvitamin D3, already used in the first stage of clinical trials was shown to be either unpredictable or inefficient in many cases, and the fact that TRPV6 which positively controls prostate cancer proliferation and apoptosis resistance [15] is a direct target of 1,25-dihydroxyvitamin D3 [17]. The question how the known 1,25-dihydroxyvitamin D3 antiproliferative effects may be compatible with the upregulation of pro-oncogenic TRPV6 channel was the aim of our study.

Materials and Methods

Cell culture

Human LNCaP (lymph node cancer of the prostate), LNCaP C4-2, and DU-145 cell lines were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in RPMI medium (Gibco-BRL, CergyPontoise, France) supplemented with 10 or 2% foetal calf serum (FCS) and containing kanamycin (100 µg/ml) and L-glutamine (2 mM). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. The medium was changed three times a week and cultures were split by treating the cells with 0.25% trypsin (in PBS) for 5 min at 37°C before reaching confluency. For the experiments, cells were seeded in 6-well plates for PCR and western-blotting and onto glass coverslips for immunocytochemistry and calcium imaging. For the 1,25-dihydroxyvitamin D3 studies cells were treated with EtOH as a control for 1,25-dihydroxyvitamin D3. Charcoal-stripped foetal calf serum (2%) was added to phenol red free RPMI medium together with kanamycin and L-glutamin as above to incubate the cells to create steroid-deprived conditions.

RT- PCR

Total RNA was isolated using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure. After DNase I (Life Technologies) treatment to eliminate genomic DNA, 2 µg of total RNA was reverse transcribed into cDNA at 42°C using random hexamer primers (Perkin Elmer) and MuLV reverse transcriptase (Perkin Elmer) in a 40 µl final volume, followed by real time quantitative PCR.

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR of TRPV6 and HPRT mRNA transcripts was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, France) on the Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequences of primers are indicated in Table 1. The HPRT gene was used as an endogenous control to normalize variations in RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results we used the comparative threshold cycle method $\Delta\Delta C(t)$.

Western-blotting

Semiconfluent LNCaP cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. The lysates were centrifuged 15,000 × g at 4°C for 20 minutes, mixed with a sample buffer containing: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue, and boiled for 5 min at 95°C. Total protein samples were subjected to 8, 10, and 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry Western blotting (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked in a 5% milk containing TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) overnight then probed using specific rabbit polyclonal anti TRPV6 antibody (Alomone Labs Ltd., 1/200), anti-PCNA (Santa-Cruz, 1/1000), anti-β-actin (Lab Vision Co., 1/1000) antibodies. The bands on the membrane were visualized using enhanced chemiluminescence method (Pierce Biotechnologies Inc.). Densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

The cells grown on the glass coverslips were washed once with PBS and, if appropriate, incubated with Cholera toxin subunit B Alexa Fluor® 488 conjugate (Molecular Probes, 1/2000) for 15 min, then washed once with PBS and fixed in 3.5% paraformaldehyde in PBS. PBS-glycine (30 mM) was used to quench the reaction with the subsequent permeabilization with 0.1% Triton X-100. The cells were washed again in PBS and subjected to conventional immunostaining procedure. Alexa Fluor® 546 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, 1/4000) was used as a secondary antibody for TRPV6 staining. Fluorescence analysis was carried out using Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200 M with 63×1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature. Both channels were excited, collected separately and then merged using software Carl Zeiss LSM Image Examiner.

Table 1. Primers and siRNA.

No	Name, Accession No	Forward (5'→3')	Backward (5'→3')	Expected Size (b.p)
1.	TRPV6, NM_018646	TTGGCAGCTAGAAGGAGAGG	TCTGCAGATGGTTCAGAGA	106
2.	HPRT, (NM_000194)	GGCGTCGTGATTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTTCAGCTCT	134
3.	TRPV6 siRNA	5'-CCUGCUGCAGCAGAAGAGG(dTdT)-3'		
4.	TRPV6 siRNA-1	5'-GACTCTCTATGACCTCACA(dTdT)-3'		
5.	AR, siRNA	5'-GACUCAGCUGCCCCAUCCA(dTdT)-3'		

doi:10.1371/journal.pone.0016856.t001

Cell proliferation

Cell proliferation was measured using the CellTiter 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay (Promega, Madison, WI), on the basis of the cellular conversion of the colorimetric reagent MTS [3,4-(5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt] into soluble formazan by dehydrogenase enzymes found only in metabolically active, proliferating cells. Following each treatment, 20 μ l of dye solution was added into each well in 96-well plate and incubated for 2 h. Subsequently, absorbance was recorded at 490 nm wavelength using an ELISA plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Cellular proliferation inhibition rate is calculated as: $(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}}) \times 100\%$.

Cell cycle and apoptosis assays

Flow cytometry assays were performed on cell populations cultured in triplicate 25-cm² flasks as originally described [18]. Approximately 10⁶ cells were fixed with 1 ml ice-cold 70% methanol for 30 min. After fixing, cells were pelleted by centrifugation to remove the fixatives, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C, resuspended in 100 μ l PBS, treated with 100 μ l RNase A (1 mg/ml, Sigma), and stained with propidium iodide (PI, Sigma) at a final concentration of 50 μ g/ml. The stained cells were stored at 4°C in the dark and analyzed within 2 h. The stained samples were measured on a FACScan flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA). Data were acquired for 7000 events with a variation coefficient of less than 5%, and red fluorescence was measured using a fluorescence detector 3 (FL3) on the X-axis. The data were stored and analyzed using CellQuest software to assess cell-cycle distribution patterns (subG1 (apoptotic), G0/G1, S, and G2/M phases).

Calcium Imaging

Cells were plated onto glass coverslips and were loaded with 4 μ M Fura-2 AM at room temperature for 45 min in the growth medium. Recordings were performed in HBSS containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 0.3 Na₂HPO₄, 0.4 KH₂PO₄, 4 NaHCO₃, 5 glucose and 10 HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH. CaCl₂ was adjusted to 0.07 mM or 1.8 mM depending on the experiment. The coverslips were then placed in a perfusion chamber on the stage of the microscope. Fluorescence images of the cells were recorded with a video image analysis system (Quanticell). The Fura-2 fluorescence, at the emission wavelength of 510 nm, was recorded by exciting the probe alternatively at 340 and 380 nm. The signal ratio at 340/380 nm was converted into [Ca²⁺]_i level using an *in vitro* calibration.

siRNA cell transfection

LNCaP cells were transfected overnight with 200 nM of siRNA-TRPV6 1 and 2 per well of a six-well plate using “Gene porter 2” (Gene Therapy Systems, Inc.) in a final volume of 1 ml. Ready-to-use siRNA-TRPV6s (processing option:A4) were synthesized by Dharmacon Research Inc (Lafayette, USA)(see Table 1).

Reagents

All reagents were purchased from Sigma (Sigma, I’Ile d’Abeau Chesnes, France) unless otherwise specified.

Statistics

Data were expressed as mean \pm SD. Statistical analysis were carried out using Student’s unpaired *t*-tests. * - P < 0.05 or ** - P < 0.01 indicate statistical significance.

Results

The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on prostate cancer cell proliferation has been studied in two experimental conditions: 2% and 10% foetal calf serum (FCS)-supplemented RPMI medium. The growth of androgen-dependent LNCaP cell line was surprisingly increased by 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 2% FCS supplemented medium and suppressed in 10% FCS (Fig. 1A). We have already demonstrated the role of TRPV6 channel in proliferation of prostate cancer cells [15], and therefore we sought to investigate the regulation of TRPV6 channel expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Since it has been shown that *trpv6* is a VDR-regulated gene [17], we have studied the regulation of TRPV6 expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in LNCaP cells in different steroid content of the media (Fig. 1B, C). 1,25-dihydroxyvitamin D3 appears to directly activate the *trpv6* gene in LNCaP cells, though in 10% FCS medium its effects were not that significant (Fig. 1B) than in 2% FCS (Fig. 1C). 1,25-dihydroxyvitamin D3 significantly dose-dependently increased TRPV6 mRNA expression in 2% FCS-containing RPMI medium (Fig. 1C). To check whether the diminished effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 were due to FCS content and not to the optimal effect time we performed the time curve using the maximal concentration of 100 nM over three days at different time intervals (Fig. 1D). To confirm the significant induction of TRPV6 protein by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 2% FCS containing RPMI medium obtained by real time quantitative PCR a western-blotting was performed. It showed a considerable increase in TRPV6 protein level upon activation with 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 (Fig. 1E). Immunocytochemistry using TRPV6 specific antibody showed the expression of TRPV6 channels in LNCaP cells (Fig. 1F) as well as its localisation on the plasma membrane using Cholera toxin (CTX) conjugated with FITC labelling specifically G2M lipids in the membrane. Hence, the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the growth of androgen-dependent LNCaP cells depend on the relative steroid content. Besides, 1,25-dihydroxyvitamin D3 significantly increases the expression of TRPV6 channel in low-steroid conditions.

TRPV6 is involved in 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced proliferation of LNCaP cells

According to the data obtained above the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in 2% FCS were further studied. Since we have already demonstrated the role of TRPV6 channel in proliferation of prostate cancer cells [15], and knowing that there is no chemical compound available so far to selectively block TRPV6, we used siRNA approach to selectively knockdown TRPV6. Three different methodological approaches were employed to assess proliferation of LNCaP cells in 2% FCS-containing medium (Fig. 2A–C). The number of viable proliferating cells was measured by MTS assay. siRNA-TRPV6 significantly decreased the number of proliferating cells from day 2 to 4 after transfection (D0) (Fig. 2A). 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 was able to increase proliferation of LNCaP cells whereas TRPV6 knockdown inversed this stimulation to the level even lower than in control. siRNA against androgen receptor (AR), known to be crucial for prostate growth and development, was used as a positive control to achieve strong and reliable effects on prostate cell viability.

A cell cycle assay using propidium iodide staining was performed to precise the effects of TRPV6 knockdown as well as 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects and the role of TRPV6 therein, on cell cycle phase distribution of LNCaP cells cultured in 2% FCS containing RPMI medium (Fig. 2B). Indeed, we confirmed

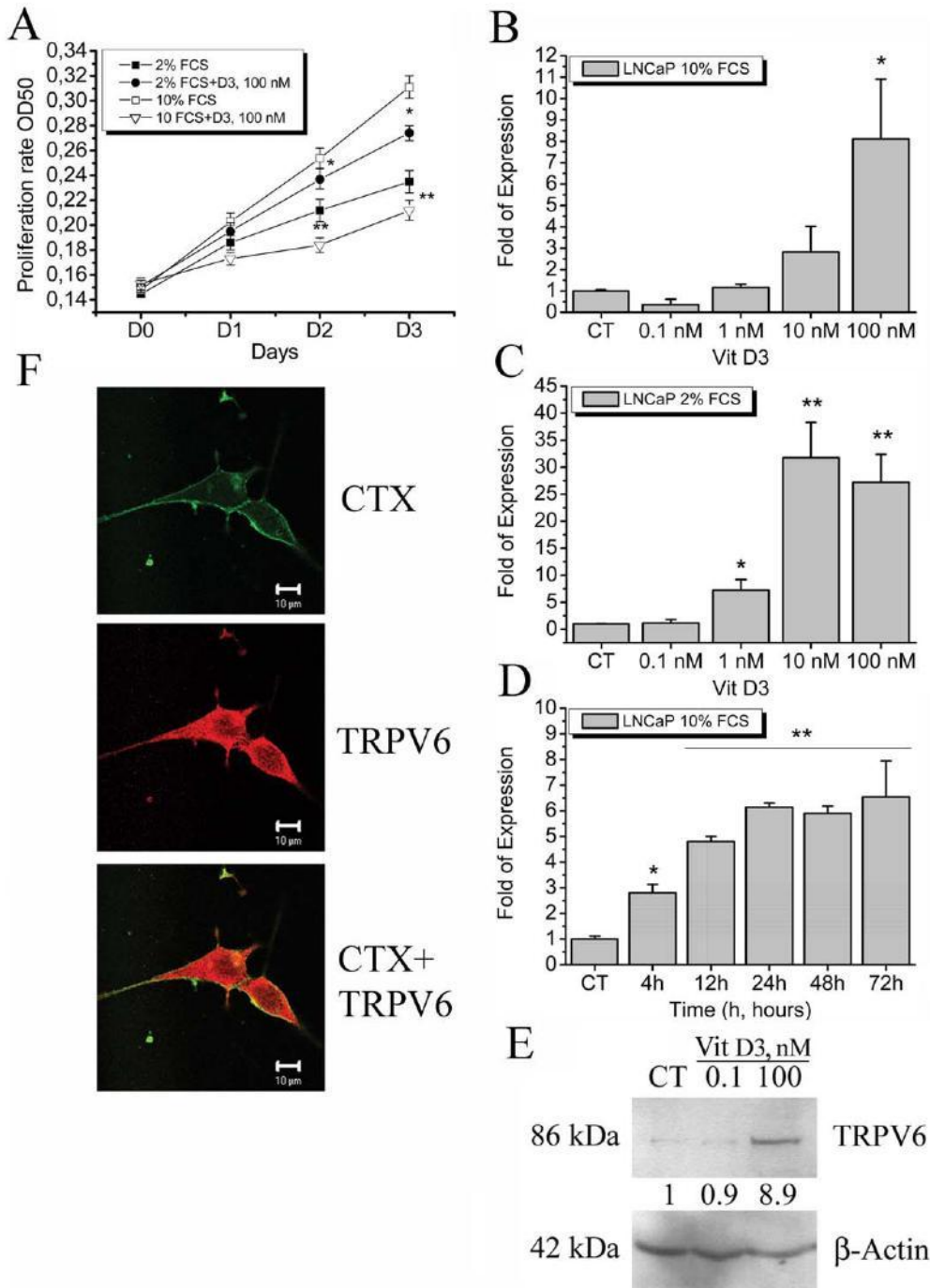


Figure 1. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on proliferation of LNCaP cells and expression of TRPV6 channel. **A**, 1,25-dihydroxyvitamin D3 effects on proliferation rate measured by MTS assay of LNCaP cells incubated either with 2% or 10% FCS-containing RPMI medium, * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, as compared to their respective controls (DMSO), $n = 3$. **B**, The upregulation of TRPV6 mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in LNCaP cells cultured in 10% FCS-containing RPMI medium; * - $P < 0.05$, as compared to control (DMSO), $n = 3$. **C**, The upregulation of TRPV6 mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in LNCaP cells cultured in 2% FCS-containing RPMI medium; * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, as compared to control (DMSO), $n = 3$. **D**, The time-dependence of TRPV6 expression under $100 \mu\text{M}$ 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment in LNCaP cells incubated in 10% FCS-containing RPMI medium. * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, as compared to control (DMSO), $n = 3$. **E**, A western-blotting of TRPV6 protein levels induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment for 3 days in LNCaP cells incubated in 2% FCS-containing RPMI medium. **F**, A confocal microscopy showing the pattern of TRPV6 protein expression and localisation onto the plasma membrane of LNCaP cells cultivated in 2% FCS-containing RPMI medium. Cholera toxin conjugated to FITC (CTX, green) used to stain the plasma membrane as well as the TRPV6 channel (TRPV6, red), and their respective merge (CTX+TRPV6) are shown. doi:10.1371/journal.pone.0016856.g001

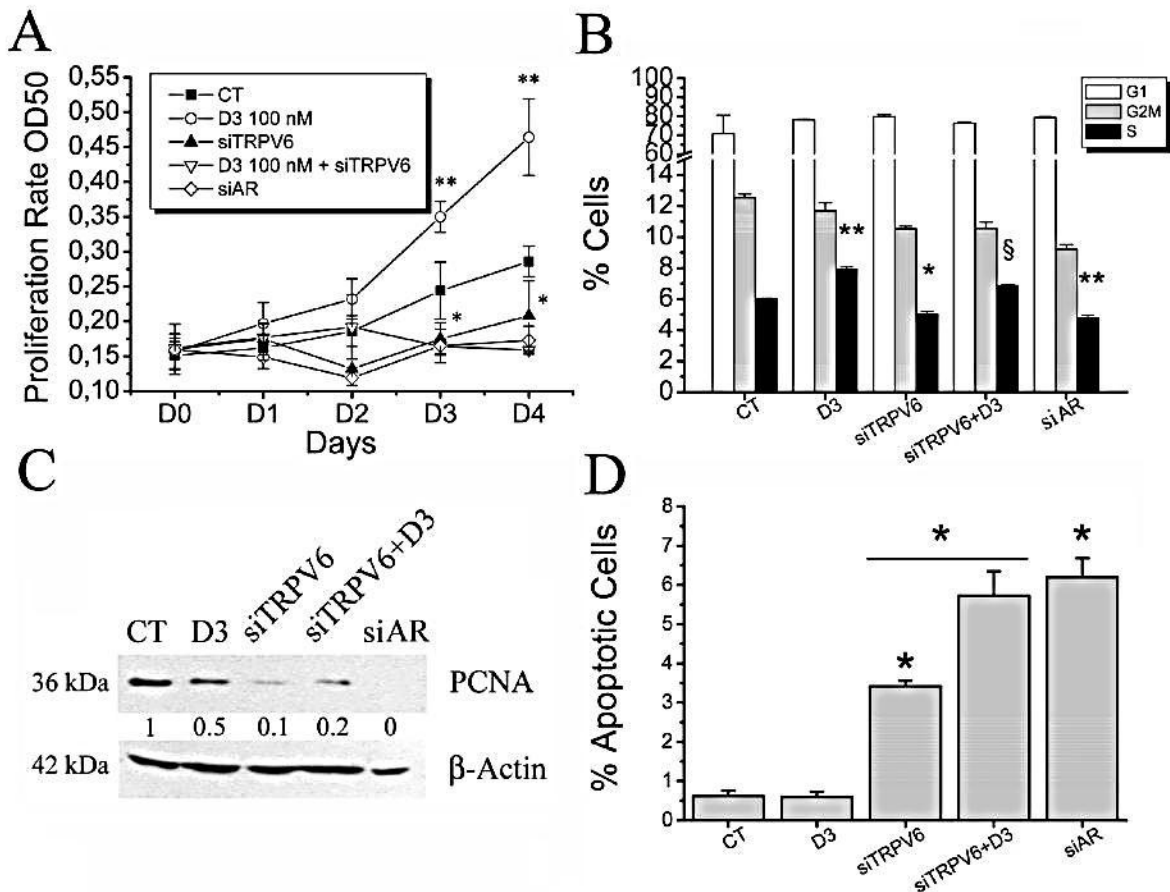


Figure 2. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on proliferation and apoptosis resistance of LNCaP cells are mediated via TRPV6 channel. **A**, LNCaP cells proliferation in 2% FCS-containing RPMI medium treated with 1,25-dihydroxyvitamin D3 (100 nM, applied at D1), siRNA-TRPV6 (siTRPV6, 80 nM, transfected at D0), the combined treatment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and siTRPV6 specified above, and siRNA-AR (siAR, 80 nM, transfected at D0) as a positive control. * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, as compared to control, $n = 4$; **B**, a cell cycle assay of LNCaP cells (incubated with 2% FCS-containing RPMI medium) for the same conditions as in MTS assay (**A**) (D3 equals 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3), carried out by flow cytometry of the cells stained with propidium iodide. * - $P < 0.05$, ** - $P < 0.01$, § - $P < 0.05$ vs. Vitamin D3; $n = 3$. **C**, a western-blotting of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the conditions indicated above as compared to β -actin. **D**, an apoptosis assay carried out by flow cytometry as a subG1 population of LNCaP cells cultured in 2% FCS-containing RPMI medium stained with propidium iodide. * - $P < 0.01$ vs. control; $n = 3$. doi:10.1371/journal.pone.0016856.g002

that siRNA-TRPV6 decreased the number of cells entered into the S-phase. The percentage of the cells entered into the S-phase was significantly higher in 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 treated cells than in control. Pretransfection of LNCaP cells with siRNA-TRPV6 attenuated 1,25-dihydroxyvitamin D3 increased proliferation, though not to the full extent. siRNA-AR as above was used as a positive control and showed a considerable decrease in % of the cells entered into the S-phase.

We also monitored a protein level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using the same conditions. PCNA appeared to be significantly decreased upon siRNA-TRPV6 knockdown. 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated cells expressed 2-fold less PCNA as was also observed by the combined treatment of siRNA-TRPV6 and 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3. The level of PCNA in siRNA-AR-treated cells was undetectable (Fig. 2C).

A cell cycle assay also allowing measuring a number of apoptotic cells as a subG1 population was employed. 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 had no influence on apoptosis itself, whereas siRNA-TRPV6 had significant effect on apoptosis rate (Fig. 2D). However, combining the treatment of 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 with the transfection of siRNA-TRPV6

significantly increased the number of apoptotic cells much more than siRNA-TRPV6 pretreatment alone (Fig. 2D). Thus, TRPV6 is involved in both proliferation and apoptosis resistance of LNCaP cells and the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 are strongly dependent on TRPV6 expression.

TRPV6 mediates 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced Ca^{2+} -uptake in LNCaP cells

In order to study the contribution of TRPV6 as a highly Ca^{2+} -selective channel to Ca^{2+} -uptake in LNCaP cells, we measured intracellular calcium levels ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in LNCaP cells cultured in 2% FCS containing RPMI medium after consequent changes in extracellular calcium levels ($[\text{Ca}^{2+}]_o$). In control cells treated with EtOH (CTRI) the variation in $[\text{Ca}^{2+}]_o$ produced significant changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 3A). siRNA-TRPV6 knockdown decreased the amplitude of 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -evoked increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Fig. 3A and C). 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 increased by itself basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ significantly as well as increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response on application of 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_o$ which was completely reversed by the pretreatment with siRNA-TRPV6 (Fig. 3C). These data indicate that TRPV6 constitutively mediates Ca^{2+} -uptake in

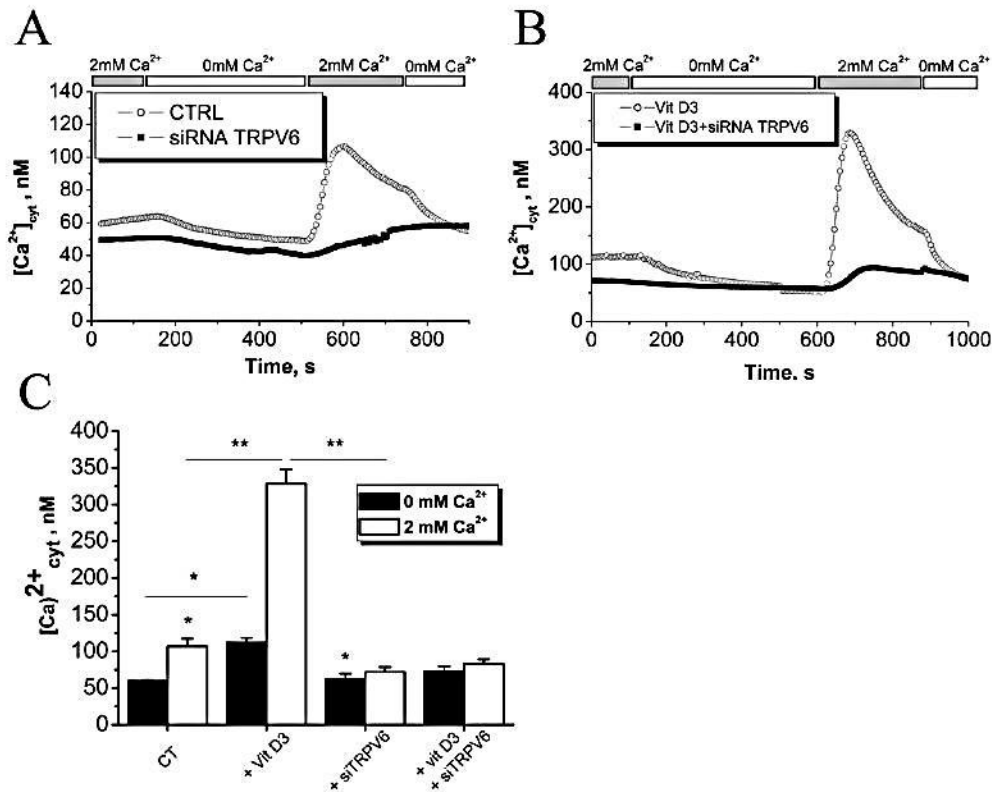


Figure 3. TRPV6 is an essential Ca²⁺-entry channel involved in 1,25-dihydroxyvitamin D3 increased Ca²⁺ uptake in LNCaP cells. **A**, TRPV6 involvement in Ca²⁺ uptake in LNCaP cells cultured in 2% FCS-containing RPMI medium and treated either with siCT (CTRL) or siRNA-TRPV6 (both 80 nM, 24 hours). **B**, Ca²⁺ uptake in LNCaP cells cultured in 2% FCS-containing RPMI medium and under 1,25-dihydroxyvitamin D3 (100 nM, 3 days) treated either with siCT (CTRL) or siRNA-TRPV6 (both 80 nM, 24 hours). **C**, a corresponding histogram showing relative [Ca²⁺]_{cyt} levels after consequent [Ca²⁺]_o switches in the conditions as indicated above. * - P<0.05 (as compared to control); ** - P<0.01, n=140. doi:10.1371/journal.pone.0016856.g003

LNCaP cells and TRPV6 also accounts for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated enhanced Ca²⁺-uptake.

The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on different androgen-independent cell lines

Two different androgen-independent cell lines were used: an androgen receptor-deficient DU-145 and androgen-insensitive LNCaP C4-2 cell lines. Cells were cultivated in the same conditions of 2 or 10% FCS supplemented RPMI medium and the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 were studied (Fig. 4). The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on androgen receptor deficient DU-145 cell line were likely to be serum-dependent since in 2% FCS the proliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 were conserved (Fig 4A), whereas in 10% FCS its effects were abolished (Fig. 4B). The other cell line insensitive to steroids, but still expressing the androgen receptor, LNCaP C4-2 was used, where the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 were shown to be FCS-independent and 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 exerted its strong anti-proliferative effects (Fig. 4C–D). A real time quantitative PCR was performed showing the regulation of TRPV6 expression in DU-145 cells by 100 μM 1,25-dihydroxyvitamin D3 in both 2 and 10% FCS containing medium (Fig. 4E). Steroid-deprived conditions in the case of LNCaP cells (LNCaP-ST) were also used to confirm that the induction of TRPV6 expression strongly depends on the steroid content of the culture medium (Fig. 4F). Thus the pro-proliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the growth of PCa cells are

determined by its ability to induce the expression of TRPV6 channel and its induction appears to be strongly steroid-dependent.

