

Université des Sciences et Technologies de Lille

N° d'ordre : 40669

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

Année 2011

# **THESE**

Présentée pour l'obtention du grade de :

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

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Matthieu Vandenberghe**

---

## **Implication des canaux perméables au calcium dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain.**

---

Thèse co-dirigée par le Prof. Roman SKRYMA et le Dr. V'yacheslav Lehen'kyi

Laboratoire de Physiologie Cellulaire INSERM U1003

Soutenue le 24 Novembre 2011

Composition du Jury :

Pr Natalia PREVARSKAYA	Président du Jury
Dr Patrick DELMAS	Rapporteur
Dr Pierre VACHER	Rapporteur
Dr Thierry ODDOS	Examineur
Pr Roman SKRYMA	Examineur
Dr V'yacheslav LEHEN'KYI	Examineur

## **Implication des canaux perméables au calcium dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain.**

La structure de l'épiderme est le résultat de la régulation de l'équilibre entre la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes. Le calcium est l'un des seconds messagers contrôlant ces mécanismes. Parmi les différents acteurs de l'homéostasie calcique, les canaux ioniques jouent un rôle majeur. Ainsi, l'identification de ces canaux et des mécanismes par lesquels ils régulent la différenciation, la prolifération et la migration des kératinocytes est primordiale pour une meilleure compréhension de la physiologie de la peau humaine.

Mes travaux se sont donc focalisés sur l'implication de ces canaux calciques dans les mécanismes impliqués dans le développement de l'épiderme.

Les résultats ainsi obtenus ont pu mettre en évidence que la présence du canal TRPV6 à la membrane des kératinocytes est importante pour leur différenciation et qu'elle pouvait être régulée par un mécanisme de translocation à la membrane plasmique. Ces travaux montrent également, pour la première fois, que le canal Orai1 et la protéine réticulaire STIM1 sont exprimés dans les kératinocytes de l'épiderme humain et qu'ils participent au courant calcique de type SOC. Le canal Orai1 est principalement impliqué dans la prolifération et la migration des kératinocytes non-différenciés, correspondant aux cellules de la couche basale de l'épiderme. L'implication d'Orai1 dans la migration des kératinocytes est liée à son rôle dans la dynamique de l'assemblage et du désassemblage des adhésions focales passant par l'activation de la protéine kinase FAK.

Enfin, des résultats préliminaires montrent que lors de la différenciation des kératinocytes induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire plusieurs phases de variation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique font leur apparition et mettent en jeu les canaux TRPV6 et Orai1 de façons différentes.

## **Involvement calcium-permeable channels in human epidermis homeostasis.**

Structure of epidermis is the result of a fine regulated balance between proliferation, differentiation and migration of keratinocytes. Calcium is one of the second messengers controlling these mechanisms. Among the different players in calcium homeostasis, ionic channels play a major role. The study of these channels and the mechanisms by which they regulate the differentiation, the proliferation and the migration of keratinocytes is therefore crucial in the understanding of skin physiology.

This study is focused on these different  $\text{Ca}^{2+}$  channels and their implication in the development of the epidermis.

The results obtained have shown that TRPV6 plasma membrane expression in keratinocytes is important for differentiation and that it could be regulated by its translocation to the plasma membrane. These results also showed, for the first time, that the Orai1 channel and the ER protein STIM1 are expressed in human epidermis' keratinocytes and are involved in SOC current. Also, Orai1 is mostly implicated in proliferation and migration of non-differentiated keratinocytes, like the cells in the basal layer of epidermis. Orai1 is, in fact, involved in the dynamic of the formation and the turnover of focal adhesions through activation of the protein kinase FAK.

Finally, preliminary results have shown that  $\text{Ca}^{2+}$ -induced differentiation of keratinocytes induces several phases of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration variations involving TRPV6 and Orai1 channels in different ways.

**Aux membres du Jury :**

Pr. N. Prevarskaya, Dr. P. Delmas, Dr. P. Vacher, Dr. T. Oddos, Pr. R. Skryma, et Dr. V. Lehen'kyi.