Discussion

One of the most important findings of the present work is that 1,25-dihydroxyvitamin D3 may enhance proliferation of LNCaP cells. We have clearly shown that both proliferation rate and the number of the cells entering into the S-phase are increased upon 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment. These effects entirely depend on the expression and function of TRPV6 channel which has been previously shown to be implicated in prostate cancer growth and apoptosis-resistance [15]. A previously reported 1,25-dihydroxyvitamin D3 antiproliferative activity in prostate cancer may be compromised by TRPV6 upregulation.

A number of works has already published TRPV6 induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in intestine [19], kidney [20], semicircular canal [21], and even prostate cancer cells [22]. Five VDR responsive elements were found in the human gene encoding the epithelial calcium channel TRPV6 suggesting its direct regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 via its putative receptor [17]. We have confirmed in our cell model that the expression of TRPV6 is directly upregulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in dose- and time-dependent fashion. Our results suggest that the nature of this upregulation is steroid-dependent since in steroid-deprived conditions the effects of 25-dihydroxyvitamin D3 are abolished. This finding is consistent with the data that activities of 1,25-

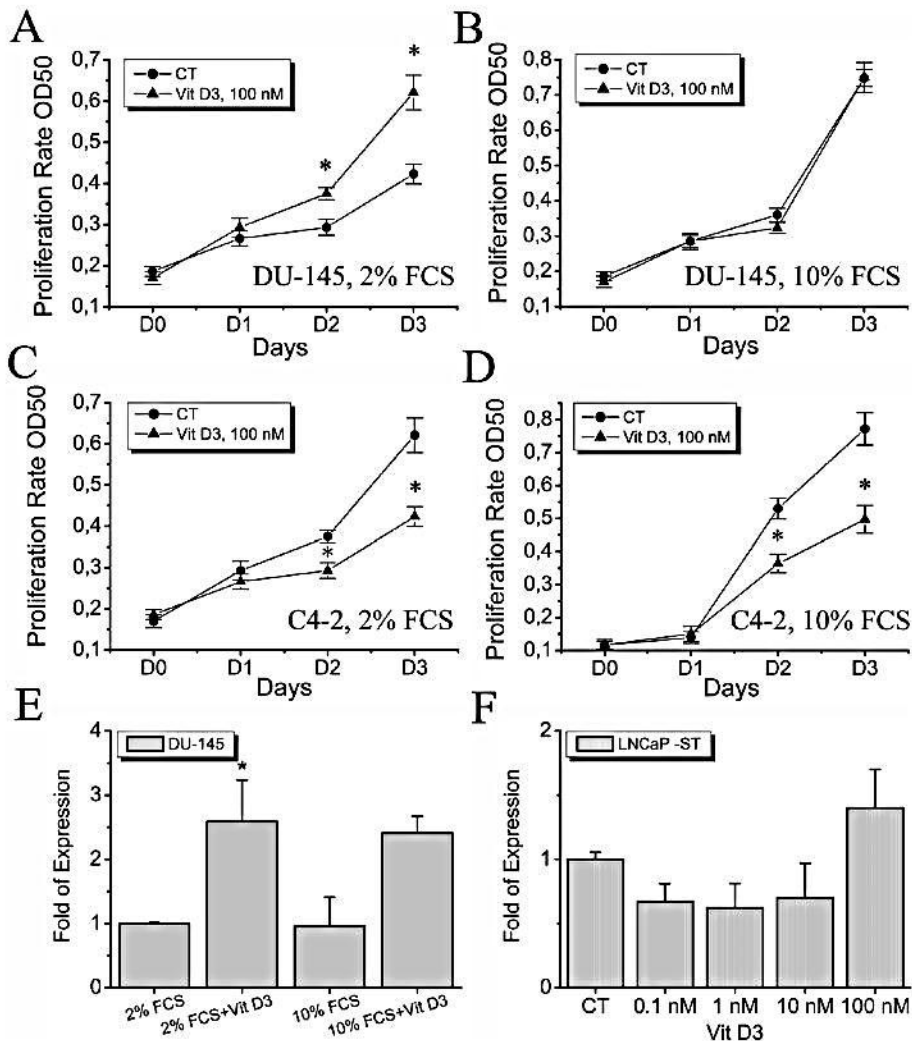


Figure 4. The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on androgen-independent cell lines. **A, B,** The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on androgen receptor-deficient DU-145 cell line in both 2 and 10% FCS-containing RPMI medium (**A** and **B**, respectively), * - $P < 0.05$ (as compared to control), $n = 3$. **C, D,** The effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on androgen-insensitive LNCaP C4-2 cell line in both 2 and 10% FCS-containing RPMI medium (**C** and **D**, respectively), * - $P < 0.05$ (as compared to control), $n = 3$. **E,** the relative expression levels of TRPV6 channel in DU-145 cells treated with 100 μM 1,25-dihydroxyvitamin D3 for 3 days in 2 and 10% FCS-containing RPMI medium, * - $P < 0.05$ (as compared to control), $n = 3$. **F,** the expression of TRPV6 channel induced by 100 nM 1,25-dihydroxyvitamin D3 for 3 days in LNCaP cells in steroid-deprived RPMI medium (LNCaP-ST), $n = 3$.

doi:10.1371/journal.pone.0016856.g004

dihydroxyvitamin D3 in LNCaP cells are dependent upon steroid co-regulation and that, for instance, androgen receptor upregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 likely contributes to the synergistic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and DHT in these cells [23]. The data from the laboratory of Feldman show that the addition of DHT at 1 nM to the medium restored the antiproliferative activity of 1,25-dihydroxyvitamin D3, whereas an antiandrogen, Casodex, completely blocked 1,25-dihydroxyvitamin D3 antiproliferative and PSA stimulation activities when cells were cultured in FBS medium [23].

The ability of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to inhibit prostate growth has been demonstrated in primary cultured cells from normal tissues, benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer, and several xenograft models of prostate cancer [5], however, no relation to TRPV6 responsiveness has been demonstrated so far. The mechanism for 1,25-dihydroxyvitamin

D3 activity is not completely clear but relates to different activities as to pre-receptor differences in pharmacokinetics, as well as differences in the functional conformation of the ligand-bound VDR complex which can alter properties of retinoid X-receptor hybridization, DNA binding and co-activator recruitment [24]. The mechanism of growth inhibition by 1,25-dihydroxyvitamin D3 appears to be multifactorial but induction of $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ and/or $p27^{\text{Kip1}}$ seems to be a major pathway [25].

We are the first to report that the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 may be pro-proliferative when mediated by the direct induction of *trpv6* gene expression in human highly cancerous androgen-dependent LNCaP cell line. The question remains open whether 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment is feasible in cancer stages and metastasis being distinct in high TRPV6 expression, or, otherwise, in the prostate cancer cells biopsies still responsive to 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment by overexpressing TRPV6.

Thus, 1,25-dihydroxyvitamin D3 upregulates TRPV6 which considerably increases $[Ca^{2+}]_i$ providing enhanced Ca^{2+} -uptake by LNCaP cells. This 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced Ca^{2+} -uptake dramatically increases proliferation rate and a number of the cells entering into the S-phase and also contributes to the enhanced apoptosis resistance. Intriguingly, the apoptosis remains unaffected upon 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment which may be explained by the responsiveness of LNCaP cell line to 1,25-dihydroxyvitamin D3 via increasing the expression of TRPV6 channel and therefore enhancing the resistance to apoptosis. However, when LNCaP cells are treated with 1,25-dihydroxyvitamin D3 but pretransfected with siRNA-TRPV6 and thus void of this channel they are much more subjected to apoptosis that it becomes comparable to impact of siRNA against AR used a positive control. This implies that the calcium supplied into the cancer cell via TRPV6 channel is used to counteract the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 which have to be antiproliferative in the absence or low presence of this channel. We conclude that TRPV6 is a serious determinant for 1,25-dihydroxyvitamin D3 pro- or antiproliferative activity.

Our data are not contradictory to the previously published works and are consistent with the hypothesis that the growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 are partially mediated through its ability to modulate PCNA expression [26]. A PCNA protein level being two-fold decreased upon 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment is further declined in LNCaP cells transfected with siRNA-TRPV6, with or without 1,25-dihydroxyvitamin D3. These conditions are characterized by the suppression of cell proliferation, therefore suggesting a potent contra-mechanism mediated by TRPV6.

1,25-dihydroxyvitamin D3 also up-regulates the expression of androgen receptor (AR) and PSA, and both biochemical and immunohistochemical analyses show proportionately greater increased presence of AR in the nucleus and reduced in the cytosol [27]. These evidences allow to suggest multivectorial differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the proliferation machinery, especially in cancer. A two-fold downregulation of a particular set of DNA replication genes including a cell division cycle 6 homolog, a DNA polymerase alpha subunit, PCNA, two DNA polymerase delta subunits, and flap-structure specific endonuclease 1 [28], seems unlikely to drastically affect proliferation by itself.

On the other side, 1,25-dihydroxyvitamin D3 is known to stimulate DNA synthesis via sequential activation of Raf and the mitogen-activated protein kinase [29]. VDR protein was also shown to associate with Shc, indicating that this steroid hormone is able to signal through the transcription-independent pathways similar to those used by peptide hormones and cytokines [29]. A combination of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and DHT has already been demonstrated to increase DNA synthesis in LNCaP cells [30], however the other works show either no significant or

inhibition of proliferation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 alone. Moreover, 1,25-dihydroxyvitamin D3 stimulates the proliferation of vascular smooth muscle cells [31], epiphyseal chondrocytes [32], myoblasts [33], skin cells [29,34], mammalian epithelial cells [35], myeloid leukemia cell lines HL-60 and KG-1a [36], T-cells of tumor bearers [37], chromaffin cells [38], carcinoma C-cells [39] etc.

The genomic sequence corresponding to 6000 bp upstream and 100 bp downstream of hTRPV6 ATG has been taken for the transcription factor analysis (data not shown). The MatInspector 7.7.3 program (Genomatix Software GmbH) has been employed to analyse the putative steroid receptor binding sites [40]. The hTRPV6 promoter sequence was analysed for the presence of different steroid-responsive elements using prostate specific matrix which is associated with transcription factors expressed and transcriptionally active in this tissue. Numerous steroid-responsive elements including but not limited to VDR, androgen receptor, and glucocorticoid receptors, were found which suggests the possible strong regulation of *trpv6* gene by different steroid receptors and therefore may represent certain temporal and spatial limits for each particular nuclear receptor to induce the transcription of the *trpv6* gene. This latter evidence may explain why in high level steroid conditions the expression of TRPV6 channel may be not affected or even downregulated which may trigger the activation of a different pathway than expected.

The combined 1,25-dihydroxyvitamin D3 therapy has recently become an advantage in treating prostate cancer. The combined treatment with other compounds interacting directly or indirectly with the VDR pathway like inhibitors of histone deacetylation [41], a non-steroid anti-inflammatory drug [42], or genistein and trichostatin A [43], will shift downstream signaling to the required direction to achieve beneficial effects.

In conclusion, we have shown that TRPV6 is directly implicated in 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated proliferation in low steroid conditions. The apoptosis resistance due to TRPV6 channel may be overcome by synergistic action of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and selective TRPV6 knockdown. 1,25-dihydroxyvitamin D3-induction of TRPV6 expression should be taken into account while treating TRPV6-positive/inducible tumors. The data strongly suggest that the ability of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to induce the expression of TRPV6 channel is the crucial determinant of the success or failure of 1,25-dihydroxyvitamin D3-based therapies.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VL NP MR. Performed the experiments: VL MR AO MF SK AK DVG. Analyzed the data: VL MR RS NP. Contributed reagents/materials/analysis tools: BM J-LB. Wrote the paper: VL NP.

References

- Cooperberg MR, Mou J, Carroll PR (2005) The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol* 23: 8146–8151.
- Burnstein KL (2005) Regulation of androgen receptor levels: implications for prostate cancer progression and therapy. *J Cell Biochem* 95: 657–669.
- Lam JS, Leppert JT, Vemulapalli SN, Shvarts O, Beldegrun AS (2006) Secondary hormonal therapy for advanced prostate cancer. *J Urol* 175: 27–34.
- So A, Gleave M, Hurtado-Col A, Nelson C (2005) Mechanisms of the development of androgen independence in prostate cancer. *World J Urol* 23: 1–9.
- Krishnan AV, Pechl DM, Feldman D (2003) Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J Cell Biochem* 88: 363–371.
- Lou YR, Qiao S, Talonpoika R, Syvala H, Tuohimaa P (2004) The role of Vitamin D3 metabolism in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 317–325.
- Pechl DM, Feldman D (2004) Interaction of nuclear receptor ligands with the Vitamin D signaling pathway in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 92: 307–315.
- Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier I, Vanoverberghe K, et al. (2003) Store-operated Ca^{2+} channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium* 33: 357–373.
- Haverstick DM, Heady TN, Macdonald TT, Gray LS (2000) Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca^{2+} entry. *Cancer Res* 60: 1002–1008.

10. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, et al. (2002) Bel-2 -dependent modulation of Ca^{2+} homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1: 169–179.
11. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, et al. (2000) Store depletion and store-operated Ca^{2+} current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 527(Pt 1): 71–83.
12. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, et al. (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca^{2+} channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1359–1363.
13. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca^{2+} -selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22: 7858–7861.
14. Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebault S, Lepage G, Parys JB, et al. (2004) Two types of store-operated Ca^{2+} channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 30326–30337.
15. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Provarskaia N (2007) TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca^{2+} /NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26: 7380–7385.
16. Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, et al. (2001) CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 729–734.
17. Wang 'T', Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, et al. (2003) Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 19: 2685–2695.
18. Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66: 108–193.
19. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ (2003) Regulation of the epithelial Ca^{2+} channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G78–85.
20. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ (2005) TRPV5 and TRPV6 in Ca^{2+} (re)absorption: regulating Ca^{2+} entry at the gate. *Pflügers Arch* 451: 181–192.
21. Yamauchi D, Ravencrand NN, Pondugula SR, Kampalli SB, Sannoman JD, et al. (2005) Vitamin D upregulates expression of ECaC1 mRNA in semicircular canal. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1353–1357.
22. Hodding M, Fecher-Trost G, Flockerzi V (2003) Store-operated Ca^{2+} current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem* 278: 50872–50879.
23. Zhao XY, Ly LH, Pechl DM, Feldman D (1997) $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinology* 138: 3290–3298.
24. Cheskis B, Lemon BD, Uskokovic M, Lomedico PT, Freedman LP (1995) Vitamin D3-retinoid X receptor dimerization, DNA binding, and transactivation are differentially affected by analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Mol Endocrinol* 9: 1814–1824.
25. Banerjee P, Chatterjee M (2003) Antiproliferative role of vitamin D and its analogs—a brief overview. *Mol Cell Biochem* 253: 247–254.
26. Hsieh TY, Ng CY, Mallouh C, Tazaki H, Wu JM (1996) Regulation of growth, PSA/PAP and androgen receptor expression by $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ in the androgen-dependent LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 141–146.
27. Hsieh T, Wu JM (1997) Induction of apoptosis and altered nuclear/cytoplasmic distribution of the androgen receptor and prostate-specific antigen by $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ in androgen-responsive LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 539–544.
28. Eelen C, Verhinden L, van Camp M, van Hummelen P, Marchal K, et al. (2004) The effects of $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ on the expression of DNA replication genes. *J Bone Miner Res* 19: 133–146.
29. Gniadecki R (1996) Activation of Raf-mitogen-activated protein kinase signaling pathway by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106: 1212–1217.
30. Martin JL, Pattison SL (2000) Insulin-like growth factor binding protein-3 is regulated by dihydrotestosterone and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in LNCaP prostate carcinoma cells. *Endocrinology* 141: 2401–2409.
31. Koh E, Morimoto S, Fukuo K, Itoh K, Hironaka T, et al. (1988) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. *Life Sci* 42: 215–223.
32. Krohn K, Haffner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, et al. (2003) 1,25(OH) $_2$ D3 and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 73: 400–410.
33. Buitrago CG, Parco VG, de Boland AR, Boland R (2003) Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase C α mediates $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-vitamin D}_3$ regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *J Biol Chem* 278: 2199–2205.
34. Gniadecki R (1996) Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25-Dihydroxyvitamin D3: dependence on cell culture conditions. *J Invest Dermatol* 106: 510–516.
35. Gache C, Berthois Y, Cvidkovic E, Martin PM, Sacz S (1999) Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Breast Cancer Res Treat* 55: 29–39.
36. Rashid SF, Mountford JC, Gombart AF, Campbell MJ (2001) $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ displays divergent growth effects in both normal and malignant cells. *Steroids* 66: 433–440.
37. Wiers KM, Lozano Y, Messingham KA, Metz RJ, Young MR (1997) $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ activates T cells of tumor bearers through protein phosphatase 2A. *Cancer Immunol Immunother* 44: 97–102.
38. Tischler AS, Powers JF, Downing JC, Riscberg JC, Shahsavari M, et al. (1996) Vitamin D3, lactose, and xylitol stimulate chromaffin cell proliferation in the rat adrenal medulla. *Toxicol Appl Pharmacol* 140: 115–123.
39. Grauer A, Baier R, Ziegler R, Raue F (1995) Crucial role of c-myc in 1,25(OH) $_2$ D3 control of C-cell-carcinoma proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 922–927.
40. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, et al. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933–2942.
41. Banwell CM, Singh R, Stewart PM, Uskokovic MR, Campbell MJ (2003) Antiproliferative signalling by 1,25(OH) $_2$ D3 in prostate and breast cancer is suppressed by a mechanism involving histone deacetylation. *Recent Results Cancer Res* 164: 83–98.
42. Gavrilov V, Steiner M, Shany S (2005) The combined treatment of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and a non-steroid anti-inflammatory drug is highly effective in suppressing prostate cancer cell line (LNCaP) growth. *Anticancer Res* 25: 3425–3429.
43. Swami S, Krishnan AV, Pechl DM, Feldman D (2005) Genistein potentiates the growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in DU145 human prostate cancer cells: role of the direct inhibition of CYP24 enzyme activity. *Mol Cell Endocrinol* 241: 49–61.

Article 2

TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of cancer cells adhesion, migration and invasion

Agathe Oulidi, Alexandre Bokhobza, Dimitra Gkika, Fabien Vanden Abeele, Caroline Berenguer, V'yacheslav Lehen'kyi, L'Houcine Ouafik, Brigitte Mauroy, Natalia Prevarskaya

En préparation

De nombreuses données suggèrent un rôle de l'adrénomédulline dans la progression tumorale vers les métastases, notamment par des effets sur l'angiogenèse et la migration cellulaire. Le canal TRPV2 a été montré récemment par notre laboratoire pour promouvoir la migration des cellules prostatiques cancéreuses dont il est connu qu'elles expriment l'adrénomédulline et ses récepteurs.

Le premier but de cet article en préparation a donc été d'étudier l'implication potentielle du canal TRPV2 dans l'effet de l'adrénomédulline sur la migration des cellules prostatiques cancéreuses PC-3. Cependant, à la vue de l'évolution similaire de l'expression de TRPV2 entre les cancers de prostate et de vessie, nous nous sommes également intéressés à l'implication de ce canal et de l'adrénomédulline dans la migration des cellules urothéliales cancéreuses T24/83.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'adrénomédulline stimulait la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques mais également des cellules urothéliales. Nous montrons que cet effet de l'adrénomédulline nécessitait la présence du canal TRPV2, l'adrénomédulline induisant sa translocation à la membrane plasmique et l'augmentation du niveau de calcium basal en résultant.

TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of cancer cells adhesion, migration and invasion

Agathe Oulidi¹, Alexandre Bokhobza¹, Dimitra Gkika¹, Fabien Vanden Abeele¹, Caroline Berenguer², V'yacheslav Lehen'kyi¹, L'Houcine Ouafik², Brigitte Mauroy³, Natalia Prevarskaya¹

1 INSERM U1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France; Université de Lille 1 Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France.

2 Inserm UMR 911-CRO2, Faculté de Médecine Timone, F-13385 Marseille France

3 Université Catholique de Lille, Lille France.

Corresponding address : Natalia Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Bâtiment SN3, Université de Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France ; Tel. : 33-3-20-43-40-77 ; Fax : 33-3-20-43-40-66 ; E-mail : Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr

Key words :

Abstract

Adrenomedullin (AM) is a 52-amino acid peptide initially isolated from human pheochromocytoma. AM is expressed in a variety of malignant tissues and cancer cell lines and was shown to be a mitogenic factor capable of stimulating growth of several cancer cell types. In addition, AM is a survival factor for certain cancer cells. Some data suggest that AM might be involved in the progression cancer metastasis via angiogenesis and cell migration and invasion control. The Transient Receptor Potential channel TRPV2 is known to promote in prostate cancer cells migration and invasive phenotype and is correlated with the stage and grade of bladder cancer. In this work we show that AM induces prostate and urothelial cancer cells migration and invasion through TRPV2 translocation to plasmamembrane and the subsequent increase in resting calcium level.

Introduction

Adrenomedullin (AM) is a 52 amino acid peptide originally isolated from a human pheochromocytoma [1] that bears multifactorial regulatory properties ranging from inducing vasodilatation to modulating cellular growth [2]. The functions of AM are mediated through specific receptors comprising calcitonin receptor-like receptor (CLR) and a receptor activity-modifying protein (RAMP); when co-expressed with RAMP2 or RAMP3, CLR functions as a specific AM receptor [3]. AM and its receptors are highly expressed in various cancer cell lines and in cancers of the pancreas, lung, kidney, breast, ovary and prostate. A number of studies have implicated AM (secreted endogenously or exogenously administered) in tumor growth, progression and metastasis via effects on angiogenesis, cell proliferation, apoptosis and migration [4-6]. However, molecular mechanisms underlying these effects of AM on cancer cell growth and metastasis remain contradictory and poorly understood.

Cell migration plays a pivotal role in cancer invasion and metastasis. Many of the components of cellular migration machinery are regulated by the intracellular calcium (Ca^{2+}) concentration [7]. An essential part of the intracellular Ca^{2+} signal is generated by the transmembrane influx of extracellular Ca^{2+} mainly occurring through cationic channels with distinctive Ca^{2+} selectivity. In non-excitabile cells, Ca^{2+} entry is provided by ion channels that are activated by various chemical and physical stimuli. Some of these Ca^{2+} entry channels are members of the “transient receptor potential” (TRP) family of cationic channels [8]. TRP channels have been reported to be involved in carcinogenesis [9], and among them TRPV2 channel, has been shown to be specifically implicated in the progression of prostate and bladder cancers to more aggressive phenotype. Indeed, recent studies from our laboratory have shown show that TRPV2 is expressed in the more aggressive prostate cancer cells and stimulates the migration and invasive phenotype of these cells [10-11]. Interestingly, TRPV2 expression in bladder is also shown to correlate with the grade and stage of cancer [12] but nothing is known about its potential role in bladder cancer cells migration/invasion.

In the present work we investigated the involvement of TRPV2 in the effect of AM on the multistep process of invasion in two highly invasive cell lines: the PCa (Prostate Cancer) cells PC-3 and the UC (Urothelial Carcinoma) cells T24/83. Our data indicate that AM can increase adhesion, migration and invasion through Focal Adhesion Kinase (FAK) and integrin β 1 activation, and the stimulation of TRPV2 translocation to the plasmamembrane. Thus, our results provide new insights into the role of AM and TRPV2 in prostate and bladder malignancies.

Materials and methods

Cell culture

The human PCa cell line PC-3 was obtained from the ATCC and maintained in culture in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% FCS and 5 mM L-glutamine (Sigma). The urothelial cancer cell line T24/83 was obtained from the ECACC and maintained in culture in McCoy's 5A Glutamax® (Life technologies) supplemented with 10% FCS.

Small interfering RNA transfection

PC-3 and T24/83 cells were transfected with 50 nM small interfering RNA (siRNA) against TRPV2 (siTRPV2 sequence: 5'-UAAGAGUCAACCUCAACUAdT-3', synthesized by Eurogentec) using HiPerFect transfection reagent (Qiagen) following the manufacturer's instruction.

Ca²⁺ measurements using Fura-2 AM

Prior to fluorescence measurements, cells were trypsinized and transferred to glass slips. Cells were used 3 days after trypsinization. The medium was replaced every 48 h. The culture medium was replaced by an HBSS solution containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of this solution were adjusted to 310 mOsm l⁻¹ and 7.4, respectively. Dye loading was achieved by transferring the cells into a standard HBSS solution containing 1 mM Fura-2 AM (Calbiochem, Meudon, France) as described previously [11].

Reverse transcription-PCR

Total mRNA was isolated from cells as previously described [10]. DNA amplification conditions included an initial denaturation step of 7 min at 95°C; 35 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C, and 30 sec at 72°C; and finally 7 min at 72°C. Primers sequences and sizes of fragments was for RAMP2: forward 5'-CTCAGCCTCTTCCCACCAC-3', reverse 5'-TTCCAGCAAATTGGACAGC-3', 84 bp; for RAMP3 5'-ATCTCGGTGCAGTTGGTGA-3' and

5'- AAGGTGGACGTCTGGAAGTG-3', 77 bp; for CLR 5'-CATGGACAAATTATACCCAGTGT-3' and 5'-TCCAATTATGGTCAGGTAAAACAA3', 86 bp; for Actine 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' and 5'-GTTGAAGGTCTCAAACATGATC-3', 209 bp.

Cell adhesion assay

Cells were harvested and seeded at 1.5×10^4 cells/well in basal medium supplemented or not with AM (200 nM) on fibronectin (FN) pre-coated 96-well plates. After 2h of incubation at 37°C, cells were washed twice with medium, and the cell number was measured by MTS assay using CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation/Cytotoxicity Assay Kit according to manufacturer's instructions (Promega). Briefly, 20 μ l MTS solution was added to each well for 1h incubation and the absorbance at 490 nm was determined. Results are expressed in % of control.

Cell migration and invasion assay

Cell migration and invasion was determined by Boyden Chamber assay. Briefly, Cells were seeded on top of Transwell cell culture inserts with 8 μ m pore size (Falcon) at a density of 60,000 per well for PC-3 and 30,000 for T24/83 (24-well format) in serum-free culture medium. After 1h the molecule of interest was added. For the invasion assay, the upper compartment was coated with 50 μ g Matrigel (BD Biosciences) to form a matrix barrier. The lower compartment was filled with medium containing 10% SVF as chemoattractant. After 8h for the migration assay and 24h for invasion, non-migratory cells were removed from the top filter by scraping, whereas cells that had migrated through the filter pores to the lower face of the inserts were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and stained with Hoechst (5 mg/ml in PBS) and counted using a Leica DMIRB ($\times 200$). Results are expressed in % of control.

Biotinylation and western-blotting

The experiments were carried out as described previously [10]. Antibodies used were rabbit polyclonal anti-VRL-1 (for TRPV2, 1/200, Santa Cruz), anti-FAK (1/500, abcam), anti-FAK phosphor Y397 (1/1000, abcam), anti-integrin beta 1 phospho T788+T789 (1/1000, abcam), and anti-integrin beta 1 (1/200, Santa Cruz), and mouse monoclonal anti- β -actin (1/2000, Sigma-Aldrich).

Data analysis

Results were expressed as mean \pm SE. Plots were produced using Excel. Each experiment was repeated at least 3 times. n indicates the number of cells per experiment. N indicates the number of experiments performed. The Turkey-Kramer test was used for statistical comparison among means and differences, and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Adrenomedullin increases PC-3 and T24/83 cells adhesion, migration and invasion.

As shown by RT-PCR in figure 1A, the PCa cell line PC-3 expresses the two AM receptors, CLR/RAMP2 and CLR/RAMP3, whereas the UC cell line T24/83 only expresses CLR/RAMP3.

First we investigated cell adhesion to a major component of the basement membrane, the fibronectin (FN). We found that the addition of AM at 200 nM increased both PC-3 and T24/83 cells by 23% and 27% respectively (Fig.1B). Modification in cell-substrate adhesion could be the result of changes in the activity of adhesion receptors such as the integrin superfamily of receptors, which consist of heterodimers of α - and β - subunits recognizing different extracellular matrix (ECM) proteins. Since, in PCa cells β 1-integrin is the most abundant subunit expressed and is capable of forming heterodimers that bind to FN [13]; and there is also a correlation between increased β 1-integrin expression and more invasive and metastatic bladder cancer [14]. Activation of β 1-integrin leads to its phosphorylation, by western blotting we examined whereas AM could activates β 1-integrin by studying its phosphorylation on Thr-788-789 with a phospho-specific antibody. We observed that AM treatment did not change total β 1-integrin but increased the level of the phosphorylated form (Fig.1B).

Modification of adhesion might promote migration and invasion: two important malignancy-associated phenotypes. So, we examined the effect of AM treatment on these phenotypes by using Boyden Chamber (Transwell filter) assays. We found that the addition of AM at 200 nM increased the migration of PC-3 by 45% and T24/83 cells by 40% (Fig. 1C). Several studies showed that upon engagement with components of the ECM, integrins clustered leading to the activation of focal adhesion kinase (FAK) by autophosphorylation at Tyr397. The activation of FAK controls cell shape and motility [15]. We studied by western-blotting the activity of FAK with a specific antibody against phospho-Tyr397 FAK. As shown

in Fig.1C, total FAK was not affected by AM treatment but the level of its phosphorylated form has been significantly increased.

In addition, AM treatment increased the ability of cell invasion through the Matrigel-coated membrane by 54% in PC-3 cells and by 61% in T24/83 cells (Fig.1D).

TRPV2 mediates adrenomedullin promotion of migration and invasion on PC-3 and T24/83 cells.

We have previously shown that TRPV2 was involved in PCa cells migration and invasiveness [10-11] and was implicated in bladder cancer [12], we asked whether TRPV2 is expressed in T24/83 cells on protein level and, if so, whether its expression can be manipulated by siRNA-TRPV2 and whether altered TRPV2 levels have any impact on cells migration and invasiveness. Western-blot analysis with TRPV2-specific antibody has shown that TRPV2 protein is expressed in T24/83 cells and that protein expression can be effectively inhibited by cells treatment with siRNA-TRPV2 (50 nM, 48 h, Fig. 2A), as it is the case for PC-3 cells. Moreover, if addition of AM (200 nM) to the cells treated with control siRNA was able to enhance their adhesion to FN by 23% for PC-3 and 27% for T24/83 cells, silencing of TRPV2 with siRNA-TRPV2 not only decreased adhesion of PC-3 and T24/83 cells by 38% and 40% respectively, but also abolished stimulatory effects on adhesion by AM (Fig. 2B).

We next investigated the effect of the knock down of TRPV2 on cell migration by Boyden Chamber assay. As predicted the inhibition of TRPV2 expression decreased PC-3 cells migration, but also T24/83, by 55% and 60% respectively. As was shown for the adhesion, AM treatment on cells treated with siRNA-TRPV2 was no longer able to promote migration (Fig. 2C).

Finally, we examined the invasion of PC-3 and T24/83 cells through the Matrigel-coated membrane; and as observed for the adhesion and migration, siRNA-TRPV2 induced a decrease of both PC-3 and T24/83 invasion, by 52% and 67%. Addition of AM could not increase the invasion of PC-3 and T24/83 cells treated by siTRPV2 (Fig.2D).

AM induces TRPV2 translocation at the plasmamembrane via a PI3K pathway.

In view of TRPV2 involvement in AM effect on cell migration, we next examined by calcium imaging if AM could activate TRPV2. Acute application of AM to PC-3 and T24/83 did not cause elevation of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) on a short time-scale (i.e., within minutes), as one would expect from enhanced TRPV2-mediated Ca^{2+} entry (data not shown). However, prolonged 45 min long treatment of the two cell lines with AM induced an increase of the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level (PC-3: from control value of 100 nM to 180 nM in the presence of AM ;T24/83: 130 nM to 224 nM; Fig. 3A). The silencing of TRPV2 by siRNA (50 nM, 48h) decreased the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (PC-3: to 64 nM; T24/83: to 80 nM) suggesting that steady-state TRPV2-mediated Ca^{2+} influx contributes to the resting cytosolic Ca^{2+} concentration. Moreover, TRPV2 silencing also prevented the increase of basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in response to by AM treatment (Fig. 3A), consistent with the notion that prolonged incubation of PC-3 and T24/83 cells causes indirect activation of TRPV2 by AM via signaling pathway that requires some time to produce its effects.

It is known that AM can activate PI3K [6] and that PI3K activation can leads to TRPV2 translocation to the plasma-membrane [16]. So, we next sought to examined if the presence of TRPV2 at the plasma-membrane is dependent on AM and on the integrity of PI3K signaling pathway. To do so, T24/83 cells were treated with either AM (200 nM for 45 min) or AM plus PI3K inhibitor LY294.002 (10 μM , added 5 min prior to AM), and plasma-membrane localization was assayed by biotinylation. As shown in figure 3B, AM increased TRPV2 presence at the membrane, and this effect could be inhibited by LY294.002, suggesting the involvement of PI3K signaling in AM effect on TRPV2.

We also studied whether LY294.002 could impair PC-3 and T24/83 cells migration. By Boyden Chamber assay we shown that LY294.002 (10 μM) did not modified the basal migration but prevented the stimulatory effect of AM on both PC-3 and T24/83 cells (Fig. 3C).

Discussion

Partie en préparation, dans l'attente de résultats d'expériences *in vivo* en cours de réalisation.

Figures legends

Figure 1: Adrenomedullin increases PC-3 and T24/83 cells adhesion, migration and invasion. (A) RT-PCR experiment showing RAMP2, RAMP3 and CLR expression in PC-3 and T24/83 cells. (B) PC-3 and T24/83 cells adhesion was examined by seeding 1.5×10^4 cells per well in 96-well plates pre-coated with 10 $\mu\text{g/ml}$ FN, and incubated for 2h with or without AM (200 nM) (N=3. *, P<0.05 compared with control cells). $\beta 1$ integrin phosphorylation was studied by western-blotting on total proteins extracted from PC-3 and T24/83 cells seeded on FN coated plates and treated with or without AM. (C) PC-3 and T24/83 cell migration was studied by Transwell assay after 8h of treatment (N=3. *, P<0.05 compared with control cells). FAK phosphorylation was studied by western-blotting on total proteins extracted from PC-3 and T24/83 cells treated with or without AM. (D) For invasion assay, transwell membrane was pre-coated with 50 μg Matrigel, and PC-3 and T24/83 cells were let to invade for 24h (N=3. *, P<0.05 compared with control cells).

Figure 2: Adrenomedullin effect is mediated by TRPV2. (A) Western-blotting analysis of TRPV2 protein level in PC-3 and T24/83 cells treated with either siCTL or siTRPV2 (50 nM, 48h). Effect of TRPV2 silencing (siTRPV2, 50 nM, 48h) (B) on PC-3 and T24/83 cell adhesion to FN incubated or not with AM (200 nM, 2h) (N=3. *, P<0.05 compared with control cells; **, P<0.05). (C) on PC-3 and T24/83 cell migration examined by transwell assay after 8h incubation with or without AM (N=3. *, P<0.05 compared with control cells; **, P<0.05). (D) on PC-3 and T24/83 cell invasion through matrigel (AM 200 nM, 24h) (N=3. *, P<0.05 compared with control cells; **, P<0.05).

Figure 3: Adrenomedullin induces TRPV2 translocation to plasmamembrane. (A) The effect of AM (200 nM, 45 min) and TRPV2 silencing (siTRPV2, 50 nM, 48h) on basal cytosolic calcium of PC-3 and T24-83 cells was studied by calcium imaging. (n=120 cells, N=4, *, P<0.05 compared with control cells; **, P<0.05). (B) TRPV2 presence at the plasmamembrane was examined by biotinylation on T24/83 cells control or either treated with AM (200 nM, 45 min) or AM and PI3K inhibitor LY294.002 (10 μM , added 5 min before

AM). (C) Effect of LY294.002 on PC-3 and T24/83 cell migration examined by transwell assay after 8h incubation with or without AM (N=3. *, $P < 0.05$ compared with control cells; **, $P < 0.05$).

References

1. Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Apr 30;192(2):553-60.
2. Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):138-67. Review.
3. Kuwasako K, Kitamura K, Nagata S, Hikosaka T, Takei Y, Kato J. Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides*. 2011 Jul;32(7):1540-50. Epub 2011 May 27.
4. Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F. Adrenomedullin and cancer. *Regul Pept*. 2003 Apr 15;112(1-3):175-83..
5. Nakamura M, Han B, Nunobiki O, Kakudo K. Adrenomedullin: a tumor progression factor via angiogenic control. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006 Nov;6(7):635-43.
6. Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 2006 Jan 16;94(1):1-7.
7. Pomorski P. Calcium regulation of cell migration. *Postepy Biochem*. 2009;55(2):163-70.
8. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jun;2(6):387-96.
9. Bödding M. TRP proteins and cancer. *Cell Signal*. 2007 Mar;19(3):617-24. Epub 2006 Sep 3
10. Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pourtier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarsakaya N. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Mar;1793(3):528-39. Epub 2009 Jan 15.
11. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firliej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C, Delcourt P, Rassendren F, Bergerat JP, Ceraline J, Cabon F, Humez S, Prevarsakaya N. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res*. 2010 Feb 1;70(3):1225-35. Epub 2010 Jan 26.
12. Caprodossi S, Lucciarini R, Amantini C, Nabissi M, Canesin G, Ballarini P, Di Spilimbergo A, Cardarelli MA, Servi L, Mammana G, Santoni G. Transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2) expression in normal urothelium and in urothelial carcinoma of human bladder: correlation with the pathologic stage. *Eur Urol*. 2008 Sep;54(3):612-20. Epub 2007 Oct 16.
13. Haywood-Reid PL, Zipf DR, Springer WR, Haywood-Reid PL: Quantification of integrin subunits on human prostatic cell lines-comparison of nontumorigenic and tumorigenic lines. *Prostate* 1997, 31:1-8.
14. Fujita S, Suzuki H, Kinoshita M, Hirohashi S. Inhibition of cell attachment, invasion and metastasis of human carcinoma cells by anti-integrin b1 subunit antibody *Jpn J Cancer Res* 1992 83:1317-1326
15. McLean GW, Carragher NO, Avizienyte E, Evans J, Brunton VG, Frame MC: The role of focal-adhesion kinase in cancer--a new therapeutic opportunity. *Nature Rev Cancer* 2005, 5:505-515.
16. Boels K, Glassmeier G, Herrmann D, Riedel IB, Hampe W, Kojima I, Schwarz JR, Schaller HC. The neuropeptide head activator induces activation and translocation of the growth-factor-regulated Ca²⁺-permeable channel GRC. *J Cell Sci*. 2001 Oct;114(Pt 20):3599-606.

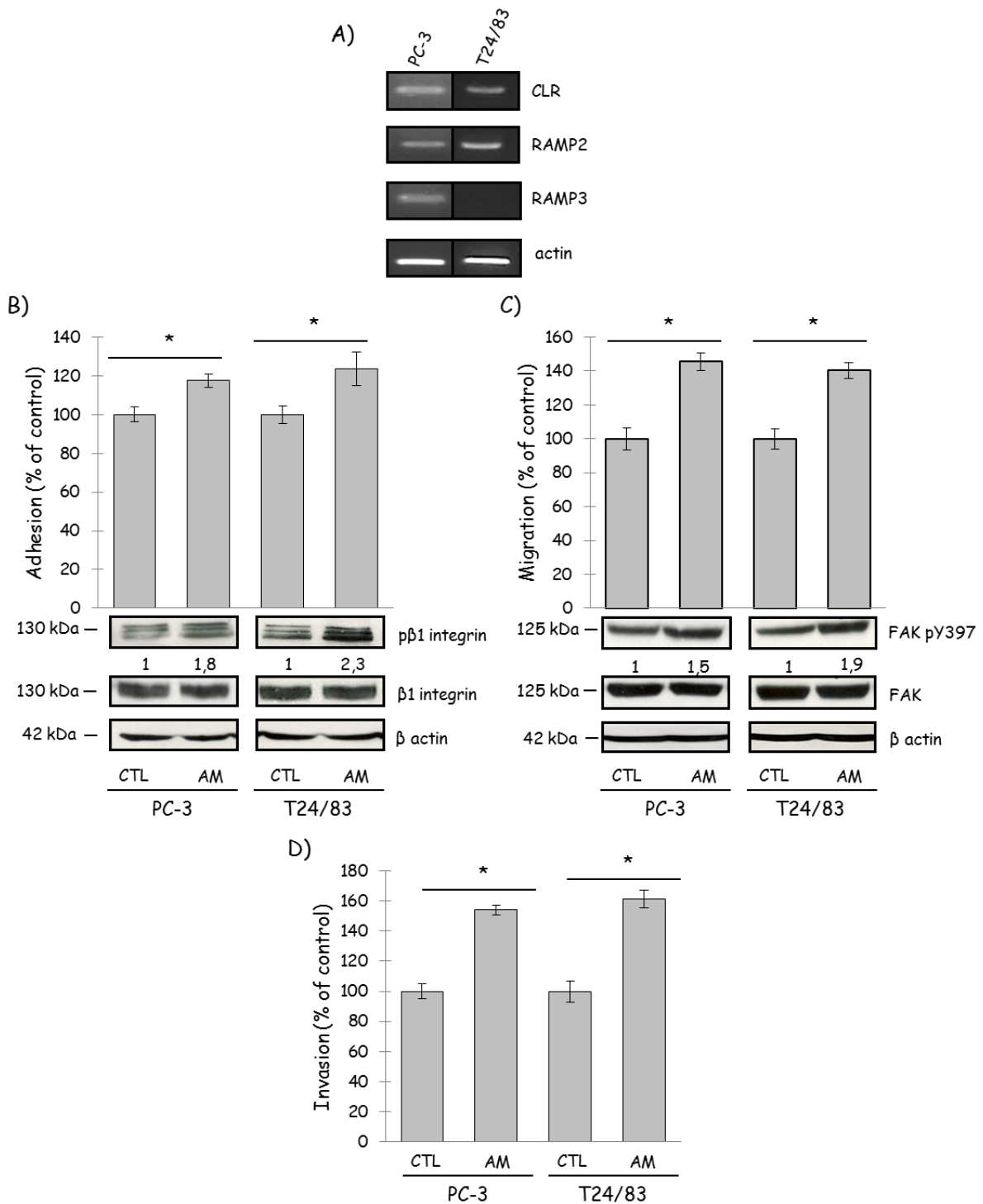


Figure 1: Adrenomedullin increases PC-3 and T24/83 cells adhesion, migration and invasion

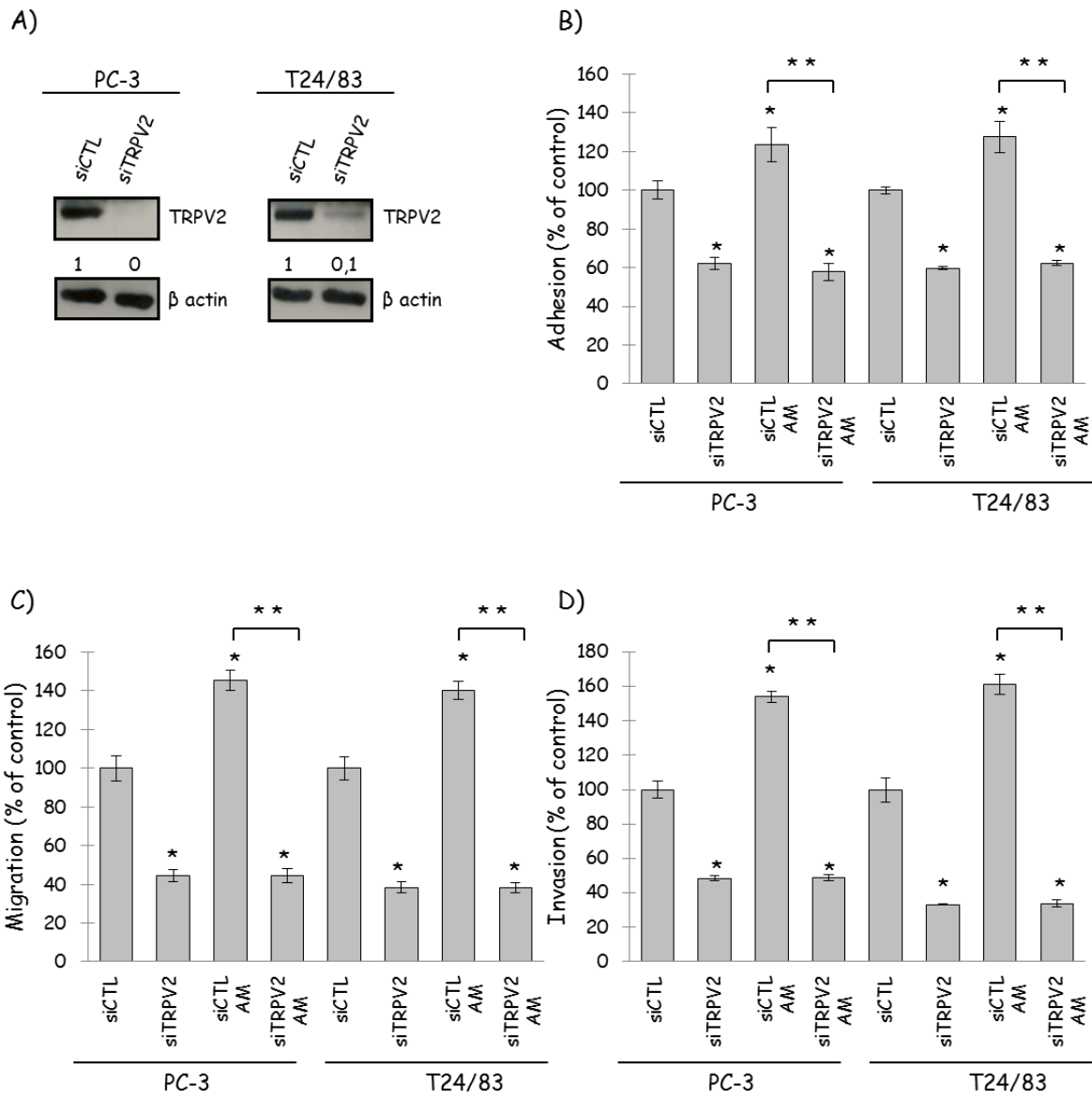


Figure 2 : Adrenomedullin effect is mediated by TRPV2

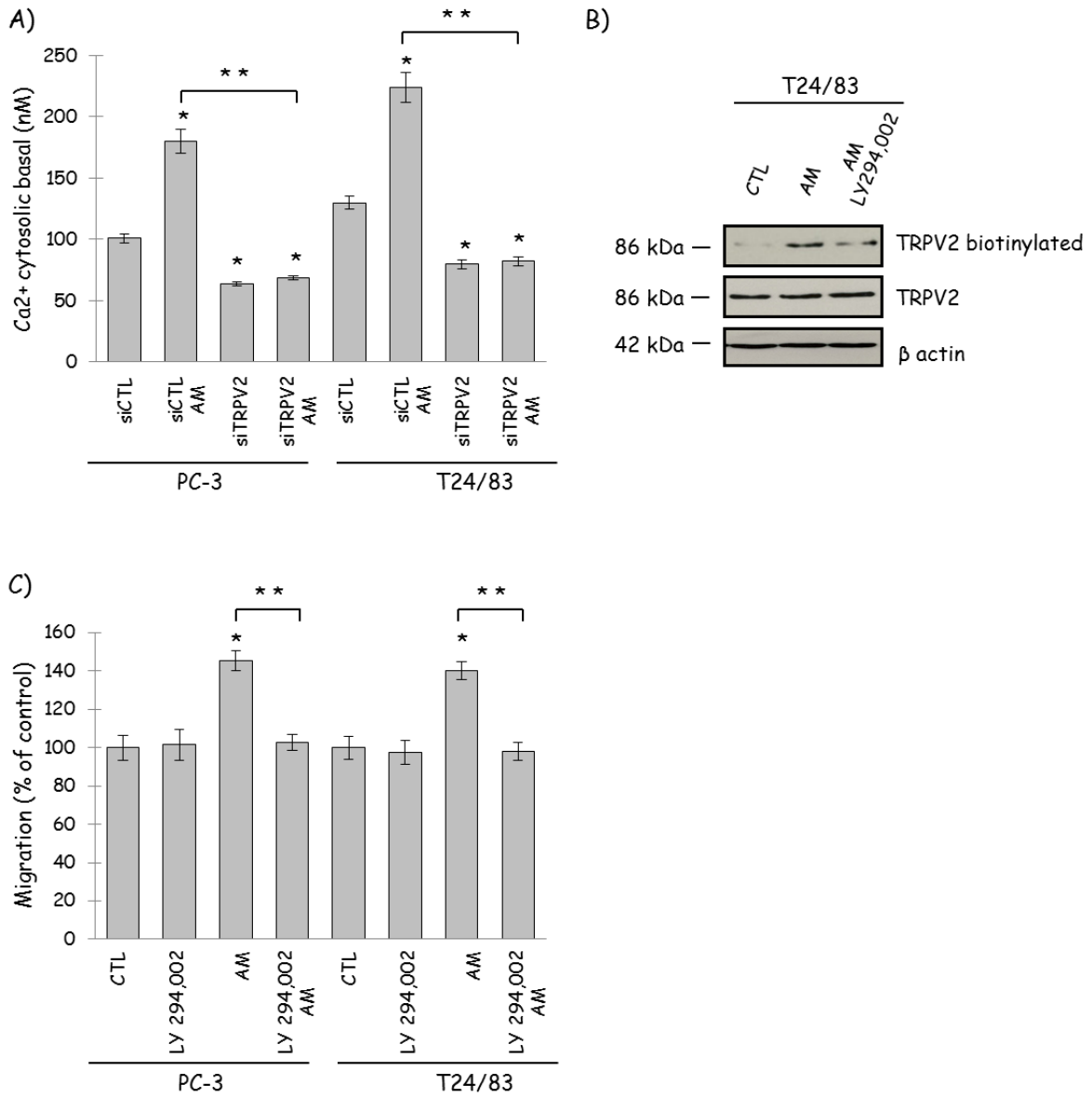


Figure 3 : Adrenomedullin induces TRPV2 translocation to plasmamembrane

Article 3

Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response. Involvement of GRP78

Mehdi Hammadi*, **Agathe Oulidi***, Florian Gackière, Maria Katsogianou, Christian Slomianny, Morad Roudbaraki, Etienne Dewailly, Philippe Delcourt, Gilbert Lepage, Sabine Lotteau, Sylvie Ducreux, Natalia Prevarskaya, Fabien Van Coppenolle

(* co-auteurs)

En préparation

Le RE joue un rôle essentiel dans l'homéostasie calcique intracellulaire, mais également dans la synthèse, les modifications post-traductionnelles et la conformation des protéines. Le maintien d'une concentration en calcium du RE élevée est essentiel pour l'exécution de ces processus.

Une dérégulation des mécanismes contrôlant cette homéostasie réticulaire est impliqué dans de nombreuses pathologies, telles que le diabète, certains désordres neurologiques et les cancers, certaines de ces maladies provoquant une vidange du calcium réticulaire et un stress réticulaire, pouvant mener à l'apoptose (pour revue : Mekahli et al., 2011). Néanmoins, dans les cas de cancers avancés, une résistance à l'apoptose induite par un stress réticulaire apparaît. Or, de plus en plus d'études montrent que des agents anticancéreux agiraient également *via* un stress calcique réticulaire (pour revue voir Boelens et al., 2007), ce qui pourrait expliquer la résistance à la chimiothérapie observée dans les cancers les plus avancés.