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

Ayant bien conscience du temps nécessaire que vous avez consacré à la lecture critique et à l'analyse de ce travail, j'espère, humblement, participer à l'enrichissement de vos connaissances sur l'implication du calcium dans la physiologie de l'épiderme humain.

Madame la Présidente, C'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de présider ce jury mais aussi de façon plus globale que vous m'avez accepté dans votre laboratoire.

Messieurs le Docteur P. Delmas et le Docteur P. Vacher,  
Recevez toute ma gratitude pour votre lecture critique de ce manuscrit de thèse, pour laquelle vous avez accepté de consacrer votre temps.

Monsieur le Docteur T. Oddos,  
Veuillez accepter mes remerciements pour votre participation à ce jury. Je souhaite que mon travail dans le domaine de la physiologie dermatologique participe à la poursuite de votre collaboration avec mes successeurs.

Messieurs le Professeur R. Skryma et le Docteur V. Lehen'kyi,  
Merci pour votre participation à ma thèse et de m'avoir encadré et soutenu tout au long de ces quatre années.



Je tiens à remercier tous les membres du laboratoire présents et passés.

Je remercie tout particulièrement le Pr Prevarskaya pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire et pour l'ensemble de ces conseils

Je remercie le Pr Skryma et le Dr Lehen'kyi pour m'avoir encadré durant cette thèse, mais aussi le Dr Beck pour m'avoir transmis son savoir et son expérience dans l'étude des kératinocytes.

Je remercie tous les étudiants, thésards et masters, avec qui j'ai pu partager des moments de détente entre les manips. Je remercie par la même occasion mon partenaire de Badminton.

Je remercie ma famille qui m'a toujours soutenu dans mes choix, et sans qui je ne serais jamais arrivé où j'en suis.

Je remercie tous mes amis, qui ont participé, sans forcément le savoir, à la réussite de cette thèse. Je ne pourrais pas les nommer tous, la liste serait trop longue, mais je tiens à remercier tout spécialement Nicolas et Olivier.

Enfin, je remercie la personne qui a su me supporter durant ces 4 années et avec qui je partage ma vie depuis maintenant près de 9 ans, Dorothée.

MERCI.

# Table des matières

<b>Glossaire.....</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>8</b>
<b>I. Structure de la peau.....</b>	<b>2</b>
I.A. Anatomie générale .....	2
I.B. L'hypoderme .....	3
I.C. Le derme.....	4
I.D. La jonction dermo-épidermique.....	5
I.E. L'épiderme .....	6
<b>II. Croissance de l'épiderme.....</b>	<b>8</b>
II.A. Ultrastructure de l'épiderme .....	8
II.A.1. La couche basale.....	9
II.A.2. La couche épineuse.....	11
II.A.3. La couche granuleuse .....	12
II.A.4. La couche cornée .....	12
II.B. Différenciation des kératinocytes.....	13
II.B.1. la différenciation précoce.....	14
II.B.2. La différenciation terminale.....	16
II.B.3. La desquamation .....	17
II.C. Régulation de la différenciation.....	17
II.C.1. Régulation par le Calcium .....	18
II.C.2. Régulation par la vitamine D3 .....	21
II.D. Prolifération des kératinocytes .....	23
II.D.1. La division asymétrique des kératinocytes .....	23
II.D.2. Régulation par les facteurs de croissance .....	24
II.D.3. Régulation par le calcium .....	25
II.D.4. Facteurs inhibant la prolifération.....	26
II.E. Migration des kératinocytes .....	27
II.E.1. Les intégrines .....	27