Cependant, les mécanismes dépendants du calcium régulant le stress réticulaire, et en particulier les canaux calciques du RE impliqué dans la modulation de l'homéostasie calcique lors d'un stress réticulaire ne sont pas encore bien connus. Il semble donc

important aujourd'hui de comprendre ces mécanismes de façon à pouvoir moduler la capacité cellulaire d'entrer ou non en apoptose suite à un stress calcique réticulaire.

Nous avons montré au laboratoire que le translocon est le canal de fuite calcique majoritaire du RE dans les cellules prostatiques cancéreuses. De plus, il a également été mis en évidence que l'induction d'un stress réticulaire par la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCA, qui provoque la vidange du calcium réticulaire) pouvait induire l'apoptose de ces cellules. Nous avons également montré que la puromycine (antibiotique maintenant le translocon ouvert) pouvait induire une fuite passive de calcium du RE par le translocon.

Dans cet article en préparation, nous nous sommes intéressés à caractériser la fuite calcique réticulaire provoquée par des agents inducteurs de stress réticulaire et de l'UPR, et à l'implication de GRP78 (chaperonne réticulaire impliquée dans l'UPR, et dans la résistance à la chimiothérapie) dans ces phénomènes.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que dans des conditions de stress réticulaire, le translocon est le canal de fuite majoritaire menant à la vidange des stocks calciques réticulaires et à l'apoptose. De plus, nous montrons qu'au cours du stress réticulaire, GRP78 (qui en condition contrôle est associée au translocon) voit son expression augmenter, et se détache du translocon.

Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response. Involvement of GRP78.

Mehdi Hammadi^{2,6}, Agathe Oulidi^{1,6}, Florian Gackiere³, Maria Katsogianou⁴, Christian Slomianny¹, Morad Roudbaraki¹, Etienne Dewailly¹, Philippe Delcourt¹, Gilbert Lepage¹, Sabine Lotteau⁵, Sylvie Ducreux⁵, Natalia Prevarskaya^{1,7} and Fabien Van Coppenolle^{5,7}

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire (Cellular Physiology Laboratory) ; INSERM U1003 ; Bâtiment SN3 ; Université des Sciences et Technologies de Lille ; 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

Present address : ² Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Moléculaire, JE 2530, 33 Rue Saint Leu, 80039 Amiens Cedex 1, France.

Present address : ³ Florian

Present address : ⁴ Maria

Present address : ⁵ Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires ; U.M.R. C.N.R.S. 5534 ; Université Claude Bernard Lyon 1 ; Bât. Dubois ; 43 bd du 11 Novembre 1918 ; 69622 Villeurbanne cedex ; France.

⁶ These authors equally contributed to this work.

⁷ These authors shared senior authorship.

Running title: Calcium permeability of translocon during ER stress and unfolded protein response.

Corresponding author:

Pr. Fabien Van Coppenolle

Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaires et Cellulaires ; U.M.R. C.N.R.S. 5534 ;

Université Lyon 1 ; Bât. Dubois ; 43 bd du 11 Novembre 1918 ; 69622 Villeurbanne cedex ;

France.

Tel. (33) 4 72 43 10 94

Fax (33) 4 72 44 79 37

E-mail: Fabien.Van-Coppenolle@univ-lyon1.fr

Abstract :

It is well known that endoplasmic reticulum (ER) store depletion occurs during unfolded protein response (UPR) and ER stress. Nevertheless, the ER calcium leak channels involved remain poorly understood. In previous studies, we have shown that translocon (TLC), an ER protein complex involved in translation, is one of the major ER calcium leak channel within LNCaP cells (Lymph Node Carcinoma of Prostate). Puromycin and anisomycin are antibiotics used to increase and to decrease permeability of TLC to calcium respectively. In the present work, we demonstrate that ER calcium depletion during ER stress occurs via TLC. GRP78 (BiP) is an ER chaperone protein used as an ER stress marker. ER stress induced by ER store depletion (due to thapsigargin or puromycin) or accumulation of misfolded proteins (treatments with brefeldin A, dithiothreitol or tunicamycin) is characterized by an increase in GRP78 mRNA level and in GRP78 expression in our cell model. In all previous conditions, anisomycin significantly reduces GRP78 mRNA level and GRP78 expression. So, we have shown that anisomycin is able to decrease ER stress. Furthermore, anisomycin inhibits ER calcium depletion induced by thapsigargin and tunicamycin. We also demonstrate that the inhibition of ER store depletion by anisomycin significantly reduces apoptosis induced by ER stress under thapsigargin and puromycin conditions. We suggest that TLC opening is also physiologically modulated by GRP78, especially during ER stress. Thus, we conclude that TLC is one of the ER calcium leak channels implied in ER store depletion during UPR and ER stress. Furthermore, we have shown, for the first time, that modulation of ER calcium permeability via TLC by puromycin or anisomycin is able to increase or to decrease ER stress respectively. An increasing number of studies suggest that ER stress is involved in several pathologies such as cancer. The ability to turn on or to turn off ER calcium permeability could be used as a novel therapeutic approach.

Introduction:

The endoplasmic reticulum (ER) is the major calcium store of the cells. ER calcium concentration is a balance between active calcium entry through SERCA (Sarco Endoplasmic Reticulum Calcium ATP-ases) and passive calcium leak. ER plays a crucial role in calcium homeostasis and cell physiopathology.

ER stress is a phenomenon that can be due among others stimuli to accumulation of unfolded proteins within the ER or to a calcium store depletion, and can lead to UPR (Unfolded Protein Response) (For review, [1,2]). UPR is involved in an increased number of pathologies such as cancer [3], diabetes [4], cardiac pathologies [5] and neurodegenerative diseases [6]. One pathway of UPR is an increased release of ER calcium to the cytosol. However, the ER calcium channels involved in ER calcium homeostasis during ER stress are still not well described. Indeed, only few data are available on the effects of ER stress inducers on the ER calcium content, while the modulation of ER calcium permeability during UPR could be useful to have a better understanding of ER calcium involvement in UPR and ER stress in physiology and under pathological conditions.

In previous studies, we have shown that translocon (TLC), a complex involved in protein translocation during translation [7], is an ER calcium leak channel [8,9]. The store depletion induced by puromycin, an antibiotic which maintains the TLC open, is able to activate calcium entry through Store Operated Channels [9]. In the same work, we have demonstrated that ER calcium depletion by thapsigargin (an inhibitor of SERCA pumps and an ER stress inducer) occurs mainly via translocon. So, TLC is a good candidate to be an ER calcium leak channel involved in store depletion during ER stress.

TLC is formed of the association of heterotrimeric proteins Sec61 α , Sec61 β and Sec61 γ [10] and other associated proteins like TRAM (translocation-associated membrane

protein). TLC is the widest pore known in the ER: 4 to 6 nm diameter with the ribosome. The ribosome-free TLC has a 0.9 to 1.5 nm diameter [11]. TLC is not only a complex used in protein translation and a calcium leak channel. It is also implied in the unfolded proteins retrotranslocation for their degradation by the proteasome. This process is called ERAD for ER-associated degradation (for review see, [12]).

Another point is that within the ER some chaperone proteins facilitate protein folding and prevent their aggregation. One of the best characterized chaperone proteins is the 78-kDa glucose-regulated protein GRP78, also referred to immunoglobulin binding protein BiP. This stress-inducible protein belongs to the heat shock protein family (HSP70) [13]. GRP78 binds to unfolded proteins using its peptide-binding domain and possess an ATPase domain to actively fold peptides [13,14]. The cycle ATP-bound form/ADP-bound form is regulated by Bip-associated protein (BAP), a mammalian ER nucleotide-releasing factor [15]. In addition, it is well known that GRP78 is a monitor of ER protein activities. GRP78 binds to the luminal part of ER membrane proteins like IRE1- α , PERK and ATF-6 to maintain them inactive. These proteins are involved in the UPR response pathway (For review, see, [3]). Upon unfolded protein accumulation and during ER stress, GRP78 is released from IRE1- α , PERK and ATF-6 which then trigger the UPR response.

In this report, we present a new mechanism involved in ER stress. Using calcium imaging and confocal microscopy, we have shown that TLC is an ER calcium leak channel involved in this ER store depletion during ER stress. Furthermore, we suggest that this depletion could be regulated by GRP78 in control and also in ER stress conditions. In our cell model, ER stress induces apoptosis and GRP78 over-expression. These phenomena was decreased by remaining TLC in a closed conformation by anisomycin, (a molecule used to inhibit the calcium leak through TLC [8,9,16,17]). The decrease of ER calcium leak via TLC inhibits apoptosis under ER stress conditions. In conclusion, we have shown that the amount

of calcium leak which occurs via TLC is directly linked to ER stress and especially to GRP78 expression. During ER stress, GRP78 over-expression maintains protein folding and also decreases the calcium leak via opened TLC which could lead to apoptosis.

Materials and methods:

Cell Culture. LNCaP cells from the American Type Culture Collection were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Fontenay sous Bois, France) supplemented with 5 mM L-glutamine (Gibco, L'Isle d'Abeau, France), 10% fetal bovine serum (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France) and 1% kanamycin (Gibco, L'Isle d'Abeau, France). Cells were routinely grown in 50 ml flasks (Nunc, Poly-labo) and kept at 37°C in a humidified incubator in an air/CO₂ (95/5%) atmosphere. For Ca²⁺ imaging experiments, the cells were subcultured in Petri dishes (Nunc) and used after 3-6 days.

Calcium Imaging. [Ca²⁺]_{in} was measured using either ratiometric dye fura-2 or fluo-4. Fura-2 fluorescence was quantified according to Grynkiewicz and Tsien formula [18]. The extracellular solution contained: NaCl-120, KCl-6, CaCl₂-2, MgCl₂-2, HEPES-10, and glucose-12. For Ca²⁺-free HBSS, CaCl₂ was removed and EGTA (0.5 mM) added. LNCaP cells were grown on glass coverslips and loaded with 5 μM of Fluo-4 AM or with 5 μM of Fura-2 AM for 25 min at 37°C or loaded with 5 μM of Fura-2 AM during 45 min at 37°C. Ratio imaging measurements of Fluo-4 were made using a confocal microscope (LSM 510, Zeiss, Le Pecq, France). The microscope was equipped with a 63x oil immersion objective (NA = 1.4). Fluo-4 was excited with the 488-nm line of an argon ion laser and the emitted fluorescent light measured at wavelengths > 505 nm. Images (512/512 pixels) were taken with a 5 seconds interval. Fluorescence of regions of interest were normalized to baseline fluorescence ($F_0[x]$).

Western blotting. Subconfluent LNCaP cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. The lysates were centrifuged 15,000 × g at 4°C for 20 minutes, mixed with a sample buffer containing: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromophenol blue Total

protein samples were subjected to 8%-10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry Western blotting (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked in a 5% milk containing TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) overnight then probed using specific rabbit polyclonal anti-GRP 78 (Novocastra) and anti- β -actin (Lab Vision Co.) antibodies. The bands on the membrane were visualized using enhanced chemiluminescence method (Pierce Biotechnologies Inc.).

Co-immunoprecipitation. Cells cultured at 80% of confluency were treated for 18 hours with puromycin 2 μ M or puromycin and anisomycin 0,2 μ M or thapsigargin 0,1 μ M or thapsigargin and anisomycin. Cells were then harvested and homogenized in 600 μ l of an ice-cold lysis buffer (pH7.4) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5mM EDTA, 1.1mM EGTA, 1mM PMSF, 1mM NaVO₄, 2 μ g/ml pepstatin, 2 μ g/ml aprotinin, 2 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml Trypsin inhibitor, 0.5-1%, Triton X-100), kept on ice for 1 hour, then centrifuged at 1000 rpm at 4°C for 10 min. Total protein (1 mg) was subjected to co-immunoprecipitation overnight at 4°C with protein A- or protein G-Sepharose 4B beads (Sigma-Aldrich) pre-incubated at 4°C for 1-2h with 1 μ g anti-sec61 α antibody (Santa Cruz). Proteins bound to the beads were washed three times with lysis buffer, then eluted by boiling the samples in Laemmli buffer, and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions and western-blotting, processed with anti-GRP78 (1:200) antibody (Santa Cruz).

Apoptosis.

The level of apoptosis was estimated from a number of apoptotic bodies visualizes by the Hoechst staining. The detailed procedure has been previously described [19].

RT-PCR. Reverse transcription-PCR was carried out as previously described [20]. The 398 bp GRP78 (HSPA5) isoform amplicon (accession number NM_005347) was amplified with 5'-CTGGGTACATTTGATCTGACTGG-3' (forward), nucleotides 1639-1661 and 5'-GCATCCTGGTGGTTTCCAGCCAT-3' (reverse), nucleotides 2036-2013 (Eurogentec,

Seraing, Belgium). The human 210 bp β -actin amplicon (NM_001101) internal control was amplified with 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' (forward), nucleotides 248-267 and 5'-GTTGAAGGTCTCAAACATGATC-3' (reverse), nucleotides 457-436. GRP 78 mRNA expression was validated by gel density analysis by using human β -actin mRNA as internal control.

Reagents and chemicals. All chemicals were purchased from Sigma (l'Isle d'Abeau, France) except Fura 2-AM and Fluo 4-AM (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands).

Data analysis and statistics. Each experiment was repeated several times. Data was analyzed using Origin 8.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA). Results were expressed as mean \pm SEM.

Results:

Translocon is the major calcium leak channel of the ER involved in thapsigargin-induced depletion. Anisomycin protects ER stores from tunicamycin-induced depletion.

Thapsigargin, a SERCA pump inhibitor, is used to deplete ER calcium store. The inhibition of active transport of calcium from the cytoplasm to the ER lumen displays ER calcium leak. Figure 1-A illustrates typical $[Ca^{2+}]_c$ traces in response to thapsigargin (1 μ M) in a Fura-2 loaded cell. Thapsigargin elicits a transient calcium increase in control conditions and in a calcium free medium. The mean of the peak was $265.3 \text{ nM} \pm 7.35 \text{ nM}$ (n=123). This result is in accordance of previous experiments [9]. We have shown that anisomycin, a peptidyl-transferase inhibitor, is used to decrease the ER store depletion via the translocon [8,9,16]. Under anisomycin (200 μ M) pre-treatment during one hour, thapsigargin response is lowered by 45% ($146.78 \text{ nM} \pm 6.25 \text{ nM}$; n=89) as compared with control. These results show that TLC is one of the major ER calcium leak channel of the ER. To illustrate this point, we used increasing anisomycin concentration pre-treatment during 25 minutes before thapsigargin (1 μ M) perfusion and calcium measurements. We hypothesized that decreasing the amount of opened translocon could slow down the speed of thapsigargin-induced store depletion. In order to check this hypothesis, we determined the time to peak of thapsigargin response after cells incubation with increasing concentration of anisomycin (from 0.2 μ M to 500 μ M). The time to peak shows the ability of ER to release the same amount of calcium. As shown in figure 1-B, anisomycin increases the time to peak and so decreases the speed of ER calcium depletion (control: $233.36 \text{ s} \pm 44.78 \text{ s}$ versus $475.19 \text{ s} \pm 38 \text{ s}$ with 500 μ M anisomycin which is a +103.63% increase). These data are in accordance with the fact that TLC is one of the major calcium leak channel of the ER. In conclusion, modulation of calcium permeability of translocon could modify the ER calcium homeostasis and physiological and /or pathological associated-processes. In figure 1-C and 1-D, we have used the amplitude of thapsigargin

response as a marker of ER calcium content. As shown in figure 1-C, tunicamycin pretreatment significantly reduces thapsigargin response after 2 hours and 3 hours (respectively -60% \pm 4%, n=28; -90% \pm 2%, n=34). So, tunicamycin, an inducer of UPR also lead to a calcium store depletion. With time, the enhanced calcium leak progressively empties the ER lumen. It explains the lowered thapsigargin response in tunicamycin condition. These results are in accordance with those of Bonilla and coll. [21]. During ER stress, an ER calcium leak occurs and so depletes the store with time. In our previous work, we proved that translocon is a calcium leak channel of the ER. Anisomycin is able to inhibit this calcium efflux. As shown in figure 1-D, tunicamycin pretreatment (0.5 μ g/ml during 25 minutes) significantly reduces thapsigargin response (-52.5% \pm 3.34; n=57) as compared to control condition. Anisomycin alone, at 2 μ M (during 25 min) slightly decreases thapsigargin response (-10.8% \pm 1.52; n=35). On the contrary, in the presence of both tunicamycin (0.5 μ g/ml) and anisomycin (2 μ M), the thapsigargin-induced store depletion is not significantly different from the control condition (+8.7% \pm 2.35, n=55). So, the ER calcium content was not significantly different in control conditions, in anisomycin and in tunicamycin + anisomycin conditions. Nevertheless, the ER calcium stores were partially depleted by a pre-treatment with tunicamycin. It is so obvious that the ER stress induced by tunicamycin implies an ER calcium store depletion via the translocon. This calcium leak could be pharmacologically decreased by anisomycin which reduces the calcium permeability of TLC [8,22].

Decrease of GRP78 mRNA level by anisomycin during ER stress.

It is well known that GRP78 is inducible by ER stress [13]. We induced an ER stress using 2 μ M puromycin (which maintains TLC opened and leads to ER store depletion), or 0.1 μ M thapsigargin (a SERCA pump inhibitor), or tunicamycin 5 μ g/ml (a N-glycosylation inhibitor), or 1 mM dithiothreitol (DTT; an inhibitor of protein disulfite bonds formation), or 50 μ M Brefeldin A (BFA; an inhibitor of the assembly of the Golgi apparatus) during 18

hours (Figure 2). As shown in the RT-PCR analysis (figure 2-A), GRP78 mRNA could be detected by a 398 bp. We used β -actin as internal control. Each ER stress inducers enhance GRP78 mRNA level as compared with control level. In the previous experimental conditions, we have also added 0.2 μ M anisomycin. Anisomycin and puromycin are translation inhibitors. The β -actin mRNA levels were similar under anisomycin (0.2 μ M) and puromycin (2 μ M) conditions. Anisomycin significantly decreased GRP78 mRNA levels in control conditions or associated with puromycin, thapsigargin and tunicamycin as shown by the GRP78 mRNA/ β actin mRNA ratio. These data shows that anisomycin decreases ER stress. So, diminishing ER calcium leak through TLC is a way to slow down ER stress.

Decrease of GRP78 protein level by anisomycin during ER stress.

As mentioned earlier, anisomycin is a translation inhibitor. So, before doing western blot analysis of GRP78, we have done dose-effect experiments of anisomycin action on protein synthesis. At 0.2 μ M, the concentration used in the following experiment, anisomycin is without effect on protein synthesis (data not shown). Like anisomycin, puromycin is a translation inhibitor. A 2 μ M puromycin treatment do not reduce β -actin synthesis (data not shown). The same experimental conditions of RT-PCR analysis of GRP78 mRNA level were used to measure GRP78 protein level in Western Blot (during 18 hours: 2 μ M puromycin, 0.1 μ M thapsigargin, tunicamycin 5 μ g/ml, 1 mM dithiotreitol and 50 μ M Brefeldin A with or without 0.2 μ M anisomycin). The immunoblot shows detection of 78 kDa GRP 78. As expected, all ER stress inducers clearly increased cellular level of GRP78 (figure 3). To determine the role of calcium leak and ER store depletion via TLC, anisomycin was added combined with the ER stress inducers. Anisomycin treatments significantly decreases GRP78 synthesis. The results suggest that the inhibition of ER calcium leak under ER stress inducers treatment is probably able to maintain an ER calcium homeostasis and prevents ER stress. In conclusion of these experiments, there is probably a link between ER calcium content and ER

stress. Decreasing the calcium leak maintains ER calcium content into the lumen and inhibits ER stress and so GRP78 upregulation.

Anisomycin treatment reduces association between sec 61 α and GRP78 in both control conditions and following an ER store depletion.

Sec 61 α is a pore protein of the translocon [23]. In our previous work, we detected this protein to localize the TLC within LNCaP cells [8]. GRP 78 seals the TLC pore under control conditions [23]. We used co-immunoprecipitation (Co-IP) experiment to test potential association and, consequently regulation by GRP 78 of the opening of TLC during an ER stress and anisomycin treatment. The immunoblot clearly reveals the 78 kDa band of the GRP 78 protein and its 72 kDa isoform. The cells were treated with anisomycin (0.2 μ M), puromycin (2 μ M) or thapsigargin (0.1 μ M) during 18 hours. Anisomycin significantly reduces co-immunoprecipitation between Sec 61 α and GRP 78 in control condition and during ER stress inflicted by puromycin or thapsigargin treatment (Figure 4). During an ER stress, GRP 78 overexpression is likely to close the translocon pore and therefore reduces ER calcium leak. As anisomycin inhibits both calcium leak (Figure 1), GRP 78 mRNA level (Figure 2) and expression (Figure 3), its effects on the inhibition of ER calcium leak through TLC is similar to GRP78 overexpression during ER stress. In both control conditions and under ER stress, anisomycin protects cells from ER store depletion. So ER stress is reduced, no GRP 78 overexpression occurs and association between sec 61 α and GRP 78 diminishes.

GRP 78 involvement in apoptosis during ER stress.

In a previous work, we have shown that LNCaP cells undergo apoptosis due to the ER store depletion [19,24]. Thapsigargin, like puromycin, induces calcium release from the ER via TLC. This release can be blocked by Anisomycin blocks this release [8,9] and prevents ribosome binding to the TLC keeping it closed. TLC permeability to calcium modulates luminal calcium concentration (Figure 1). We next examined the potential role of calcium

leak via TLC in the induction of LNCaP apoptosis. Apoptosis was evaluated using Hoechst staining after 18 hours, 24 hours or 48 hours of treatment with either 0.1 μM thapsigargin, or with 2 μM puromycin alone or in combination with 0.2 μM anisomycin. As shown in figures 5-A and 5-B, anisomycin does not significantly increase apoptosis on its own as compared to the control. LNCaP cells apoptosis increased over time in the presence of thapsigargin (Figure 5-A), confirming our previous findings [19]. The ER store depletion induced by SERCA pump inhibition leads to apoptosis (18h: 3.25% \pm 0.4; 24h: 12.85% \pm 1.25; 48h00: 22.98% \pm 0.63). Anisomycin (0.2 μM) significantly reduced apoptosis when applied with thapsigargin after 24 hours and 48 hours of treatment (7.01 \pm 0.35% and 15.12 \pm 0.55%, respectively). Similar results were observed with puromycin (Figure 5-B). Puromycin directly acts on translocon to maintain the pore in an open state at the end of the translation. Like thapsigargin, puromycin induces apoptosis upon 18, 24 and 48 hours of treatment (5.12 \pm 0.82%; 13.55 \pm 2.1% and 37.01 \pm 1.18%, respectively). Anisomycin significantly reduces apoptosis following puromycin treatments for 24 and 48 hours (7.2 \pm 1.08% and 22.73 \pm 1.98%, respectively). To summarize, these findings suggest that the ER store depletion via TLC is central in the induction of apoptosis. TCL inhibitor, anisomycin can diminish the cell death pointing to the link between the ER calcium leak channel and cell death.

Discussion:

Perturbation of UPR could causally contribute to many diseases including cancer [3], diabetes of type 1 and type 2 ([25]), cardiopathologies [5], and neurodegenerative disorders [6]. Subsequently, there is a need for tools designed to modulate UPR pathways and their interconnections within cellular homeostasis. ER stress and UPR are linked to the ER store depletion [1,2,26,27]. However, the ER calcium leak channels involved in calcium release upon UPR, as well as their regulators have been unknown and remain largely enigmatic. In this study, we present evidence pointing to a new mechanism of ER calcium release during ER stress and UPR via TLC. In addition, our data also suggest that GRP78 protein may serve a regulatory function. We have analyzed how gating of the TLC, an ER calcium leak channel [8], modulates ER calcium content and apoptosis triggered by the ER stress. Specifically, we have shown that TLC is a calcium leak channel involved in UPR and in the ER stress. We further demonstrated that TLC inhibitor anisomycin reduces ER calcium release via translocon and decreases GRP78 (also called BiP) mRNA level and GRP78 protein expression during ER stress. Anisomycin also slows down apoptosis in human cancerous prostatic cells. Based on these observations, we suggest that GRP78, which plugs TLC [28], is a key factor to maintain the calcium store concentration to a sufficient level to avoid apoptosis under normal physiological conditions. During the ER stress associated with a subsequent GRP78 overexpression [13] its potential role in maintenance of calcium homeostasis is signified: increased GRP78 levels are likely serve beneficial function in tolerance to apoptosis via decreased ER calcium leak through the TLC.

It is well known that ER calcium plays an essential role in many physiological processes from cell proliferation to apoptosis (for revue, see, [29,30]). ER calcium concentration is determined through a balance between calcium entry mediated by a SERCA pumps and calcium release through calcium leak channels. We have demonstrated in our previous works

that TLC is one of the major ER calcium leak channel in human cancerous prostatic cell line, LNCaP [8,9]. We have also shown that TCL acts as a calcium release channel in acinar pancreatic cells [16]. Using LNCaP cells, we have shown that ER calcium depletion triggers apoptosis [19]. Thus, we hypothesized that UPR could lead to an ER calcium release via TLC and induction of apoptosis, if the ER remains depleted. To test this hypothesis, we have used anisomycin to reduce TLC permeability to calcium [9]. We here used thapsigargin, an inhibitor of SERCA pumps, to visualize ER calcium release (figure 1). The time to peak of the ER store depletion induced by thapsigargin was decreased with anisomycin treatment. These results are in accordance with the fact that TLC is a major ER calcium leak channel in LNCaP cells.

We next undertook measurements of the ER calcium content during the UPR. To check the involvement of TLC in the UPR, we used anisomycin to prevent tunicamycin effects. Tunicamycin is an inhibitor of N-glycosylation. Tunicamycin treatment is commonly used to trigger UPR [31]. In our experiments, tunicamycin treatment significantly decreased the content of the ER calcium stores (Figure 1) confirming proposed hypothesis that decrease of luminal calcium concentration of the ER is one of the early steps of the UPR [32]. The ER calcium leak channels involved in the ER stress remain poorly characterized. We pursued the suggestion that TLC might be a good potential candidate involved in this process. Anisomycin, a TCL inhibitor abolished tunicamycin-induced ER depletion being neutral to the basal calcium content in the store. These experiments confirm that TLC is one of the leak channels involved in ER store depletion during ER stress. Interestingly, TLC appears to be a common way used to perform unfolded proteins retrotranslocation [33]. UPR is associated with the ERAD. The misfolded proteins are retro-translocated through the translocon to the cytoplasm to be degraded by the proteasome pathway (for review, see [3]). Thus, during UPR and the retro-translocation of the misfolded proteins, an ER calcium leak via TLC may

occur simultaneously. Anisomycin, while ineffective in the accumulation of misfolded proteins, reduces the calcium leak through TLC. Consequently, anisomycin prevents ER store depletion and ER stress.

To connect TLC permeability to calcium to the ER stress and the subsequent apoptosis, we assessed the effects of anisomycin pre-treatment on the expression of GRP78, an ER stress marker [13]. At the concentration used [8], anisomycin was ineffective to affect β -actin (data not shown) suggesting no impact on general protein translation. We used tunicamycin, DTT and BFA in our experiment to trigger the UPR by different pharmacological approach. Thapsigargin and puromycin were employed to deplete the ER of calcium. Enhanced ER stress was marked by increased GRP78 mRNA level and protein expression (Figures 2 and 3); anisomycin pre-treatment was sufficient to decrease both GRP78 mRNA level and GRP78 expression. Thus TLC can serve a target to modulate the ER stress.

As mentioned in several studies (for review, see [1,2,3]), a mild ER stress promotes cell survival in part due to GRP78 overexpression. On the contrary, a prolonged ER stress turns the balance toward cell death. It is evident that UPR and apoptosis are linked to calcium signaling and particularly to ER store depletion ([26,27]. The cell death signal transduction pathways involve activation of caspase-12 [34], increase in CHOP expression [35], and release of ROS (reactive oxygen species) from the mitochondria, which in turn can be triggered by the increased cytoplasmic calcium concentration consequently to the ER depletion) [36,37]. Our results demonstrate that modulation of TLC permeability with either puromycin or anisomycin, respectively, enhances or decreases apoptosis. We used thapsigargin or puromycin to deplete ER stores with or without anisomycin (Figure 5). As expected, the ER store depletion, either due to SERCA pump inhibition (with thapsigargin) or due to the increase in the calcium leak through TLC (under puromycin treatment), provokes

dramatic increase in apoptosis. Remarkably, the addition of anisomycin promotes cell survival. Taken together, our results indicate that ER store depletion mainly occurs via TLC during the ER stress and induces apoptosis.

The UPR mechanism is a major quality control of the cells. Chemical chaperones are used by the cells to restore ER function and ER homeostasis [13]. During unfolding protein accumulation within the ER, as mentioned earlier, cells overexpress chaperone proteins such as GRP78 [13]. The evolution of GRP78 level acts as a stress sensor. Under control conditions, GRP78 binds to TLC [28] and to other ER proteins like protein kinase IRE1 (inositol-requiring kinase 1), PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase), and the transcription factor ATF6 (activating transcription factor 6) [14]. IRE1, PERK and ATF6 are constitutively expressed and inactivated by GRP 78, which prevents their dimerization (figure 6). Accumulation of unfolded proteins in the lumen of the ER releases GRP 78 from TLC, IRE1, PERK and ATF6. At this time, UPR pathways are activated. Remained unfolded proteins are retrotranslocated to the cytoplasm via TLC and are then degraded by the proteasome [38]. To better understand calcium leak regulation by translocon and GRP78, we looked at interaction between GRP78 and Sec 61 (a protein of the pore of the translocon). GRP78 co-immunoprecipitates with Sec 61 (Figure 4). Co-immunoprecipitation may be affected by the amount of available GRP78 that will be reduced by involvement in other biochemical processes, e.g. modulation of luminal signal transductions involving IRE1 α , ATF-6 and PERK. We found that the ER stress induced by ER store depletion reduces the interaction of the two proteins as revealed by co-immunoprecipitation experiments. We speculate that in our experimental model, the decrease in co-immunoprecipitation is probably due to the release of GRP78 from the translocon (a redistribution of GRP78 from its partners in the ER membrane to the ER lumen). In these conditions, the pore of the TLC should be open and calcium will leak from the lumen to the

cytoplasm (Figure 6). This in turn will modify the equilibrium between calcium re-uptake and calcium leak within the ER leading to ER calcium depletion, to an ER stress and so to apoptosis. However, the decrease in the co-immunoprecipitation between GRP 78 and TLC by anisomycin is probably due to the decrease in the GRP 78 mRNA level GRP 78 protein expression (Fig. 2 and 3). Anisomycin inhibits ER calcium leak through translocon and thus has similar effects as the GRP78 overexpression during ER stress (Figure 6).

CONCLUSION

To summarize, this study is the first description of a new mechanism involving TLC as an ER calcium leak channel in the ER stress. In this study, we report three major findings. First, under UPR and ER stress conditions, TLC is one of the major ER calcium leak channel involved in the pathway leading ER store depletion and to cell death. Second, anisomycin inhibits ER calcium depletion via TLC and also decreases ER stress and apoptosis under UPR conditions. Overexpressed GRP78/Bip during UPR and ER stress probably plugs TLC and minimizes ER store depletion. Finally, pharmacological tools that modulate ER calcium leak from TLC and could be helpful in the understanding and in the treatment of pathologies involving deregulation of the ER stress.

This work was supported by : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (I.N.S.E.R.M.), Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.), Ligue Nationale Contre le Cancer, Association pour la Recherche contre le Cancer (A.R.C.), and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

We thank Dr. Irina Korichneva for reading the manuscript.

Legends :

Figure 1:

Anisomycin treatment inhibits calcium release from the ER induced by thapsigargin or tunicamycin.

A- Time course of thapsigargin (1 μM) response of FURA-2 LNCaP loaded cells in control conditions and after 1 hour pre-treatment with 200 μM anisomycin. Anisomycin inhibits the ER calcium leak occurring through the translocon from the lumen to the cytoplasm. B- The time to peak (mean \pm SEM) of thapsigargin (1 μM) action on cytosolic calcium concentration. The cells were pre-incubated with several concentrations of anisomycin (from 0.2 μM to 500 μM) during 25 minutes prior to thapsigargin perfusion. Increasing anisomycin concentrations reduce ER calcium release induced by thapsigargin. C- Cumulative data (mean \pm SEM) for the amplitude of the ER calcium release after 1 μM thapsigargin treatment of LNCaP cells. The thapsigargin response is proportional to the ER calcium concentration. Tunicamycin (0.5 $\mu\text{g/ml}$) significantly depletes the store after 2 hours (n=28) and 3 hours (n=34) of treatment as compared to the control (n=37). D- Cumulative data (mean \pm SEM) illustrating the thapsigargin (1 μM) response in control conditions (n=37) and after 30 minutes treatments by tunicamycin (0.5 $\mu\text{g/ml}$; n=48), anisomycin (2 μM ; n=57), or tunicamycin (0.5 $\mu\text{g/ml}$) combined with anisomycin (2 μM ; n=35). Significance was established at levels of $p < 0.001$ (**).

Figure 2:

Anisomycin reduces GRP78 mRNA levels in control condition and during ER stress: RT-PCR analysis of the GRP78 mRNA in LNCaP cells.

A- GRP78 mRNA levels are evaluated using semi-quantitative RT-PCR with or without 18 hour treatments with ER stress inducers (puromycin, 2 μM ; thapsigargin, 0.1 μM ; tunicamycin, 5 $\mu\text{g/ml}$; dithiotreitol, 1 mM, and brefeldin A, 50 μM) combined with

anisomycin 0.2 μ M. The predicted size of the amplified product is 398 pb. β -actin was used as an internal standard. Values represent the relative amounts of GRP78mRNA as compared to β -actin mRNA. Experiments were performed in triplicate.

Figure 3:

Anisomycin reduces GRP78 expression in control condition and during ER stress: Western blot analysis of GRP 78.

GRP78 expression was evaluated using Western blot analysis in similar conditions described in the legend to Fig. 2. The predicted molecular weight is 78 kDa. Bottom: β -actin expression serves a control for total protein amount. Band intensity was determined by densitometry scanning and adjusted to the actin levels. Experiments were performed in triplicate.

Figure 4:

Anisomycin decreases interactions between Sec 61 α (TLC) and GRP78/Bip.

Interactions between Sec 61 α and GRP78/Bip was assessed by co-immunoprecipitation assay. The cells were treated during 18 hours with either puromycin 2 μ M, puromycin and anisomycin 0,2 μ M, thapsigargin 0,1 μ M, or thapsigargin and anisomycin. LNCaP extracts were immunoprecipitated by the anti-Sec 61 α antibody and detected with the anti-GRP78 antibody. Experiments were performed in triplicate.

Figure 5:

Store depletion induced by thapsigargin or puromycin triggers apoptosis in LNCaP cells.

A- Cumulative data (mean \pm SEM) of temporal changes in apoptotic response of the LNCaP cells treated with thapsigargin (0.1 μ M) alone, or in association with anisomycin (0.2 μ M). B- Cumulative data (mean \pm SEM) of temporal changes in apoptotic response induced by puromycin (2 μ M) with or without anisomycin (0.2 μ M). Experiments were performed in triplicate. Significance was established at levels of $p < 0.01$ (*) and $p < 0.001$ (**).

Figure 6: GRP78 modulates translocon opening and Ca²⁺ releasing during UPR response and ER stress. In basal conditions, GRP78 binds the UPR transducers (PERK, IRE1 and ATF6) into an inactive form and seals the TLC pore (upper part). During UPR response and ER stress, GRP78 is released in the lumen of the endoplasmic reticulum inducing activation of UPR transducers to trigger apoptosis pathways. Loosing interactions between GRP78 and TLC allows Ca²⁺ release *via* the TLC pore from endoplasmic reticulum to cytoplasm and induces caspase 12-dependent apoptosis (lower part). ER stress conditions can be reproduced using puromycin. ER-stress-associated GRP78 overexpression, TLC-dependent Ca²⁺ release and apoptosis can be reduced by anisomycin treatment.

Bibliography:

1. Rasheva VI, Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14: 996-1007.
2. Austin RC (2009) The unfolded protein response in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 11: 2279-2287.
3. Tsai YC, Weissman AM (2010) The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer* 1: 764-778.
4. Cunard R, Sharma K (2011) The endoplasmic reticulum stress response and diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 300: F1054-1061.
5. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M (2010) Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res* 107: 1071-1082.
6. Matus S, Glimcher LH, Hetz C (2011) Protein folding stress in neurodegenerative diseases: a glimpse into the ER. *Curr Opin Cell Biol* 23: 239-252.
7. Gorlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75: 615-630.
8. Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, *et al.* (2004) Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci* 117: 4135-4142.
9. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, *et al.* (2006) Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *Faseb J*.
10. Gorlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71: 489-503.
11. Hamman BD, Chen JC, Johnson EE, Johnson AE (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89: 535-544.
12. Hoseki J, Ushioda R, Nagata K (2010) Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* 147: 19-25.
13. Lee AS (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35: 373-381.
14. Hendershot LM (2004) The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med* 71: 289-297.
15. Chung KT, Shen Y, Hendershot LM (2002) BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP. *J Biol Chem* 277: 47557-47563.
16. Lomax RB, Camello C, Van Coppenolle F, Petersen OH, Tepikin AV (2002) Basal and Physiological Ca²⁺ Leak from the Endoplasmic Reticulum of Pancreatic Acinar Cells. Second Messenger-Activated Channels And Translocons. *J Biol Chem* 277: 26479-26485.
17. Benedetti C, Fabbri M, Sitia R, Cabibbo A (2000) Aspects of gene regulation during the UPR in human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 278: 530-536.
18. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
19. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Van Coppenolle F, Shuba Y, *et al.* (2000) Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 527 Pt 1: 71-83.

20. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 39: 357-366.
21. Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO Journal* 21: 2343-2353.
22. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, *et al.* (2006) Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* 20: 1215-1217.
23. Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE (2005) The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168: 389-399.
24. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, *et al.* (2002) Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1: 169-179.
25. Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140: 900-917.
26. Zhang K, Kaufman RJ (2008) From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 454: 455-462.
27. Peters LR, Raghavan M (2011) Endoplasmic reticulum calcium depletion impacts chaperone secretion, innate immunity, and phagocytic uptake of cells. *J Immunol* 187: 919-931.
28. Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92: 747-758.
29. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 11: 609-618.
30. Parkash J, Asotra K (2010) Calcium wave signaling in cancer cells. *Life Sci* 87: 587-595.
31. Fu M, Li L, Albrecht T, Johnson JD, Kojic LD, *et al.* (2011) Autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase regulates ER stress and cell death through control of ER calcium release. *Cell Death Differ* 18: 1057-1070.
32. Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* 21: 2343-2353.
33. Hegde RS, Ploegh HL (2010) Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 22: 437-446.
34. Obeng EA, Boise LH (2005) Caspase-12 and caspase-4 are not required for caspase-dependent endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280: 29578-29587.
35. Copanaki E, Schurmann T, Eckert A, Leuner K, Muller WE, *et al.* (2007) The amyloid precursor protein potentiates CHOP induction and cell death in response to ER Ca²⁺ depletion. *Biochim Biophys Acta* 1773: 157-165.
36. Sanges D, Marigo V (2006) Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF. *Apoptosis* 11: 1629-1641.
37. Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L (2011) Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
38. Kaneko M, Nomura Y (2003) ER signaling in unfolded protein response. *Life Sci* 74: 199-205.

Figure 1

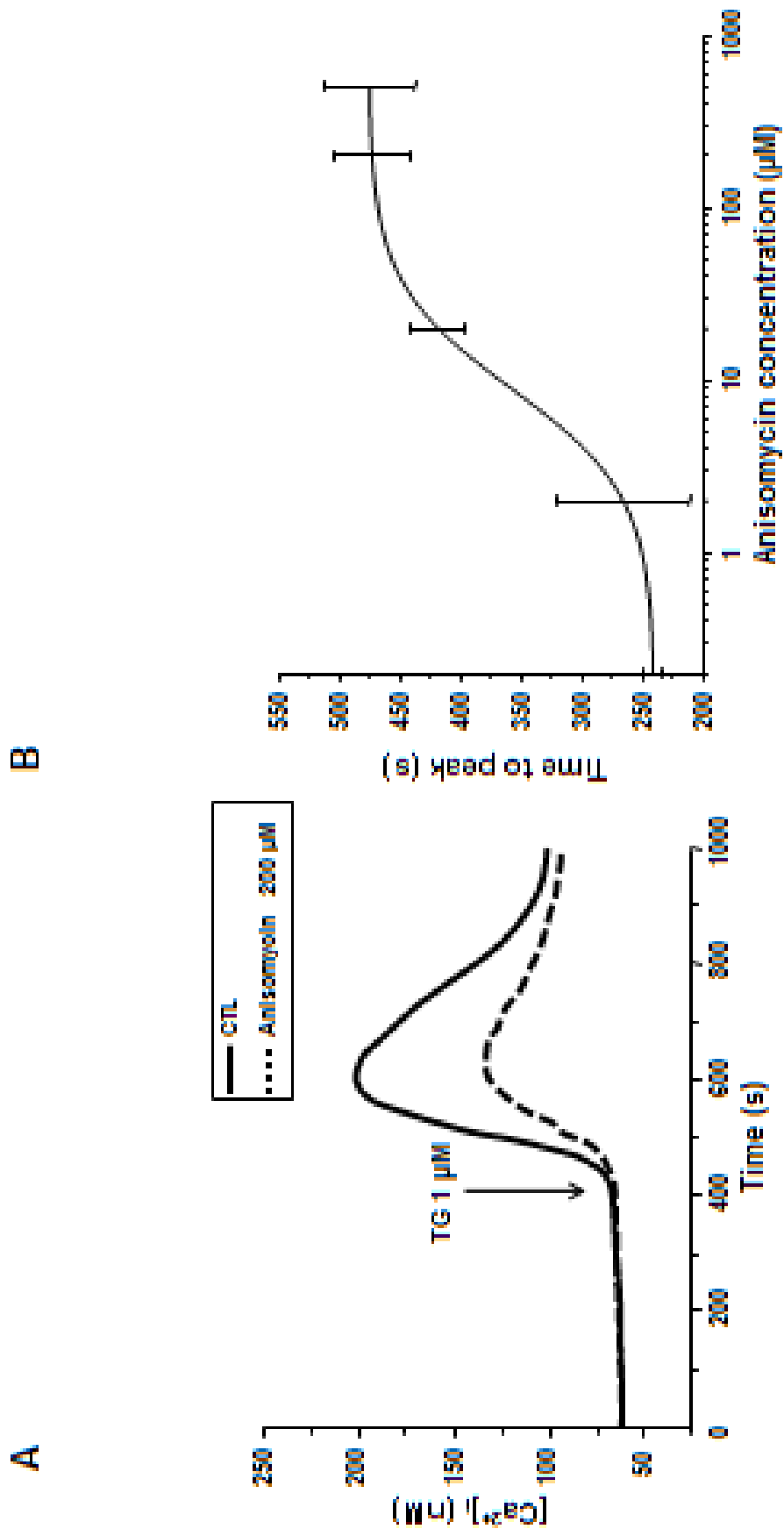


Figure 1

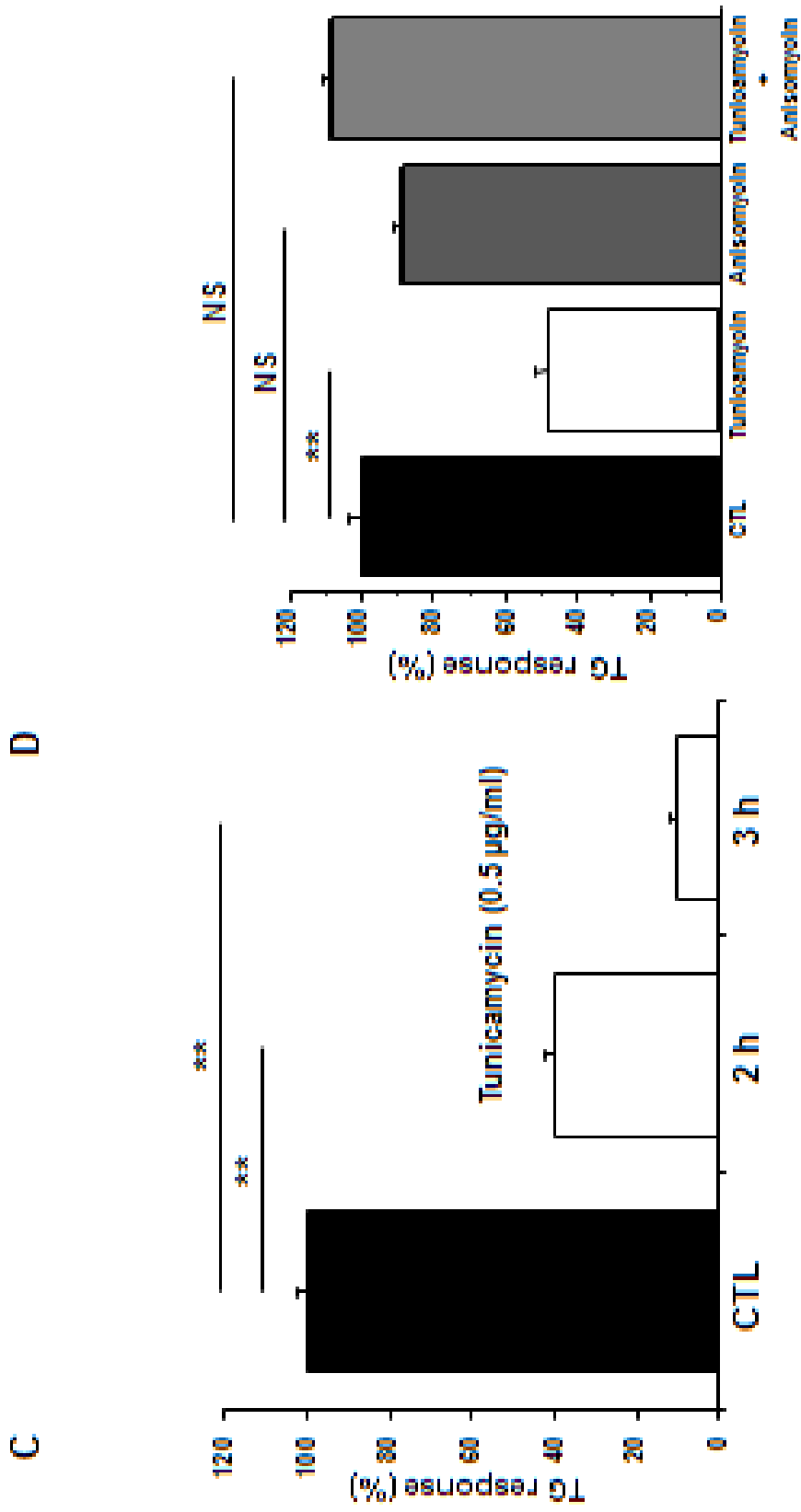


Figure 2

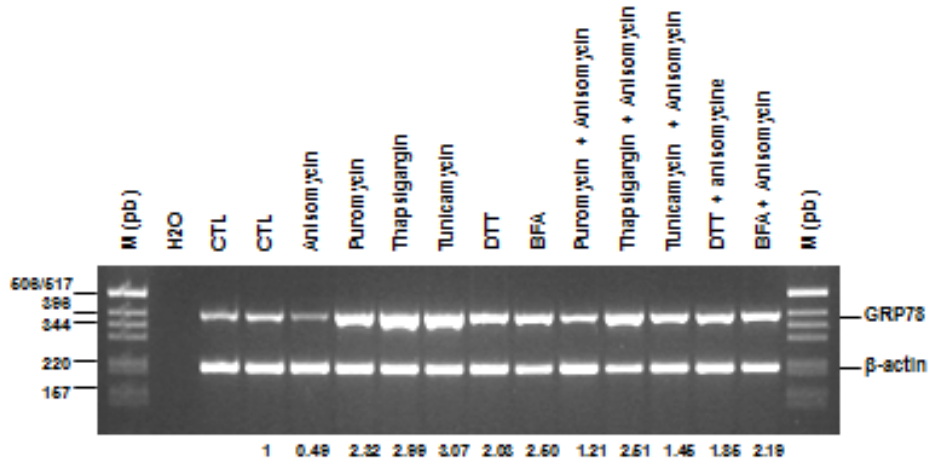


Figure 3

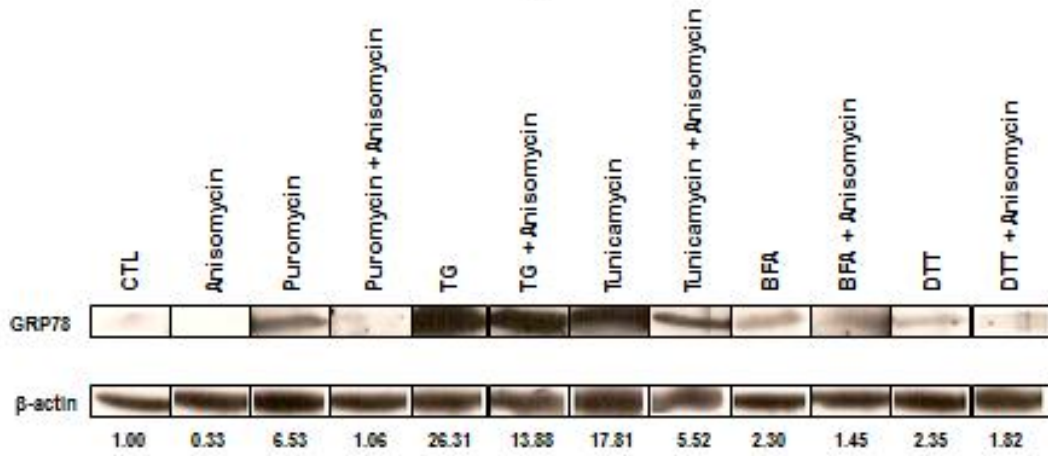


Figure 4

IP : anti-sec61α
WB : anti-GRP78

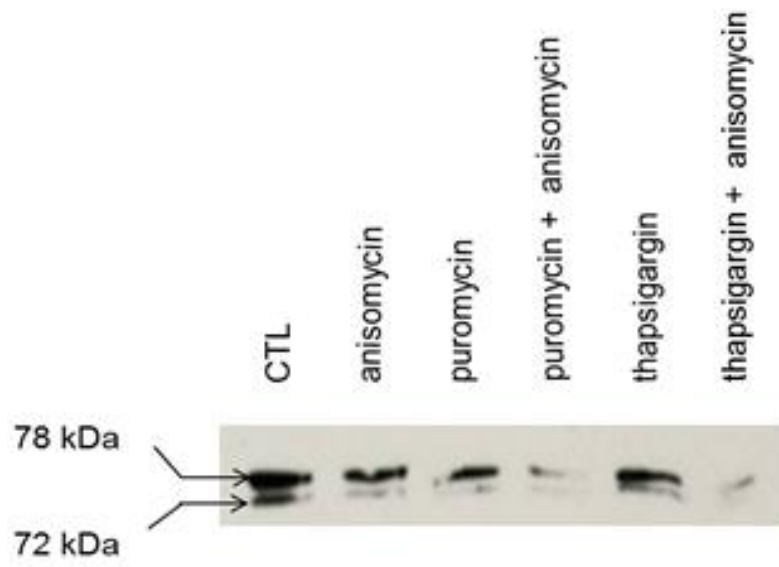
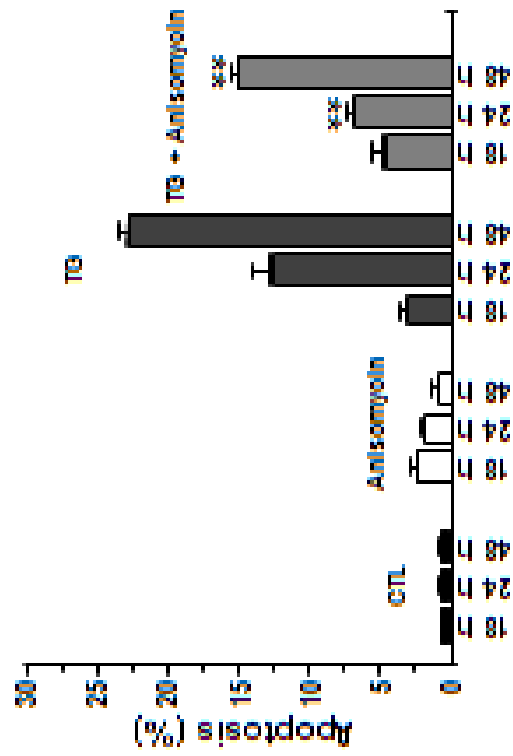
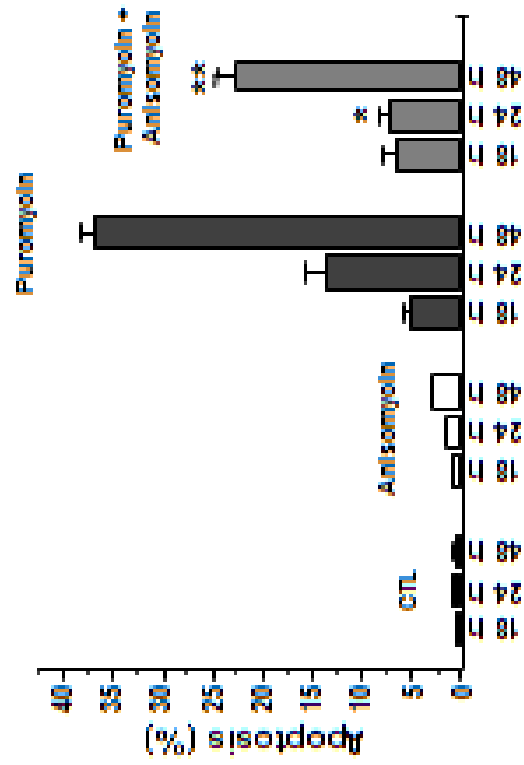