II.E.2. Les adhésions focales (FA) .....	29
II.E.3. Le Calcium dans la migration .....	32
II.F. La cicatrisation .....	33
<b>III. Le Calcium .....</b>	<b>35</b>
III.A. Distribution du calcium dans la cellule .....	36
III.B. La signature calcique .....	37
III.C. Les acteurs de la signalisation calcique .....	39
III.C.1. les protéines chélatrices .....	39
III.C.2. les pompes calciques .....	39
III.C.3. l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ .....	40
III.C.4. Les canaux calciques .....	40
<b>IV. Les canaux calciques dans l'épiderme .....</b>	<b>40</b>
IV.A. La super-famille des canaux TRP .....	41
IV.A.1. Les canaux TRP thermosensibles de l'épiderme .....	45
IV.A.2. Le canal TRPV6 .....	48
IV.A.3. Les canaux TRPC1/TRPC4 .....	49
IV.B. Le canal Orai1 .....	50
 <b>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS .....</b>	 <b>54</b>
<i>Problématique</i> .....	<i>55</i>
<i>Objectifs</i> .....	<i>56</i>
 <b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	 <b>57</b>
<b>I. La culture cellulaire .....</b>	<b>58</b>
I.A. Les lignées cellulaires .....	58
I.B. Conditions de culture .....	59
<b>II. Technique d'imagerie calcique .....</b>	<b>61</b>
II.A. Mesure de la concentration de calcium libre .....	61
II.B. Charge des cellules en Fura-2/AM .....	62
II.C. Le Fura-2 .....	63
II.D. Equipement optique .....	64
II.E. Imagerie Calcique par microscopie confocale .....	65
<b>III. Electrophysiologie .....</b>	<b>66</b>

III.A. Patch Clamp .....	66
III.B. Solutions utilisées .....	67
<b>IV. Transfection.....</b>	<b>68</b>
IV.A. Les petits ARN interférents (siRNA).....	68
IV.B. Lipofection .....	69
IV.C. Nucléofection .....	69
<b>V. Quantitative real-time PCR.....</b>	<b>70</b>
V.A. Extraction des ARNs .....	70
V.B. Transcription inverse .....	70
V.C. Quantitative real-time PCR.....	71
V.D. Analyse des résultats .....	72
<b>VI. Immunodétection .....</b>	<b>73</b>
VI.A. Extraction des protéines .....	73
VI.B. Western Blot.....	73
VI.C. Technique d'immunofluorescence .....	74
VI.D. Immunohistochimie.....	75
<b>VII. Test de migration.....</b>	<b>76</b>
VII.A. Test de blessure ou "Wound healing assay" .....	77
VII.B. Etude de la migration polarisée par marquage de la membrane .....	78
VII.C. Transwell® .....	79
<b>VIII. Test de viabilité .....</b>	<b>81</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>82</b>
<b>I. Rôles d'Orai1 et de STIM1 dans l'homéostasie de l'épiderme humain .....</b>	<b>84</b>
Article 1 .....	84
<b>II. Le rôle des canaux SOC et du canal TRPV6 dans les entrées de Ca<sup>2+</sup> lors de l'induction de la différenciation des kératinocytes humains.....</b>	<b>86</b>
Résultats préliminaires .....	115
Article 2.....	129
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>140</b>
<b>I. Implication du canal Orai1 et de STIM1 dans la prolifération et la migration des kératinocytes humains .....</b>	<b>141</b>

I.A. Expression d'Orai1 et de STIM1 dans l'épiderme humain.....	141
I.B. Orai1 et STIM1 dans la prolifération des kératinocytes humains .....	143
I.C. Orai1 et STIM1 dans la migration des kératinocytes humains .....	144
<b>II. Rôle des canaux perméables au calcium dans la différenciation des kératinocytes humains .....</b>	<b>146</b>
II.A. Rôle du courant SOC dans la différenciation des kératinocytes humains .....	146
II.B. Rôle de TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes humains .....	148
II.C. Rôle des canaux SOC et du canal TRPV6 dans l'entrée de calcium induisant la différenciation des kératinocytes.....	149
II.D. Interactions des canaux SOC avec TRPV6 .....	152
<b>III. Rôle des canaux perméables au calcium dans la physiopathologie de l'épiderme humain.....</b>	<b>153</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>156</b>
<b>I. Régulation de la migration des kératinocytes humains par le canal Orai1.....</b>	<b>157</b>
<b>II. Rôle des canaux perméables au Ca<sup>2+</sup> dans la différenciation des kératinocytes .....</b>	<b>158</b>
<b>III. Interactions des différents canaux calciques exprimés dans l'épiderme humain....</b>	<b>158</b>
<b>IV. implications des canaux calciques dans les pathologies dermatologiques et les effets du vieillissement.....</b>	<b>160</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>162</b>
<b>PUBLICATIONS .....</b>	<b>164</b>
<b>ANNEXE .....</b>	<b>166</b>
Article 1 .....	169
Article 2.....	197
Article 3.....	208
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>221</b>

# Glossaire

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAPTA	1,2-Bis(o-AminoPhenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
BPE	Bovine Pituitary Extract
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaM	Calmodulin
cAMP	Adénosine Monophosphate cyclique
CaR	Calcium Receptor
CaRE	Ca <sup>2+</sup> Reponse Element
CCE	Capacitative Ca <sup>2+</sup> Entry
CK	Cytokeratin
CRAC	Calcium Release Activated Ca <sup>2+</sup> Channel/Current
DAG	Diacylglycérol
DRIP	vitamin D3 Receptor Interacting Protein
DSG	Desmogléine
DSP	Desmoplakine
DVF	Divalent Free Medium
EDTA	Ethylene DiamineTetraacetic Acid
EGF	Epidermal Growth Factor
EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ERG	ElectroRétinoGramme
FA	Focal Adhesion
FAK	Focal Adhesion Kinase
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate
FLG	Filaggrine
Fura2-AM	Fura2-AcetoxyMethyl ester
Glc	Glucose
GFP	Green Fluorescent Protein

HaCaT	Human adult low Calcium high Temperature
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	(4-(2-HydroxyEhyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid)
hPK	human Primary Keratinocytes
hPRT	Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase
IP <sub>3</sub>	Inositol TrisPhosphate
IP <sub>3</sub> -R	Inositol TrisPhosphate Receptor
IVL	Involucrine
KO	Knock-Out
K-SFM	Serum Free Medium
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
MEC	Matrice ExtraCellulaire
Mg <sup>2+</sup>	Magnésium
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
NGF	Nerve Growth Factor
NHK	Normal Human Keratinocyte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC	Phospholipase C
RE	Reticulum Endoplasmique
SERCA	Sarco-endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SCCE	Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme
siRNA	small interferent RNA (petits ARN interférants)
SOC	Store-Operated Channel/Current
SOCE	Store-Operated Ca <sup>2+</sup> entry
STIM	STromal Interacting Molecule
TG	Thapsigargin
TGase	Transglutaminase
TGFβ	Tumour Growth Factor
TRP	Transient receptor potential
TRPA	Transient receptor potential Ankyrin

TRPC	Transient receptor potential Canonical
TRPM	Transient receptor potential Melastatin
TRPML	Transient receptor potential Mucolipin
TRPN	Transient receptor potential « NOMPC »
TRPP	Transient receptor potential Polycystin
TRPV	Transient receptor potential Vanilloid
VD3	Vitamine D3
VDR	Vitamine D3 Receptor
VDRE	Vitamine D3 Response Element



# INTRODUCTION

*« La connaissance scientifique possède en quelque sorte des propriétés fractales: nous aurons beau accroître notre savoir, le reste -- si infime soit-il -- sera toujours aussi infiniment complexe que l'ensemble de départ. »*