Figure 5

A



B



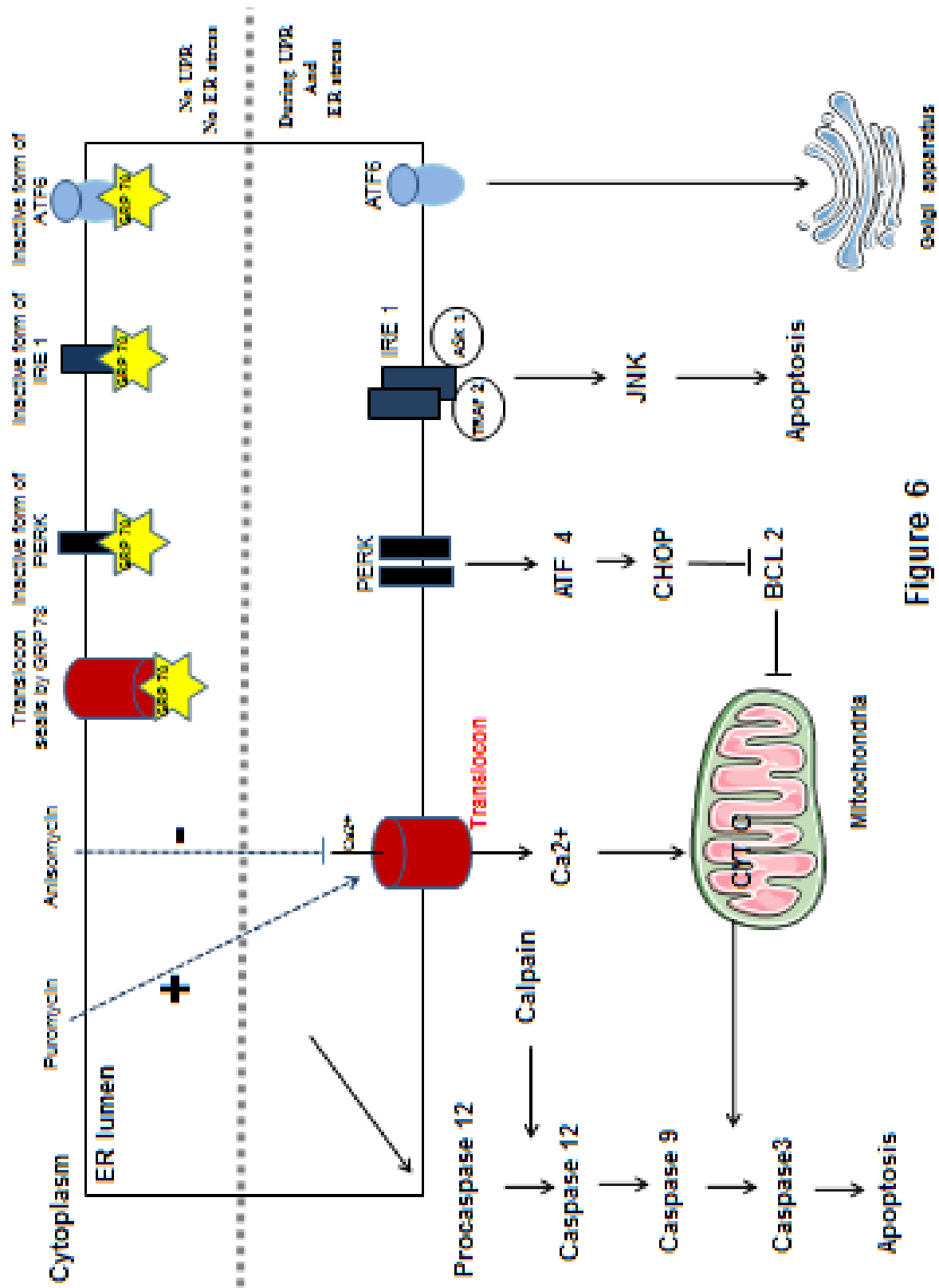


Figure 6

DISCUSSION

I - Canaux TRP et cancers :

A - TRPV6 et Vitamine D₃ dans les cellules cancéreuses prostatiques :

TRPV6 est un canal hautement sélectif pour le calcium. Les transcrits de TRPV6 ne sont détectables ni dans la prostate saine, ni dans les néoplasies intra-épithéliales prostatiques bénignes ou de haut grade (Wissenbach, 2004). N'étant toujours pas détectables dans les tumeurs prostatiques de petite taille et confines (grade T1) ces transcrits deviennent détectables dans 20% des tumeurs de grades pT2a et pT2b, dans 79% des pT3a ainsi que dans plus de 90% des tumeurs pT3b possédant des extensions extra-prostatiques (Fixemer, 2003). Ainsi les taux d'ARNm de TRPV6 ont pu être corrélés significativement au score de Gleason et celui-ci est très présent dans les métastases des ganglions lymphatiques d'origine prostatique (Wissenbach, 2001). Il a été montré que la surexpression TRPV6 augmente la prolifération des cellules HEK-293 d'une manière dépendante du calcium (Schwarz *et al*, 2006). Par la suite, nous avons démontré au laboratoire que le canal TRPV6 est directement impliqué dans la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses via l'activation du facteur de transcription NFAT ainsi que sa contribution à la résistance à l'apoptose constitutive (Lehen'kyi, 2007). Mais actuellement le rôle du canal TRPV6 dans le développement et la progression du cancer de la prostate est encore flou.

La vitamine D₃, et plus particulièrement son métabolite actif la 1,25-dihydroxyvitamine D₃ [1,25(OH)₂D₃], a pour rôle principal de maintenir l'homéostasie phospho-calcique. Cependant, cette molécule est très étudiée en tant qu'agent anti-cancéreux et notamment dans le cadre du cancer de la prostate. Des données indiquent que la 1,25(OH)₂D₃ ou analogues non-calcémiques induisent l'apoptose de plusieurs lignées cancéreuses prostatiques, incluant les cellules LNCaP, LNCaP C4-2, ALVA-3, DU-145 et PC-3 (Murthy *et al.*, 2005 ; Oades *et al.*, 2002 ; Saito *et al.*, 2008 ; Washington *et al.*, 2011). Ces effets semblent être une combinaison d'arrêt du cycle cellulaire en G₀/G₁, d'apoptose, de différenciation et d'inhibition de l'angiogenèse (Bao, *et al.*, 2006 ; Ben Shoshan *et al.*, 2007 ;

Jiang et al., 2004 ; Kizildag et al., 2009). Cependant, plusieurs études montrent que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ peut induire l'expression de TRPV6, notamment au niveau intestinal et rénal (Van Abel et al., 2003 ; Nijenhuis et al., 2005). Or comme nous l'avons vu plus haut, TRPV6 contrôle positivement la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses. **Ainsi, dans cet article nous avons étudié le rôle du canal TRPV6 dans l'effet de la vitamine D3 sur la croissance des cellules prostatiques cancéreuses, afin de comprendre comment l'effet anti-prolifératif de la vitamine D3 peut être compatible avec l'induction d'expression de TRPV6.**

Pour cette étude nous avons utilisé les cellules LNCaP (androgéno-dépendantes). Sans surprise, dans la condition standard de culture utilisée dans la plupart des études in vitro sur la vitamine D3, à savoir supplémenté en SVF à hauteur de 10 %, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (100 nM) inhibe bien la prolifération. Cependant, de façon surprenante, lorsque la concentration de sérum est diminuée à 2%, nous avons observé que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ augmentait cette fois la prolifération des cellules LNCaP et le nombre de cellules entrant en phase S.

Nous avons montré que cet effet pro-prolifératif de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ était directement dû à une augmentation de l'expression du canal TRPV6 et à l'élévation du taux de calcium basal qui en résulte. L'entrée constitutive de calcium par le canal TRPV6 est en effet un signal pro-prolifératif pour les cellules prostatiques cancéreuses comme nous l'avons précédemment montré (Lehen'kyi *et al.*, 2007).

Le niveau d'expression de TRPV6 semble donc déterminant dans l'activité pro- ou anti-prolifératif de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, l'effet de l'hormone étant dépendant du taux de sérum présent. Le taux de stéroïdes dans le milieu étant directement lié au taux de sérum, nous avons vérifié l'effet de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sur l'expression de TRPV6 en absence totale de stéroïde, et nous avons pu observer que dans ce cas, la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ n'induisait plus de surexpression du canal.

En conclusion, nous avons montré pour la première fois que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ pouvait promouvoir la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses dans certaines

conditions, qui restent encore flou. Nos résultats remettent donc en cause l'utilisation de la vitamine D3 en thérapie contre le cancer de la prostate.

B - TRPV2 et Adrénomédulline dans les cellules cancéreuses prostatiques et urothéliales :

Le canal TRPV2 est exprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques les plus agressives, et son expression est augmentée par des traitements inducteurs de la différenciation neuroendocrine. Précisément, TRPV2 est exprimé dans plusieurs lignées androgéno-indépendantes (PC-3, DU-145) et androgéno-résistante (LNCaP C4-2). De plus, l'expression de l'ARNm de TRPV2 est multipliée par 12 chez les patients présentant un cancer métastatique (stade M1) par rapport à ceux atteints de tumeurs solides (stades T2a et T2b). Nous avons montré au laboratoire que l'inhibition de l'expression de ce canal diminue très fortement la migration des cellules prostatiques cancéreuses, alors que sa surexpression augmente la migration. Par son activité constitutive, TRPV2 maintient un niveau de calcium cytosolique élevé, ce qui lui permet de jouer un rôle dans l'invasion ; son activité permettant de réguler directement les marqueurs d'invasion MMP2, MMP9 et cathepsine B (Monet et al., 2010). De plus, une étude récente montre que l'expression de TRPV2 dans la vessie augmente en corrélation avec le grade et le stade du cancer (Caprodossi, Lucciarini et al. 2007).

De nombreuses études ont montré l'expression de l'adrénomédulline (AM) dans une variété de tumeurs et lignées cellulaires tumorales et ont décrit l'AM comme un maillon important dans la carcinogenèse et la progression tumorale dans divers cancer et notamment le cancer de la prostate (Nikitenko et al., 2006 ; Miseki et al., 2006 ; Ouafik et al., 2009) ; en effet, de nombreuses données indiquent un rôle de l'adrénomédulline dans la progression tumorale vers les métastases, notamment par des effets sur l'angiogenèse et la migration cellulaire. Cependant à ce jour rien n'est connu concernant l'AM dans le cancer de la vessie. **Ainsi, dans cette étude nous nous sommes intéressés à l'implication du canal**

TRPV2 dans les effets de l'adrénomédulline sur la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques PC-3 et urothéliales T24/83.

S'il est bien connu que les cellules prostatiques cancéreuses expriment les deux récepteurs de l'AM (CLR/RAMP2 et CLR/RAMP3), cela n'a jamais été démontré pour les cellules cancéreuses urothéliales. Nous montrons ici que les cellules T24/83 expriment l'un des récepteurs de l'AM (CLR/RAMP2).

Nous démontrons que l'ajout d'AM (200 nM) augmente l'adhésion à la fois des cellules cancéreuses prostatiques mais aussi urothéliales, ce qui semble dû à une augmentation de l'activité de l'intégrine $\beta 1$. De plus, nous mettons en évidence une augmentation de la migration, associée à une augmentation de l'activité de la kinase d'adhésion focale FAK (Focal Adhesion Kinase), et de l'invasion des deux modèles cellulaires.

Le calcium et l'homéostasie calcique ont un rôle central dans les phénomènes de migration. Du fait de l'implication du canal à conductance calcique TRPV2 dans la migration des cellules PC-3, nous avons pensé que ce canal pourrait médier les effets observés de l'adrénomédulline. Nous avons donc inhibé spécifiquement l'expression de TRPV2 dans nos deux lignées cellulaires. L'absence de TRPV2 mène à une diminution de l'adhésion, de la migration et de l'invasion des PC-3, mais également des T24/83, mettant ainsi en évidence un nouveau rôle du canal TRPV2 dans les cellules urothéliales cancéreuses. De plus, l'inhibition de TRPV2 prévient l'effet de l'adrénomédulline.

Nous montrons que la stimulation de TRPV2 par l'AM ne se fait pas à court terme, c'est à dire dans la minute, mais nécessite une application de plusieurs dizaines de minutes, qui mène à une augmentation du taux de calcium basal. L'activation de TRPV2 par l'AM ne se fait pas par une action directe sur l'activité du canal présent à la membrane plasmique, mais par une stimulation de la translocation PI3K dépendante de TRPV2 à la membrane. Celle-ci est nécessaire pour l'effet de l'adrénomédulline sur la migration, puisque l'inhibition de la PI3K abolit la stimulation de la migration.

Le canal TRPV2 et le calcium entrant par ce canal sont donc très importants dans l'effet de l'adrénomédulline que nous avons observé ici. Comme nous l'avons dit précédemment, sous l'influence de l'AM, l'intégrine $\beta 1$ et la kinase d'adhésion focale FAK sont activées, l'activité de ces deux protéines étant connue pour être modulée par le calcium.

Nous pouvons ainsi proposer un mécanisme d'action de l'adrénomédulline (Figure 14) qui est le suivant : par liaison avec son récepteur, l'AM active la PI3K. Celle-ci stimule la translocation du canal TRPV2 à la membrane plasmique. L'insertion de nouveaux canaux TRPV2 à la membrane plasmique augmente la concentration en calcium cytoplasmique, ce qui permettrait l'activation d'une calpaïne (protéase calcium-dépendante, Goll *et al.*, 2003). La calpaïne activée clive la taline (Yan *et al.*, 2001), démasquant ainsi un site de liaison à la chaîne β des intégrines. La liaison de ce domaine dissocie l'interaction inhibitrice entre la chaîne α et la chaîne β de l'intégrine et l'active, permettant ensuite le recrutement de FAK. En plus d'une action du calcium entrant dans la cellule, le canal TRPV2 nouvellement inséré à la membrane pourrait interagir directement avec les intégrines et provoquer un changement de conformation entraînant l'activation de la sous-unité $\beta 1$ permettant ainsi à la taline de se lier au domaine intra-cytoplasmique de $\beta 1$, et le recrutement de FAK.

Afin qu'il puisse y avoir interaction entre TRPV2 et l'intégrin $\beta 1$, de même pour qu'il y ait activation par le calcium entrant par TRPV2 des protéines composant les complexes d'adhésion focale, tous les acteurs doivent se situer dans un domaine bien précis de la cellule. Nous supposons que toutes ces protéines font parties d'un même raft lipidique. Ces rafts lipidiques sont des entités membranaires riches en cholestérol, en glycosphingolipides et en protéines spécifiques telles que la cavéoline. Les intégrines et les protéines associées sont déjà connues pour former ces rafts ou cavéoles (Echarri *et al.*, 2007), de plus, de nombreux travaux montrent l'existence d'une multitude d'acteurs calciques au niveau des cavéoles et notamment certains membres de la famille des TRP (Lockwich *et al.*, 2000 ; Trevino *et al.*, 2001 ; Torihashi *et al.*, 2002).

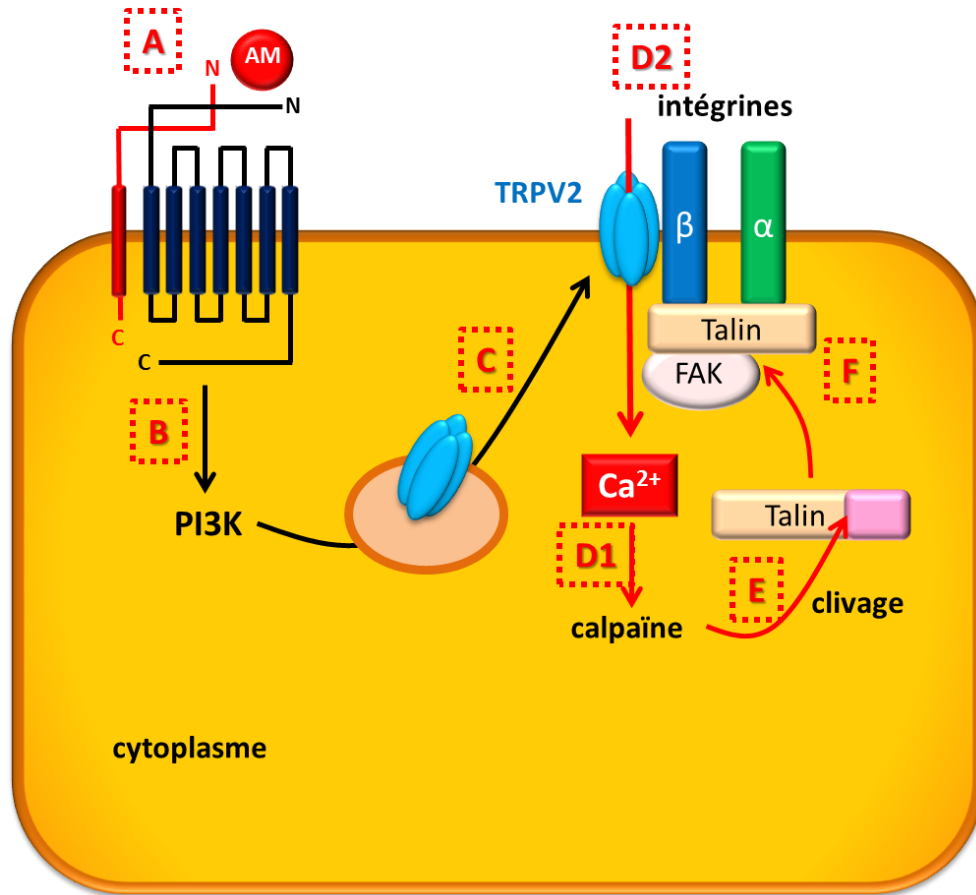


Figure 14 : Représentation schématique du mécanisme d'action de l'adrénomédulline proposé. A) L'AM se fixe à son récepteur, B) activation de la PI3K, C) translocation de TRPV2 à la membrane plasmique, D1) augmentation de la [Ca²⁺]_i activant la calpaïne, D2) interaction entre TRPV2 et β1 activant l'intégrine, E) clivage de la talin par la calpaïne, F) liaison de la talin à l'intégrine, recrutement de FAK et stimulation de la migration.

En conclusion, nous rapportons dans cette étude 4 faits importants : (i) Les cellules urothéliales cancéreuses expriment également un récepteur de l'AM. (ii) L'AM est capable d'augmenter les capacités invasives à la fois des cellules prostatiques cancéreuses et des urothéliales. (iii) Le canal à conductance calcique TRPV2 promeut également la migration et l'invasion des cellules urothéliales cancéreuses. (iv) Les effets de l'AM sont médiés par le canal TRPV2 et sa translocation à la membrane plasmique.

II - Translocon : canal de fuite majoritaire dans le stress réticulaire :

De nombreuses maladies telles que des pathologies cardiovasculaires, pulmonaires, le diabète, des désordres neurologiques, des infections virales, et les cancers affectent l'environnement du RE menant ainsi à un stress réticulaire et à l'UPR (Unfolded Protein Response). Pouvoir moduler ce stress réticulaire en fonction de la pathologie associée serait nécessaire ; en effet, il serait utile d'être capable d'inhiber ce stress dans les cas de diabète ou d'Alzheimer par exemple, ou au contraire de le stimuler dans les cas de cancers. Et pour cela il est nécessaire de comprendre les mécanismes liés au stress réticulaire.

Certaines de ces maladies vont provoquer une vidange du calcium réticulaire, pouvant mener à l'apoptose (pour revue : Mekahli *et al.*, 2011). Notamment dans le cas des cancers, le microenvironnement tumoral représente une source importante de stimuli de stress réticulaire : hypoxie, privation en nutriment, etc. La cellule répond à ce stress en activant l'UPR. Cette réponse est induite par l'activation de trois protéines 'senseurs' du stress du RE: PERK (PKR like Endoplasmic Reticulum Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor 6), IRE1 (Inositol Requiring 1). Ces senseurs sont ancrés à la membrane du RE et maintenues dans un état inactif par leur liaison à la protéine chaperonne GRP78 (Glucose Regulated Protein 78) encore appelée BiP (Binding immunoglobulin Protein) (Ma *et al.*, 2002 ; Shen *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2003). Lorsqu'un stress du RE apparaît, GRP78, en libérant les senseurs, permet l'activation de l'UPR qui a pour but d'augmenter les capacités de repliement, de maturation, et de dégradation des protéines du RE. Quand tous les efforts mis en œuvre pour prendre en charge l'excès de protéines dans le RE ont échoué, l'UPR conduit alors à l'apoptose de la cellule.

Les mécanismes dépendants du calcium régulant le stress réticulaire et en particulier les canaux calciques du RE impliqué dans la modulation de l'homéostasie calcique lors d'un stress réticulaire ne sont pas encore bien connus. De précédentes études du laboratoire ont montré que le translocon (complexe protéique impliqué dans la traduction et dans la réponse UPR) est le canal de fuite calcique réticulaire majoritaire dans les cellules prostatiques cancéreuses (Van Coppenolle *et al.*, 2004 ; Flourakis *et al.*, 2006), impliqué de

façon physiologique dans la vidange passive du RE et dans la déplétion calcique réticulaire induite par la thapsigargine, inhibiteur des pompes SERCA et inducteur de stress réticulaire.

Le translocon est un bon candidat pour être le canal de fuite du RE impliqué dans la vidange des stocks lors d'un stress réticulaire et de la réponse UPR. **Ainsi, dans cette étude nous nous sommes attachés à caractériser l'un des canaux calciques réticulaires impliqués dans la vidange calcique lors d'un stress réticulaire et de l'UPR, à son rôle dans l'apoptose et à l'implication de GRP78 dans ces phénomènes.**

Dans cette étude menée sur les cellules prostatiques cancéreuses LNCaP, nous avons utilisé la thapsigargine pour visualiser la libération de calcium du RE, celle-ci étant fortement diminuée par l'anisomycine (maintien le pore du translocon fermé); ce qui est en concordance avec le fait que le translocon est le canal de fuite calcique majoritaire du RE dans les LNCaP. Nous avons ensuite étudié les variations de calcium dues à la tunicamycine (inhibiteur de N-glycosylation connu pour provoquer une réponse UPR), et nous avons pu mettre en évidence que la tunicamycine provoque également une libération de calcium du RE via le translocon, cet effet pouvant être inhibé par l'anisomycine.

Afin d'établir le lien entre la perméabilité calcique observée et le stress réticulaire et la réponse UPR, nous avons étudié l'expression du marqueur de stress GRP78. Nous avons ainsi observé que les inducteurs de stress réticulaire et d'UPR que sont la thapsigargine, la puromycine (antibiotique maintenant le translocon ouvert et menant à la déplétion des stocks calciques), la tunicamycine, le dithiotreitol (DTT, inhibe la formation des ponts disulfides) et la bréfeldine A (BFA, inhibe l'assemblage de l'appareil de Golgi) augmentent l'expression de GRP78; cet effet étant inhibé par l'anisomycine. Ceci met bien en évidence l'importance de la fuite calcique à travers le translocon lors du stress réticulaire. Nous montrons également que cette fuite calcique est nécessaire à l'induction de l'apoptose par la thapsigargine et la puromycine; l'anisomycine, et donc l'inhibition de la vidange calcique, diminuant fortement l'apoptose.

Nous savons que la perméabilité du translocon est d'une importance cruciale dans l'induction de l'apoptose par un stress réticulaire. Dans les conditions normales, GRP78 se lie

au translocon et à d'autres protéines du RE impliquées dans le déclenchement de l'UPR. Nous montrons dans cette étude que lors d'un stress réticulaire induit par la thaspigargine ou la puromycine, l'interaction entre GRP78 et le translocon diminue, ce que nous pensons être dû à une libération de GRP78 lié au translocon peut être en faveur d'une redistribution vers d'autres partenaires. Cependant, les modalités liées à cette dissociation ne sont pas encore élucidées. Cette dissociation entre GRP78 et le translocon permettrait une ouverture du pore du translocon et en conséquence la fuite calcique réticulaire. Une diminution de l'interaction GRP78/translocon est également observée lorsque les cellules sont traitées avec l'anisomycine, ce qui pourrait être dû à la diminution d'expression de GRP78.

En conclusion, nous montrons ici pour la première fois que dans des conditions de stress réticulaire et d'induction de l'UPR, le translocon est le canal de fuite calcique majoritaire du RE menant à la vidange des stocks réticulaires et à la mort cellulaire. Ainsi, la découverte de nouveaux outils pharmacologiques modulant la fuite calcique à partir du translocon pourrait être utile dans la compréhension et le traitement de pathologies impliquant une dérégulation du stress réticulaire.

PERSPECTIVES

I - Les canaux TRP dans les cancers prostatiques et urothéliaux :

A - Prostate : Développement de modèles in vivo :

Le canal TRPV6 n'est exprimé ni dans la prostate saine, ni dans les hyperplasies bénignes, ni dans les stades précoces du cancer de la prostate mais le devient dans les stades avancés et notamment dans les tumeurs pT3b avec extensions extra prostatiques. Il a été montré que ce canal participe à la prolifération des cellules HEK (Schwarz *et al*, 2006) et des cellules prostatiques cancéreuses ainsi qu'à la résistance à l'apoptose en conditions basales (Lehen'kyi *et al.*, 2007). Nous pensons que l'apparition de TRPV6 aux stades détectables pourrait être associée à l'accélération du développement de la tumeur et à un mauvais pronostic vital. Ce canal calcique pourrait avoir un rôle déterminant dans la carcinogénèse de la prostate surtout sous ses formes métastatiques agressives. De plus, nous le soupçonnons fortement d'avoir un rôle spécifique dans l'orientation des cellules prostatiques cancéreuses vers les os, lieu de prédilection des métastases d'origine prostatique ; en effet, TRPV6 est parmi les TRP l'un des plus sélectifs au calcium, or les os sont une source importante de calcium.

Le canal TRPV2 est exprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques les plus agressives, précisément TRPV2 est exprimé dans les lignées androgéno-indépendantes, issues de métastases notamment osseuses. De plus, l'expression de TRPV2 est multipliée par 12 chez les patients présentant un cancer métastatique (stade M1) par rapport à ceux atteints de tumeurs solides (stades T2a et T2b). L'inhibition de l'expression de ce canal diminue très fortement la migration des cellules prostatiques cancéreuses, alors que sa surexpression l'augmente. Il a été montré que son activité permet de réguler directement les marqueurs d'invasion MMP2, MMP9 et cathepsine B (Monet *et al.*, 2010). Ce canal aurait donc également un rôle dans l'établissement de métastases osseuses à partir de cellules prostatiques cancéreuses.

Les métastases osseuses sont des complications très sévères survenant chez plus de 70% des patients en stade avancé de cancer de la prostate (Ibrahim, 2010). Celles-ci dépendent d'interactions réciproques entre les cellules prostatiques cancéreuses et le micro-environnement osseux menant à la formation de la plupart des lésions osseuses d'excès (formation ostéoblastique) ou de défaut (déstruction ostéoclastique) (Msaouel, 2008). Chez les patients, les conséquences de ces lésions osseuses sont souvent dévastatrices (fractures pathologiques, souffrances osseuses, compression de la moelle épinière). Malheureusement les mécanismes impliqués sont encore très obscurs. Afin de mieux comprendre ces mécanismes, nous nous proposons d'étudier *in vivo* la cancérogenèse et la formation des métastases induite par des cellules prostatiques cancéreuses sur- ou sous-exprimant soit le canal TRPV6, soit le canal TRPV2 en utilisant un modèle de xénogreffes chez des souris immunodéficientes.

B - Canaux TRP et cancer de la vessie :

Des études récentes, dont celles du laboratoire, ont montré des modifications d'expression des canaux TRP au cours de l'évolution de certains cancers dont les cancers urogénitaux de prostate et de vessie (Lazzeri, Vannucchi *et al.* 2005; Caprodossi, Lucciarini *et al.* 2007; Prevarskaya, *et al.* 2007; Gkika et Prevarskaya 2009). Les travaux du laboratoire montrent notamment l'implication de TRPM8, TRPV6 et TRPV2 dans la prolifération, l'apoptose et la migration des cellules prostatiques cancéreuses (Bidaux, *et al.* 2007; Lehen'kyi *et al.* 2007; Monet *et al.* 2009; Gkika *et al.* 2010; Monet *et al.* 2010) et de TRPV2 dans la migration des cellules cancéreuses urothéliales, comme le montre les résultats obtenus au cours de cette thèse.

Nous souhaitons maintenant étendre nos recherches sur l'impact des canaux TRP dans les cancers urothéliaux.

Les données actuelles de la littérature nous laissent à penser que l'urothélium n'est pas une simple barrière entre l'urine et le muscle lisse vésical. En effet, les cellules urothéliales expriment de nombreux récepteurs dont les récepteurs nicotiques ou muscariniques ainsi que des canaux TRP. De récentes études montrent que l'urothélium

possède des propriétés sensorielles et signalétiques qui leur permettent de répondre à leur environnement (chimique et physique) et d'engager une communication chimique réciproque avec les cellules nerveuses qui les avoisine (Andersson, 2002; Moore et Goldman, 2006). Il apparaît également que les mécanismes qui régulent l'activité du calcium intracellulaire dans les cellules urothéliales soient des acteurs clé dans la signalétique urothéliale. En effet, les canaux TRP présent sur les cellules urothéliales semble impliqués dans les réponses de l'urothélium face aux stimuli mécaniques ou chimiques.

Dans l'urothélium sain cinq canaux TRP ont été identifiés : TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPM8 et TRPA1. Ces canaux sont capables de répondre à une large variété de stimuli chimiques ou mécaniques tel que l'étirement et apparaissent comme étant les premiers senseurs au contact de l'urine.

Le rôle de TRPV1 dans des pathologies vésicales a été reconnu. Ainsi, l'application intravésicale de capsaïcine et de résinifératoxine, deux activateurs des canaux TRPV1, permet d'améliorer les symptômes de l'instabilité vésicale, par leur effet désensibilisateur sur les canaux TRPV1. Les patients traités par résinifératoxine montrent une diminution d'expression de TRPV1 dans l'urothélium ainsi que dans les fibres nerveuses suburothéliales (Apostolidis *et al.* 2005). Des études sur des souris knock-out pour le gène TRPV1 ont montrées que TRPV1 participait aux fonctions vésicales normales. Ces souris knock-out présentaient en effet une fréquence accrue de contractions de faibles amplitudes inefficaces pour la miction, en comparaison avec des souris de type sauvage (Birder *et al.* 2002). Il a été également reporté que TRPV1 était surexprimé chez les patients atteints d'instabilité vésicale neurogène et qu'il était impliqué dans la détection de l'étirement de la vessie. En effet, la libération provoquée par l'étirement de deux médiateurs : le NO et l'ATP est diminuée chez les souris knock-out pour TRPV1. Ces résultats nous indiquent que TRPV1 participe à la libération de médiateurs chimiques et qu'il est essentiel à la formation du signal afférent sensoriel de la vessie (Birder *et al.* 2002).

TRPM8, un canal activé par les basses températures et le menthol, est exprimé sur les fibres afférentes suburothéliales de type C ainsi que dans l'urothélium et serait impliqué dans le réflexe au froid de la vessie. Le remplissage rapide de la vessie avec de l'eau froide cause une contraction immédiate du détroisor chez des patients atteints de lésions

supraspinales mais pas chez ceux présentant une lésion périphérique ou chez des sujets normaux. Il a été également récemment décrit que le canal TRPM8 est surexprimé dans les fibres de type C de patient atteint d'hyperactivité vésicale (Mukerji *et al.* 2006).

D'autres études effectuées sur TRPV4 ont mis en évidence son rôle dans la fonction vésicale normale. En effet, des souris knock-out pour TRPV4 présentent des anomalies dans la physiologie normale de la miction, ainsi que dans la libération d'ATP provoquée par un étirement. Ces résultats font apparaître TRPV4 comme un possible acteur dans la transduction médiée par l'urothélium des variations de pression intravésicales (Gevaert *et al.* 2007).

Les résultats des études réalisées sur l'urothélium sain nous montrent l'importance des canaux TRP dans la fonction normale de la vessie, mais leurs rôles éventuels dans le cancer de la vessie restent encore à élucider. En effet, peu de données concernant les canaux TRP et le cancer de la vessie sont actuellement disponibles.

Une étude a mis en évidence une perte d'expression de TRPV1 à mesure que le stade du cancer augmente et que la différenciation cellulaire diminue (Lazzeri *et al.* 2005). Plus récemment, une équipe a étudié l'expression de TRPV2 dans le cancer de la vessie et a montré une augmentation progressive de la forme complète de TRPV2 (hTRPV2) en corrélation avec le grade et le stade du cancer. Elle met également en évidence une forme non connue de TRPV2 : s-TRPV2 (short splice variant) qui est une forme tronquée du canal dans laquelle manque les 5^{ème} et 6^{ème} domaines transmembranaires entre lesquels se situe le pore. Ce variant pourrait avoir une fonction régulatrice négative sur TRPV2, comme il a été démontré pour la forme tronquée du canal TRPV1 (Wang *et al.* 2004). Au cours de l'évolution du cancer de la vessie, une diminution progressive de s-TRPV2 est observée avec une perte complète d'expression dans les stades les plus avancés (Caprodossi *et al.* 2007). Une équipe a récemment montré que l'activation de TRPV2 par des agonistes et l'entrée de calcium en résultant induirait l'apoptose des cellules urothéliales cancéreuses (Yamada *et al.*, 2010), les auteurs suggèrent ainsi que l'activation de TRPV2 pourrait apporter une stratégie thérapeutique potentielle contre les tumeurs urothéliales. Nous rapportons dans cette thèse que TRPV2 est impliqué dans le phénotype invasif des cellules cancéreuses de vessie.

Ces résultats nous permettent déjà d'entrevoir le rôle que pourrait jouer les canaux TRP dans le cancer de la vessie et nous incitent à pousser d'avantage les recherches dans ce domaine.

II - Stress réticulaire, calcium et cancer de la prostate :

Pour les cas avancés du cancer de la prostate, lorsque l'hormonothérapie n'a plus aucun effet, le traitement préconisé reste la chimiothérapie. Ces chimiothérapies utilisent des agents cytotoxiques pour induire l'apoptose. Malheureusement, de manière inexorable, ces traitements perdent de leur efficacité au cours du temps. On parle alors d'échappement thérapeutique dont les mécanismes complexes et variés, sont peu connus. En effet, au cours du temps les patients sous chimiothérapies (tels que des poisons du fuseau mitotique ou bien des agents alkylants) développent une résistance face aux traitements anticancéreux car les cellules s'adaptent à ces conditions de stress. **Une meilleure connaissance des mécanismes de résistance est indispensable pour conserver l'efficacité des traitements actuels.**

Un nombre croissant d'études montrent que des agents anticancéreux pourraient aussi impliquer un stress calcique réticulaire (pour revue voir Boelens *et al.*, 2007). Ces molécules sont capables de libérer directement ou indirectement le calcium contenu dans le RE et ainsi d'induire un stress calcique réticulaire entraînant l'apoptose. Cependant au cours du temps une résistance à l'apoptose induite par un stress calcique réticulaire apparaît, car les cellules s'adaptent à ces conditions de stress.

Il a été mis en évidence au laboratoire que les canaux de type SOC (Store Operated Channel) sont des acteurs importants de la signalisation calcique responsables de l'apoptose et du stress calcique réticulaire dans le cancer de la prostate. Ses canaux sont activés par la vidange des réserves calciques réticulaires, et sont des éléments clés intervenant dans le contrôle de l'apoptose des cellules saines et cancéreuses (Vanden Abeele *et al.*, 2002). La fonction normale de ces canaux SOC est de faire entrer du calcium dans la cellule afin de reconstituer les stocks calciques réticulaires (phénomène d'entrée capacitive. Cependant, une ouverture prolongée de ces canaux conduit à une accumulation de calcium dans le cytoplasme ce qui induit l'entrée en apoptose des cellules. Les canaux SOC sont inhibés dans les cas de cancers avancés (Vanden Abeele *et al.*, 2002 ; Vanden Abeele *et al.*, 2004) ce qui se traduit par une diminution de la quantité de calcium présent dans le RE. Les agents

chimiothérapeutiques, dont une partie du mécanisme d'action est médiée par le stress calcique RE, et donc la vidange réticulaire de calcium, voient alors leur efficacité diminuée.

Des données du laboratoire montrent que les cellules des cas de cancers avancés, en échappement thérapeutique, contiennent encore du calcium dans le RE (Vanden Abeele *et al.*, 2002). Pour induire à nouveau un stress du RE, et donc la mort cellulaire, il faudrait être capable de vidanger totalement ce calcium. Malheureusement, les agents chimiothérapeutiques n'ont pas cette capacité. Seul des inhibiteurs spécifiques des pompes SERCA, comme la thapsigargine, pourraient permettre une telle vidange, et engendrer un stress calcique réticulaire important aboutissant à l'apoptose. Ceci a suscité beaucoup d'enthousiasme avec, en 2003, l'élaboration d'une molécule de TG modifiée chimiquement, le L12ADT (Denmeade *et al.*, 2003). Cette drogue a été couplée à un peptide de « transport » qui est un substrat pour la protéase PSA (prostate-spécifique antigène). L'action protéolytique de la PSA permet de libérer le L12ADT qui devient alors perméable et pénètre dans les cellules tumorales. Des résultats précliniques prometteurs ont été obtenus dans cette étude avec des modèles de xénogreffes chez la souris. Des essais thérapeutiques utilisant pour la première fois la TG sous forme de pro drogue ont suivis. Malheureusement, les effets secondaires se sont avérés être trop importants.

C'est pourquoi aujourd'hui on se dirige vers la recherche de nouveaux analogues de la thapsigargine, moins toxique, qui seraient utilisés en association avec des agents anticancéreux dans le but d'obtenir un effet synergique. De même, il semble intéressant d'étudier certaines molécules anticancéreuses telles que le 2,5-diméthylcelecoxib ou l'artémisinine qui inhibent également les SERCA, un stress réticulaire en résultant (Pyrko *et al.*, 2007 ; Stockwin *et al.*, 2009) et qui semblent efficace.

De plus, dans les travaux menés au cours de cette thèse, nous avons identifié le translocon comme canal de fuite calcique majoritaire du RE lors du stress réticulaire, et démontré qu'une dissociation de GRP78 du translocon se produisait lors de ce stress. Afin de compléter ces travaux nous nous proposons d'étudier les mécanismes de dissociation de GRP78 du translocon au cours du stress calcique réticulaire.

Nous avons également observé la surexpression de GRP78 lors du stress réticulaire ; mais la fonction de cette surexpression n'est pas clairement définie. Il apparaît de plus en plus que la surexpression de GRP78 lors d'un stress réticulaire ne se limite pas au RE, mais qu'il se produit une relocalisation de la chaperonne à la membrane plasmique (Zhang *et al.*, 2010), où GRP78 assumerait une nouvelle fonction de co-récepteur dans la signalisation de surface cellulaire (pour revue : Ni *et al.*, 2011). Nous étudierons donc la localisation de GRP78 au sein de la cellule au cours du stress réticulaire dans notre modèle cellulaire ; et si une relocalisation à la membrane se produit, nous nous pencherons sur les mécanismes liés à cette modification de localisation et quels en sont les effets éventuels sur la signalisation calcique.

PUBLICATIONS
PERSONNELLES

Publication :

Lehen'kyi V, Raphaël M, **Oulidi A**, Flourakis M, Khalimonchyk S, Kondratskyi A, Gordienko D, Mauroy B, Bonnal J, Skryma R, Prevarskaya N. 2011. **TRPV6 determines the effect of vitamin D3 on prostate cancer cell growth.** PLoS One 6(2):e16856.

Articles en préparations :

Oulidi A, Bokhobza A, Vanden Abeele F, Gkika D, Berenguer C, Mauroy B, Ouafik L, Prevarskaya N. **TRPV2 mediates adrenomedullin stimulation of cancer cells adhesion, migration and invasion.**

Hammadi M, **Oulidi A**, Gackiere G, Katsogianou M, Slomianny C, Roudbaraki M, Dewailly E, Delcourt P, Lepage G, Lotteau S, Prevarskaya N, Van Coppenolle F. **Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78.**

BIBLIOGRAPHIE

Abdullaev IF, Bisailon JM, Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Trebak M. Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res*. 2008 Nov 21;103(11):1289-99. Epub 2008 Oct 9.

Alder NN, Shen Y, Brodsky JL, Hendershot LM, Johnson AE. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2005 Jan 31;168(3):389-99.

Alicia S, Angélica Z, Carlos S, Alfonso S, Vaca L. STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell Calcium*. 2008 Nov;44(5):479-91. Epub 2008 May 23.

Amiri H, Schultz G, Schaefer M. FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry. *Cell Calcium*. 2003 May-Jun;33(5-6):463-70.

Ammon J, Karstens JH, Rathert P. TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma. *Urologe A*. 1977 Mar;16(2):73-82.

Amuthan G, Biswas G, Ananatheerthavarada HK, Vijayasathy C, Shephard HM, Avadhani NG. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene*. 2002 Nov 7;21(51):7839-49.

Andersson KE Bladder activation: afferent mechanisms. *Urology*. 2002 May;59(5 Suppl 1):43-50. Review.

Apostolidis A, Brady CM, Yiangou Y, Davis J, Fowler CJ, Anand P. Capsaicin receptor TRPV1 in urothelium of neurogenic human bladders and effect of intravesical resiniferatoxin. *Urology*. 2005 Feb;65(2):400-5.

Baltogiannis D, Giannakopoulos X, Charalabopoulos K, Sofikitis N. Monotherapy in advanced prostate cancer: an overview. *Exp Oncol*. 2004 Sep;26(3):185-91.

Bao BY, Yao J, Lee YF. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 suppresses interleukin-8-mediated prostate cancer cell angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2006 Sep;27(9):1883-93. Epub 2006 Apr 19.

Barreto AM, Schwartz GG, Woodruff R, Cramer SD. 25-Hydroxyvitamin D3, the prohormone of 1,25-dihydroxyvitamin D3, inhibits the proliferation of primary prostatic epithelial cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Mar;9(3):265-70.

Barthel TK, Mathern DR, Whitfield GK, Haussler CA, Hopper HA 4th, Hsieh JC, Slater SA, Hsieh G, Kaczmarzka M, Jurutka PW, Kolek OI, Ghishan FK, Haussler MR. 1,25-Dihydroxyvitamin D3/VDR-mediated induction of FGF23 as well as transcriptional control of other bone anabolic and catabolic genes that orchestrate the regulation of phosphate and calcium mineral metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Mar;103(3-5):381-8. Epub 2007 Feb 12.

Bell D, Campbell M, Wang X, Earle JA, Cosby SL, McDermott BJ. Adrenomedullin gene delivery is cardio-protective in a model of chronic nitric oxide deficiency combining pressure overload, oxidative stress and cardiomyocyte hypertrophy. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(3):383-94. Epub 2010 Aug 24.

Benham CD, Gunthorpe MJ, Davis JB. TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium*. 2003 May-Jun;33(5-6):479-87. Review.

Ben-Shoshan M, Amir S, Dang DT, Dang LH, Weisman Y, Mabeesh NJ. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ (Calcitriol) inhibits hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway in human cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr;6(4):1433-9.

Berenguer C, Boudouresque F, Dussert C, Daniel L, Muracciole X, Grino M, Rossi D, Mabrouk K, Figarella-Branger D, Martin PM, Ouafik L. Adrenomedullin, an autocrine/paracrine factor induced by androgen withdrawal, stimulates 'neuroendocrine phenotype' in LNCaP prostate tumor cells. *Oncogene*. 2008 Jan 17;27(4):506-18. Epub 2007 Jul 16.

Berridge MJ. Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*. 1995 Jun;17(6):491-500.

Berridge MJ. Ernst Klenk Lecture, November 1985. Intracellular signalling through inositol trisphosphate and diacylglycerol. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1986 Jun;367(6):447-56.

Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 1998 Oct 15;395(6703):645-8.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):11-21.

Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.

Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem*. 2007;45:481-506.

Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci*. 2002 Sep;5(9):856-60.

Bödding M, Wissenbach U, Flockerzi V. The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca²⁺ sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem*. 2002 Sep 27;277(39):36656-64. Epub 2002 Jul 23.

Bödding M, Fecher-Trost C, Flockerzi V. Store-operated Ca²⁺ current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Dec 19;278(51):50872-9. Epub 2003 Oct 8.

Boelens J, Lust S, Offner F, Bracke ME, Vanhoecke BW. Review. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs. *In Vivo*. 2007 Mar-Apr;21(2):215-26. Review.

Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev*. 1995 Apr;16(2):200-57. Review.

Bouillon R, Van Cromphaut S, Carmeliet G. Intestinal calcium absorption: Molecular vitamin D mediated mechanisms. *J Cell Biochem*. 2003 Feb 1;88(2):332-9. Review.

Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother*. 2007 Jul;61(6):299-305. Epub 2007 Jun 12.

Bühlmann N, Leuthäuser K, Muff R, Fischer JA, Born W. A receptor activity modifying protein (RAMP)2-dependent adrenomedullin receptor is a calcitonin gene-related peptide receptor when coexpressed with human RAMP1. *Endocrinology*. 1999 Jun;140(6):2883-90.

Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*. 2000 Jun;6(6):2417-23.

Caprodossi S, Lucciarini R, Amantini C, Nabissi M, Canesin G, Ballarini P, Di Spilimbergo A, Cardarelli MA, Servi L, Mammana G, Santoni G. Transient receptor potential vanilloid type 2 (TRPV2) expression in normal urothelium and in urothelial carcinoma of human bladder: correlation with the pathologic stage. *Eur Urol*. 2008 Sep;54(3):612-20. Epub 2007 Oct 16.

Carragher NO, Frame MC. Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. *Trends Cell Biol*. 2004 May;14(5):241-9. Review.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science*. 2000 Apr 14;288(5464):306-13.

Chan KT, Cortesio CL, Huttenlocher A. FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *J Cell Biol*. 2009 Apr 20;185(2):357-70. Epub 2009 Apr 13.

Chen X, Yin XM. Coordination of autophagy and the proteasome in resolving endoplasmic reticulum stress. *Vet Pathol*. 2011 Jan;48(1):245-53. Epub 2010 Nov 9.

Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jun;2(6):387-96.

Colombel M, Gil Diez S, Radvanyi F, Buttyan R, Thiery JP, Chopin D. Apoptosis in prostate cancer. Molecular basis to study hormone refractory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1996 Apr 30;784:63-9.

Denmeade SR, Jakobsen CM, Janssen S, Khan SR, Garrett ES, Lilja H, Christensen SB, Isaacs JT. Prostate-specific antigen-activated thapsigargin prodrug as targeted therapy for prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jul 2;95(13):990-1000.

Deville JL, Bartoli C, Berenguer C, Fernandez-Sauze S, Kaafarani I, Delfino C, Fina F, Salas S, Muracciole X, Mancini J, Lechevallier E, Martin PM, Figarella-Branger D, Ouafik L, Daniel L. Expression and role of adrenomedullin in renal tumors and value of its mRNA levels as prognostic factor in clear-cell renal carcinoma. *Int J Cancer.* 2009 Nov 15;125(10):2307-15.

Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature.* 1997 Apr 24;386(6627):855-8.

Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res.* 1998 Apr 1;58(7):1515-20.

Echarri A, Muriel O, Del Pozo MA. Intracellular trafficking of raft/caveolae domains: insights from integrin signaling. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Oct;18(5):627-37. Epub 2007 Aug 19.

El Haibi CP, Sharma PK, Singh R, Johnson PR, Suttles J, Singh S, Lillard JW Jr. PI3Kp110-, Src-, FAK-dependent and DOCK2-independent migration and invasion of CXCL13-stimulated prostate cancer cells. *Mol Cancer.* 2010 Apr 22;9:85.

Eto T, Kitamura K, Kato J. Biological and clinical roles of adrenomedullin in circulation control and cardiovascular diseases. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999 May-Jun;26(5-6):371-80. Review.

Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene.* 2003 Oct 30;22(49):7858-61.

Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J.* 2006 Jun;20(8):1215-7. Epub 2006 Apr 12.

Flüchter SH, Weiser R, Gamper C. The role of hormonal treatment in prostate cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2007;175:211-37.

Fraser DR. Vitamin D. *Lancet.* 1995 Jan 14;345(8942):104-7. Review.

Fuessel S, Sickert D, Meye A, Klenk U, Schmidt U, Schmitz M, Rost AK, Weigle B, Kiessling A, Wirth MP. Multiple tumor marker analyses (PSA, hK2, PSCA, trp-p8) in primary prostate cancers using quantitative RT-PCR. *Int J Oncol*. 2003 Jul;23(1):221-8.

Gabarra-Niecko V, Schaller MD, Dunty JM. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Dec;22(4):359-74.

Gees M, Colsoul B, Nilius B. The role of transient receptor potential cation channels in Ca²⁺ signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Oct;2(10):a003962. Epub 2010 Sep 22.

Gevaert T, Vriens J, Segal A, Everaerts W, Roskams T, Talavera K, Owsianik G, Liedtke W, Daelemans D, Dewachter I, Van Leuven F, Voets T, De Ridder D, Nilius B. Deletion of the transient receptor potential cation channel TRPV4 impairs murine bladder voiding. *J Clin Invest*. 2007 Nov;117(11):3453-62.

Gkika D, Flourakis M, Lemonnier L, Prevarskaya N. PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression. *Oncogene*. 2010 Aug 12;29(32):4611-6. Epub 2010 Jun 7.

Gkika D, Prevarskaya N. Molecular mechanisms of TRP regulation in tumor growth and metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1793(6):953-8. Epub 2008 Dec 6. Review.