**Isaac Asimov**

# I. Structure de la peau

## I.A. Anatomie générale

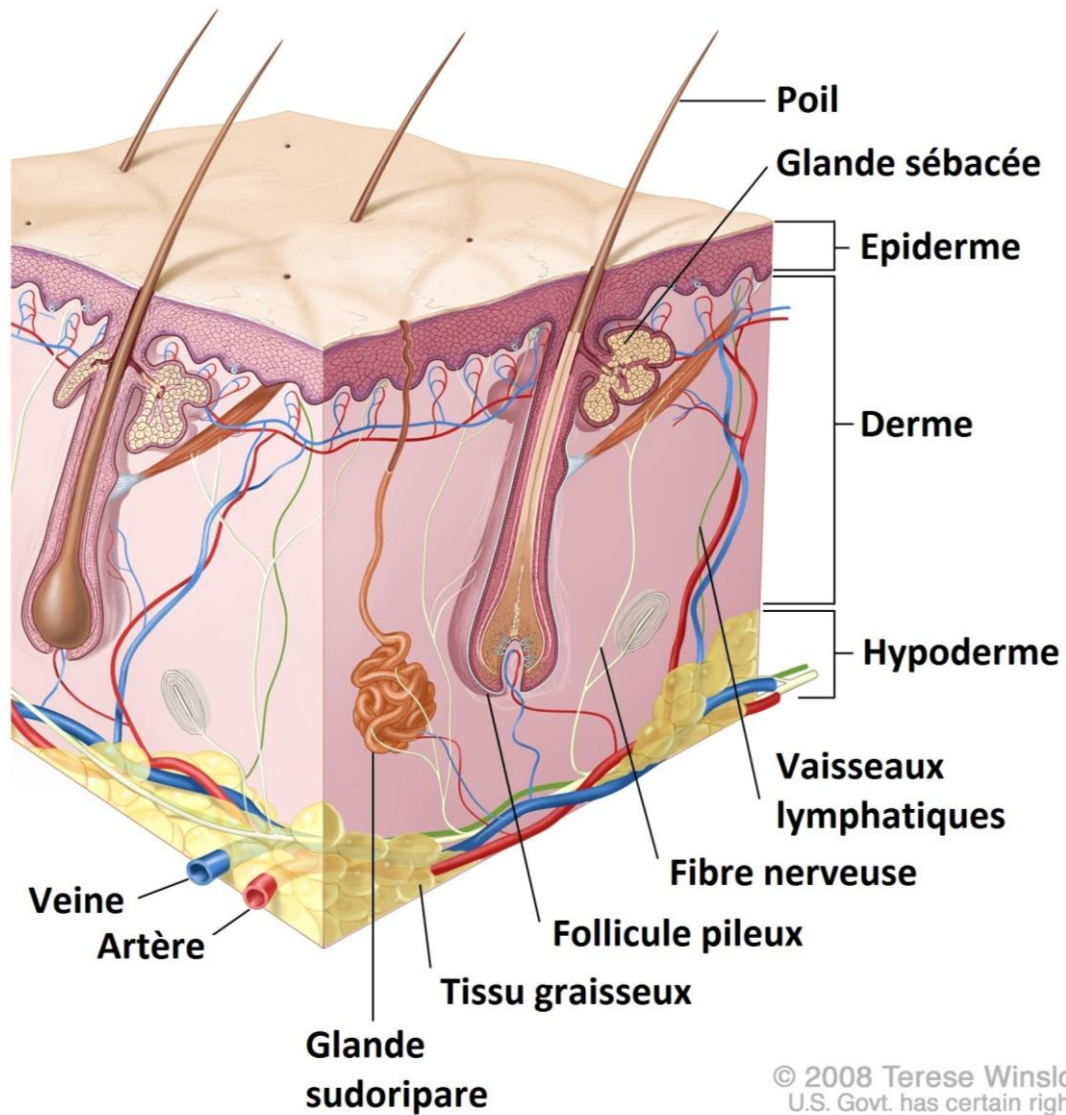
La peau est le « vaisseau » du corps humain ; elle reçoit et transporte, accepte et rejette selon les besoins de l'organisme. Elle protège, respire, sent et s'adapte. Aussi robuste que la peau puisse paraître, le bon fonctionnement de ces différents rôles requière une attention et un entretien particulier. En effet, une rupture de l'organisation complexe de la peau rend celle-ci et l'organisme qu'elle protège plus sensible aux blessures et aux pathologies. Par conséquent, l'organe protecteur du corps humain est aussi fragile qu'il paraît résistant.