Gill DL, Waldron RT, Rys-Sikora KE, Ufret-Vincenty CA, Graber MN, Favre CJ, Alfonso A. Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep*. 1996 Apr;16(2):139-57.

Gleason DF, Mellinger GT. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol*. 1974 Jan;111(1):58-64.

Goll DE, Thompson VF, Li H, Wei W, Cong J. The calpain system. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):731-801. Review.

Groah SL, Weitzenkamp DA, Lammertse DP, Whiteneck GG, Lezotte DC, Hamman RF. Excess risk of bladder cancer in spinal cord injury: evidence for an association between indwelling catheter use and bladder cancer. *Arch Phys Med Rehabil*. 2002 Mar;83(3):346-51.

Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 Mar 25;260(6):3440-50.

Gumusel B, Hao Q, Hyman AL, Kadowitz PJ, Champion HC, Chang JK, Mehta JL, Lipton H. Analysis of responses to adrenomedullin-(13-52) in the pulmonary vascular bed of rats. *Am J Physiol*. 1998 Apr;274(4 Pt 2):H1255-63.

Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Apr;23(4):183-91. Review.

Haigh NG, Johnson AE. A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol*. 2002 Jan 21;156(2):261-70. Epub 2002 Jan 21.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70. Review.

Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiah KK, Gish K, Willhite D, Kench JG, Gardiner-Garden M, Stricker PD, Scher HI, Grygiel JJ, Agus DB, Mack DH, Sutherland RL. Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res*. 2003 Jul 15;63(14):4196-203.

Hinson JP, Kapas S, Smith DM. Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*. 2000 Apr;21(2):138-67. Review.

Hodder SL, Mahmoud AA, Sorenson K, Weinert DM, Stein RL, Ouma JH, Koech D, King CH. Predisposition to urinary tract epithelial metaplasia in *Schistosoma haematobium* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2000 Sep-Oct;63(3-4):133-8.

Hoenderop JG, Vennekens R, Müller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ, Nilius B. Function and expression of the epithelial Ca²⁺ channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2. *J Physiol*. 2001 Dec 15;537(Pt 3):747-61.

Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B, Bindels RJ. Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J*. 2003 Feb 17;22(4):776-85.

Hofer AM, Fasolato C, Pozzan T. Capacitative Ca²⁺ entry is closely linked to the filling state of internal Ca²⁺ stores: a study using simultaneous measurements of ICRAC and intraluminal [Ca²⁺]. *J Cell Biol*. 1998 Jan 26;140(2):325-34.

Hofmann T, Schaefer M, Schultz G, Gudermann T. Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(1):14-25.

Holick MF. Vitamin D deficiency: what a pain it is. *Mayo Clin Proc*. 2003 Dec;78(12):1457-9.

Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007 Jul 19;357(3):266-81. Review.

Irani J, Bernardini S, Bonnal JL, Chauvet B, Colombel M, Davin JL, Laurent G, Leuret T, Maidenberg M, Mazerolles C, Pfister C, Roupret M, Roy C, Rozet F, Saint F, Theodore C. Urothelial tumors. *Prog Urol*. 2007 Nov;17(6):1065-98.

Ishikawa T, Chen J, Wang J, Okada F, Sugiyama T, Kobayashi T, Shindo M, Higashino F, Katoh H, Asaka M, Kondo T, Hosokawa M, Kobayashi M. Adrenomedullin antagonist suppresses in vivo growth of human pancreatic cancer cells in SCID mice by suppressing angiogenesis. *Oncogene*. 2003 Feb 27;22(8):1238-42.

Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H. Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Aug 30;203(1):631-9.

Janssen K, Horn S, Niemann MT, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Fischer U. Inhibition of the ER Ca²⁺ pump forces multidrug-resistant cells deficient in Bak and Bax into necrosis. *J Cell Sci.* 2009 Dec 15;122(Pt 24):4481-91. Epub 2009 Nov 17.

Johnson TR, Khandrika L, Kumar B, Venezia S, Koul S, Chandhoke R, Maroni P, Donohue R, Meacham RB, Koul HK. Focal adhesion kinase controls aggressive phenotype of androgen-independent prostate cancer. *Mol Cancer Res.* 2008 Oct;6(10):1639-48.

Kedei N, Szabo T, Lile JD, Treanor JJ, Olah Z, Iadarola MJ, Blumberg PM. Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):28613-9. Epub 2001 May 17.

Kiselyov K, Soyombo A, Muallem S. TRPpathies. *J Physiol.* 2007 Feb 1;578(Pt 3):641-53. Epub 2006 Nov 30.

Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T. Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Apr 30;192(2):553-60.

Kitamura K, Sakata J, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Eto T. Cloning and characterization of cDNA encoding a precursor for human adrenomedullin. *Eur J Pharmacol.* 1993b Sep 14;241(2-3):271-3.

Kitamura K, Ichiki Y, Tanaka M, Kawamoto M, Emura J, Sakakibara S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Immunoreactive adrenomedullin in human plasma. *FEBS Lett.* 1994 Mar 21;341(2-3):288-90.

Kizildag S, Ates H, Kizildag S. Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D(3) induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCL(XL), and p21. *Ann Hematol.* 2009 May 28.

Knight A, Askling J, Ekbom A. Cancer incidence in a population-based cohort of patients with Wegener's granulomatosis. *Int J Cancer.* 2002 Jul 1;100(1):82-5.

Kogevinas M, 't Mannetje A, Cordier S, Ranft U, González CA, Vineis P, Chang-Claude J, Lynge E, Wahrendorf J, Tzonou A, Jöckel KH, Serra C, Porru S, Hours M, Greiser E, Boffetta P. Occupation and bladder cancer among men in Western Europe. *Cancer Causes Control.* 2003 Dec;14(10):907-14.

Komuro H, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 1993 Apr 2;260(5104):95-7.

Kovac JR, Chrones T, Sims SM. Temporal and spatial dynamics underlying capacitative calcium entry in human colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver*

Physiol. 2008 Jan;294(1):G88-98. Epub 2007 Nov 1.

Lark AL, Livasy CA, Dressler L, Moore DT, Millikan RC, Geradts J, Iacocca M, Cowan D, Little D, Craven RJ, Cance W. High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. *Mod Pathol*. 2005 Oct;18(10):1289-94.

Kuwasako K, Kitamura K, Ito K, Uemura T, Yanagita Y, Kato J, Sakata T, Eto T. The seven amino acids of human RAMP2 (86) and RAMP3 (59) are critical for agonist binding to human adrenomedullin receptors. *J Biol Chem*. 2001 Dec 28;276(52):49459-65. Epub 2001 Oct 8.

Lainchbury JG, Cooper GJ, Coy DH, Jiang NY, Lewis LK, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG. Adrenomedullin: a hypotensive hormone in man. *Clin Sci (Lond)*. 1997 May;92(5):467-72.

Lazzeri M, Vannucchi MG, Spinelli M, Bizzoco E, Beneforti P, Turini D, Fausone-Pellegrini MS. Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. *Eur Urol*. 2005 Oct;48(4):691-8.

Lebret T, Hervé JM, Yonneau L, Barré P, Lugagne PM, Butreau M, Molinié V, Botto H. Study of survival after cystectomy for bladder cancer. Report of 504 cases. *Prog Urol*. 2000 Sep;10(4):553-60.

Lee OH, Lee DJ, Kim YM, Kim YS, Kwon HJ, Kim KW, Kwon YG. Sphingosine 1-phosphate stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and chemotactic motility of endothelial cells via the G(i) protein-linked phospholipase C pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Feb 5;268(1):47-53.

Lee YS, Sayeed MM, Wurster RD. Inhibition of cell growth and intracellular Ca²⁺ mobilization in human brain tumor cells by Ca²⁺ channel antagonists. *Mol Chem Neuropathol*. 1994 Jun;22(2):81-95.

Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*. 2007 Nov 15;26(52):7380-5. Epub 2007 May 28.

Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*. 2006 Feb;6(1):45-54. Review.

Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA, Yue DT. Unified mechanisms of Ca²⁺ regulation across the Ca²⁺ channel family. *Neuron*. 2003 Sep 11;39(6):951-60.

Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK. Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res*. 2006 Sep 15;66(18):9065-73.

Liu CY, Xu Z, Kaufman RJ. Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1 α . *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):17680-7. Epub 2003 Mar 13.

Llinás R, Sugimori M, Silver RB. Presynaptic calcium concentration microdomains and transmitter release. *J Physiol Paris*. 1992;86(1-3):135-8.

Lockwich TP, Liu X, Singh BB, Jadlovec J, Weiland S, Ambudkar IS. Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains. *J Biol Chem*. 2000 Apr 21;275(16):11934-42.

Ma K, Vattem KM, Wek RC. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):18728-35. Epub 2002 Mar 20.

Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996 Mar;178(5):1274-82.

Mariot P, Prevarskaya N, Roudbaraki MM, Le Bourhis X, Van Coppenolle F, Vanoverberghe K, Skryma R. Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate*. 2000 May 15;43(3):205-14.

Marks PW, Maxfield FR. Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol*. 1990 Jan;110(1):43-52. Erratum in: *J Cell Biol* 1990 Mar;110(3):861.

McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*. 1998 May 28;393(6683):333-9.

McNeal JE. Origin and development of carcinoma in the prostate. *Cancer*. 1969 Jan;23(1):24-34.

Meeran K, O'Shea D, Upton PD, Small CJ, Ghatei MA, Byfield PH, Bloom SR. Circulating adrenomedullin does not regulate systemic blood pressure but increases plasma prolactin after intravenous infusion in humans: a pharmacokinetic study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jan;82(1):95-100.

Mekahli D, Bultynck G, Parys JB, De Smedt H, Missiaen L. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Jun 1;3(6). pii: a004317. doi: 10.1101/cshperspect.a004317.

Miller AJ, Du J, Rowan S, Hershey CL, Widlund HR, Fisher DE. Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer Res.* 2004 Jan 15;64(2):509-16.

Miller GJ. Vitamin D and prostate cancer: biologic interactions and clinical potentials. *Cancer Metastasis Rev.* 1998-1999;17(4):353-60. Review.

Minke B. Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech.* 1977 Apr 21;3(1):59-64.

Minke, B., and Selinger, Z. The roles of trp and calcium in regulating photoreceptor function in Drosophila. 1996 *Curr Opin Neurobiol* 6(4), 459-66.

Miseki T, Kawakami H, Natsuizaka M, Darmanin S, Cui HY, Chen J, Fu Q, Okada F, Shindo M, Higashino F, Asaka M, Hamuro J, Kobayashi M. Suppression of tumor growth by intra-muscular transfer of naked DNA encoding adrenomedullin antagonist. *Cancer Gene Ther.* 2007 Jan;14(1):39-44. Epub 2006 Jul 14.

Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jan;6(1):56-68. Review.

Mogami H, Tepikin AV, Petersen OH. Termination of cytosolic Ca²⁺ signals: Ca²⁺ reuptake into intracellular stores is regulated by the free Ca²⁺ concentration in the store lumen. *EMBO J.* 1998 Jan 15;17(2):435-42.

Monet M, Gkika D, Lehen'kyi V, Pourtier A, Vanden Abeele F, Bidaux G, Juvin V, Rassendren F, Humez S, Prevarsakaya N. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Mar;1793(3):528-39. Epub 2009 Jan 15.

Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firlej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C, Delcourt P, Rassendren F, Bergerat JP, Ceraline J, Cabon F, Humez S, Prevarskaya N. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res.* 2010 Feb 1;70(3):1225-35. Epub 2010 Jan 26.

Montell C. An end in sight to a long TRP. *Neuron.* 2001 Apr;30(1):3-5.

Moore CK, Goldman HB. The bladder epithelium and overactive bladder: what we know. *Curr Urol Rep.* 2006 Nov;7(6):447-9.

Mukerji G, Yiangou Y, Corcoran SL, Selmer IS, Smith GD, Benham CD, Bountra C, Agarwal SK, Anand P. Cool and menthol receptor TRPM8 in human urinary bladder disorders and clinical correlations. *BMC Urol.* 2006 Mar 6;6:6.

Murthy S, Agoulnik IU, Weigel NL. Androgen receptor signaling and vitamin D receptor action in prostate cancer cells. *Prostate.* 2005 Sep 1;64(4):362-72.

Nelson PL, Beck A, Cheng H. Transient receptor proteins illuminated: current views on TRPs and disease. *Vet J*. 2011 Feb;187(2):153-64. Epub 2010 Mar 27. Review.

Ni M, Zhang Y, Lee AS. Beyond the endoplasmic reticulum: atypical GRP78 in cell viability, signalling and therapeutic targeting. *Biochem J*. 2011 Mar 1;434(2):181-8. Review.

Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflugers Arch*. 2005 Oct;451(1):181-92. Epub 2005 Jul 26. Review.

Nikitenko LL, Fox SB, Kehoe S, Rees MC, Bicknell R. Adrenomedullin and tumour angiogenesis. *Br J Cancer*. 2006 Jan 16;94(1):1-7. Review.

Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM, Hong K. Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*. 2003 Jun 26;423(6943):990-5.

Niu P, Shindo T, Iwata H, Iimuro S, Takeda N, Zhang Y, Ebihara A, Suematsu Y, Kangawa K, Hirata Y, Nagai R. Protective effects of endogenous adrenomedullin on cardiac hypertrophy, fibrosis, and renal damage. *Circulation*. 2004 Apr 13;109(14):1789-94. Epub 2004 Feb 16.

Njuki F, Nicholl CG, Howard A, Mak JC, Barnes PJ, Girgis SI, Legon S. A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clin Sci (Lond)*. 1993 Oct;85(4):385-8.

Oades GM, Dredge K, Kirby RS, Colston KW. Vitamin D receptor-dependent antitumour effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and two synthetic analogues in three in vivo models of prostate cancer. *BJU Int*. 2002 Oct;90(6):607-16.

Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, Grisoli F, Casellas P, Brünner N, Martin PM. Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo. *Am J Pathol*. 2002 Apr;160(4):1279-92.

Owens LV, Xu L, Craven RJ, Dent GA, Weiner TM, Kornberg L, Liu ET, Cance WG. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in invasive human tumors. *Cancer Res*. 1995 Jul 1;55(13):2752-5.

Owsianik G, D'hoedt D, Voets T, Nilius B. Structure-function relationship of the TRP channel superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2006;156:61-90. Review.

Peehl DM, Feldman D. The role of vitamin D and retinoids in controlling prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2003 Jun;10(2):131-40. Review.

Peehl DM, Krishnan AV, Feldman D. Pathways mediating the growth-inhibitory actions of vitamin D in prostate cancer. *J Nutr*. 2003 Jul;133(7 Suppl):2461S-2469S. Review.

Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM, Hediger MA. Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem*. 1999 Aug 6;274(32):22739-46.

Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA, Freeman MR. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Apr 6;282(3):729-34.

Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J*. 2001 Jun 1;20(11):2690-701.

Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1772(8):937-46. Epub 2007 Jun 2.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med*. 2010 Mar;16(3):107-21. Epub 2010 Feb 16. Review.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer*. 2011 Jul 22;11(8):609-18. doi: 10.1038/nrc3105. Review.

Putney JW. Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jun 1;3:980-4. Review.

Pyrko P, Kardosh A, Liu YT, Soriano N, Xiong W, Chow RH, Uddin J, Petasis NA, Mircheff AK, Farley RA, Louie SG, Chen TC, Schönthal AH. Calcium-activated endoplasmic reticulum stress as a major component of tumor cell death induced by 2,5-dimethyl-celecoxib, a non-coxib analogue of celecoxib. *Mol Cancer Ther*. 2007 Apr;6(4):1262-75.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9. Review.

Rizzoli R, Fleisch H, Bonjour JP. Role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on intestinal phosphate absorption in rats with a normal vitamin D supply. *J Clin Invest*. 1977 Sep;60(3):639-47.

Rocchi P, Boudouresque F, Zamora AJ, Muracciole X, Lechevallier E, Martin PM, Ouafik L. Expression of adrenomedullin and peptide amidation activity in human prostate cancer and in human prostate cancer cell lines. *Cancer Res*. 2001 Feb 1;61(3):1196-206.

Roderick HL, Cook SJ. Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer*. 2008 May;8(5):361-75. Review.

Rodriguez-Covarrubias F, Larre S, De La Taille A, Abbou CC, Salomon L. The outcome of patients with pathological Gleason score ≥ 8 prostate cancer after radical prostatectomy.

BJU Int. 2008 Feb;101(3):305-7. Epub 2007 Oct 17.

Saidak Z, Boudot C, Abdoune R, Petit L, Brazier M, Mentaverri R, Kamel S. Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp Cell Res*. 2009 Jul 15;315(12):2072-80. Epub 2009 Mar 13.

Saito T, Okamoto R, Haritunians T, O'Kelly J, Uskokovic M, Maehr H, Marczak S, Jankowski P, Badr R, Koeffler HP. Novel Gemini vitamin D(3) analogs have potent antitumor activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 Nov;112(1-3):151-6. Epub 2008 Sep 30.

Sakata J, Shimokubo T, Kitamura K, Nakamura S, Kangawa K, Matsuo H, Eto T. Molecular cloning and biological activities of rat adrenomedullin, a hypotensive peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Sep 15;195(2):921-7.

Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeyer BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V, Hoth M. TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium*. 2006 Feb;39(2):163-73. Epub 2005 Dec 13.

Schwartz GG, Hulka BS. Is vitamin D deficiency a risk factor for prostate cancer? (Hypothesis). *Anticancer Res*. 1990 Sep-Oct;10(5A):1307-11.

Schwartz GG, Whitlatch LW, Chen TC, Lokeshwar BL, Holick MF. Human prostate cells synthesize 1,25-dihydroxyvitamin D₃ from 25-hydroxyvitamin D₃. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998 May;7(5):391-5.

Schoenwaelder SM, Burrige K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*. 1999 Apr;11(2):274-86.

Sexton PM, Albiston A, Morfis M, Tilakaratne N. Receptor activity modifying proteins. *Cell Signal*. 2001 Feb;13(2):73-83.

Shen J, Snapp EL, Lippincott-Schwartz J, Prywes R. Stable binding of ATF6 to BiP in the endoplasmic reticulum stress response. *Mol Cell Biol*. 2005 Feb;25(3):921-32.

Shou Y, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE. Calcineurin-mediated Bad translocation regulates cyanide-induced neuronal apoptosis. *Biochem J*. 2004 May 1;379(Pt 3):805-13.

Shuttleworth TJ, Thompson JL, Mignen O. ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry. *Physiology (Bethesda)*. 2004 Dec;19:355-61.

Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppénolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F, Legrand G, Humez S, Boilly B, Prevarskaya N. Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol*. 2000 Aug 15;527 Pt 1:71-83.

Soga N, Sugimura Y. Optimal treatment for elderly high-risk prostate cancer patients. *Gan To Kagaku Ryoho*. 2007 Mar;34(3):387-92.

Souberbielle JC, Prié D, Courbebaisse M, Friedlander G, Houillier P, Maruani G, Cavalier E, Cormier C. Update on vitamin D and evaluation of vitamin D status. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2008 Dec;69(6):501-10. Epub 2008 Sep 18. Review. French.

Stockwin LH, Han B, Yu SX, Hollingshead MG, ElSohly MA, Gul W, Slade D, Galal AM, Newton DL, Bumke MA. Artemisinin dimer anticancer activity correlates with heme-catalyzed reactive oxygen species generation and endoplasmic reticulum stress induction. *Int J Cancer*. 2009 Sep 15;125(6):1266-75.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol*. 2011 Mar;13(3):184-90. Review.

Thalmann GN, Anezinis PE, Chang SM, Zhou HE, Kim EE, Hopwood VL, Pathak S, von Eschenbach AC, Chung LW. Androgen-independent cancer progression and bone metastasis in the LNCaP model of human prostate cancer. *Cancer Res*. 1994 May 15;54(10):2577-81. Erratum in: *Cancer Res* 1994 Jul 15;54(14):3953.

Thebault S, Roudbaraki M, Sydorenko V, Shuba Y, Lemonnier L, Slomianny C, Dewailly E, Bonnal JL, Mauroy B, Skryma R, Prevarskaya N. Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J Clin Invest*. 2003 Jun;111(11):1691-701.

Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, Slomianny C, Beck B, Mariot P, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Capiod T, Skryma R, Prevarskaya N. Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res*. 2006 Feb 15;66(4):2038-47.

Thorpe JF, Jain S, Marczylo TH, Gescher AJ, Steward WP, Mellon JK. A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl*. 2007 Apr;89(3):207-11.

Tilghman RW, Slack-Davis JK, Sergina N, Martin KH, Iwanicki M, Hershey ED, Beggs HE, Reichardt LF, Parsons JT. Focal adhesion kinase is required for the spatial organization of the leading edge in migrating cells. *J Cell Sci*. 2005 Jun 15;118(Pt 12):2613-23. Epub 2005 May 24.

Torihashi S, Fujimoto T, Trost C, Nakayama S. Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae. *J Biol Chem*. 2002 May 24;277(21):19191-7. Epub 2002 Mar 15.

Treviño CL, Serrano CJ, Beltrán C, Felix R, Darszon A. Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm. *FEBS Lett*. 2001 Nov 30;509(1):119-25.

Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. 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.* 2001 May 1;61(9):3760-9.

Valentín-Acevedo A, Sinquett FL, Covey LR. c-Rel Deficiency Increases Caspase-4 Expression and Leads to ER Stress and Necrosis in EBV-Transformed Cells. *PLoS One.* 2011;6(10):e25467. Epub 2011 Oct 3.

van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jul;285(1):G78-85. Epub 2003 Mar 5.

Van Coppenolle F, Vanden Abeele F, Slomianny C, Flourakis M, Hesketh J, Dewailly E, Prevarskaya N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J Cell Sci.* 2004 Aug 15;117(Pt 18):4135-42. Epub 2004 Jul 27.

Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M, Mauroy B, Wuytack F, Prevarskaya N. Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell.* 2002 Mar;1(2):169-79.

Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P, Skryma R, Prevarskaya N. Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium.* 2003 May-Jun;33(5-6):357-73.

Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thébault S, Lepage G, Parys JB, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 2004 Jul 16;279(29):30326-37. Epub 2004 May 11.

Vanoverberghe K, Mariot P, Vanden Abeele F, Delcourt P, Parys JB, Prevarskaya N. Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium.* 2003 Jul;34(1):75-85.

Vassort G, Fauconnier J. Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed. *Med Sci (Paris).* 2008 Feb;24(2):163-8.

Wang C, Hu HZ, Colton CK, Wood JD, Zhu MX. An alternative splicing product of the murine trpv1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels. *J Biol Chem.* 2004 Sep 3;279(36):37423-30. Epub 2004 Jul 2.

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 1999 Apr 9;284(5412):339-43.

Washington MN, Kim JS, Weigel NL. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits C4-2 prostate cancer cell growth via a retinoblastoma protein (Rb)-independent G1 arrest. *Prostate.* 2011 Jan 1;71(1):98-110.

Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, Hayes P, Vriens J, Cairns W, Wissenbach U, Prenen J, Flockerzi V, Droogmans G, Benham CD, Nilius B. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem.* 2002a Apr 19;277(16):13569-77. Epub 2002a Feb 4.

Watanabe H, Vriens J, Suh SH, Benham CD, Droogmans G, Nilius B. Heat-evoked activation of TRPV4 channels in a HEK293 cell expression system and in native mouse aorta endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002b Dec 6;277(49):47044-51. Epub 2002 Sep 26.

Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, Parsons JT, Horwitz AF. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 2004 Feb;6(2):154-61. Epub 2004 Jan 25.

Wissenbach U, Niemeyer BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalie A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H, Flockerzi V. Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem.* 2001 Jun 1;276(22):19461-8. Epub 2001 Feb 2.

Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V. TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Oct 1;322(4):1359-63. Review.

Wu HC, Hsieh JT, Gleave ME, Brown NM, Pathak S, Chung LW. Derivation of androgen-independent human LNCaP prostatic cancer cell sublines: role of bone stromal cells. *Int J Cancer.* 1994 May 1;57(3):406-12.

Wu TT, Sikes RA, Cui Q, Thalmann GN, Kao C, Murphy CF, Yang H, Zhou HE, Balian G, Chung LW. Establishing human prostate cancer cell xenografts in bone: induction of osteoblastic reaction by prostate-specific antigen-producing tumors in athymic and SCID/bg mice using LNCaP and lineage-derived metastatic sublines. *Int J Cancer.* 1998 Sep 11;77(6):887-94.

Yamada T, Ueda T, Shibata Y, Ikegami Y, Saito M, Ishida Y, Ugawa S, Kohri K, Shimada S. TRPV2 activation induces apoptotic cell death in human T24 bladder cancer cells: a potential therapeutic target for bladder cancer. *Urology.* 2010 Aug;76(2):509.e1-7. Epub 2010 May 23.

Yamauchi D, Raveendran NN, Pondugula SR, Kampalli SB, Sanneman JD, Harbidge DG, Marcus DC. Vitamin D upregulates expression of ECaC1 mRNA in semicircular canal. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 17;331(4):1353-7.

Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 2001 Jul 27;276(30):28164-70. Epub 2001 May 29.

Yang S, Huang XY. Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22;280(29):27130-7. Epub 2005 May 23.

Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell.* 2009 Feb 3;15(2):124-34.

Zeegers MP, Tan FE, Dorant E, van Den Brandt PA. The impact of characteristics of cigarette smoking on urinary tract cancer risk: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Cancer.* 2000 Aug 1;89(3):630-9.

Zhang Y, Liu R, Ni M, Gill P, Lee AS. Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem.* 2010 May 14;285(20):15065-75. Epub 2010 Mar 5.

Zhao XY, Ly LH, Peehl DM, Feldman D. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinology.* 1997 Aug;138(8):3290-8.

Zhiqi S, Soltani MH, Bhat KM, Sangha N, Fang D, Hunter JJ, Setaluri V. Human melastatin 1 (TRPM1) is regulated by MITF and produces multiple polypeptide isoforms in melanocytes and melanoma. *Melanoma Res.* 2004 Dec;14(6):509-16.

Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F. Adrenomedullin and cancer. *Regul Pept.* 2003 Apr 15;112(1-3):175-83. Review.