La peau, aussi appelée tégument (du latin *tegumentum*, couverture) recouvre une superficie variant entre 1,5 et 2 m<sup>2</sup> chez un individu adulte (1). Selon la région du corps et les conditions auxquelles la peau est soumise, son épaisseur est comprise entre 1 mm au niveau des paupières (peau fine) et 4 mm au niveau palmo-plantaire (peau épaisse). La peau représente jusqu'à 16% du poids corporel et, par conséquent, elle constitue, quantitativement, l'organe le plus important du corps humain (1).

La peau ne joue pas uniquement un rôle de couverture, elle assure la protection des autres organes en agissant comme une barrière chimique, physique et biologique entre l'organisme et l'environnement extérieur (2, 3). D'autre part, elle est un organe sensoriel majeur, impliqué en particulier dans la perception du toucher. La peau joue également un rôle au niveau de la régulation de la température corporelle, de l'excrétion des déchets et de la synthèse de la vitamine D (1).

Sur un plan structural, la peau est formée de trois tissus superposés ([Figure 1](#)). L'**épiderme** (du grec *epi-* dessus et *derma*, la peau) et le **derme** sont solidement soudés l'un à l'autre par l'intermédiaire de la jonction dermo-épidermique et cet ensemble est supporté par l'**hypoderme** sous-jacent (du grec *hypo-* en dessous) (4).

# ANATOMIE DE LA PEAU



© 2008 Terese Winslow  
U.S. Govt. has certain rights

**Figure 1** : Schéma d'une coupe transversale de la peau montrant sa structure générale avec la superposition de l'hypoderme, du derme et de l'épiderme, ainsi que les différents éléments qu'ils contiennent. (© Terese Winslow)

## I.B. L'hypoderme

**L'hypoderme**, ou *fascia superficiel*, représente le tissu adipeux sous-cutané, constitué de tissu conjonctif lâche (1). Ce tissu ne fait pas véritablement partie de la peau, mais il est en interaction fonctionnelle avec la peau et il lui permet d'assurer certaines de ses fonctions de protection (4). L'hypoderme s'invagine dans le derme et y est rattaché par des fibres de collagène et d'élastine. Il est essentiellement constitué d'adipocytes, un type de cellules spécialisées dans le stockage des graisses. L'hypoderme joue par conséquent un rôle de réserve énergétique et il participe également à la thermorégulation, grâce au caractère isolant thermique du tissu adipeux.

## I.C. Le derme

**Le derme** est un tissu conjonctif de soutien qui provient du mésoderme embryonnaire (5). Le derme adhère très fortement à l'épiderme par l'intermédiaire de la membrane basilaire. Son épaisseur varie entre 2 et 4 mm (1). Les **fibroblastes** sont les principales cellules du derme. Ils sont spécialisés dans la synthèse de plusieurs types de fibres protéiques : les fibres de collagène, les fibres du système élastique dont l'élastine, les glycoprotéines et les protéoglycanes (6). L'ensemble de ces protéines forme un réseau fibreux macromoléculaire appelé matrice extracellulaire (MEC) dont la composition détermine ses propriétés mécaniques. Les fibres de collagène confèrent au derme une résistance aux tractions, les fibres du système élastique lui donnent des propriétés élastiques et les protéoglycanes sont responsables de la résistance à la compression. D'autres cellules sont présentes dans le derme mais de façon minoritaire comparativement aux fibroblastes, il s'agit de cellules du système immunitaire, en particulier des macrophages, des lymphocytes et des mastocytes (7). Le derme est un tissu vascularisé, ce qui lui permet non seulement d'apporter à l'épiderme énergie et nutriments, mais aussi de jouer un rôle primordial dans la thermorégulation et la cicatrisation. Il est également pourvu d'un important réseau de terminaisons nerveuses, de glandes sébacées et sudoripares, ainsi que de follicules pileux, bien que ces derniers proviennent de l'épiderme. Le derme se subdivise en deux régions histologiques :

**Le derme papillaire** (superficiel) : Ce nom provient de la présence de nombreuses papilles dermiques qui servent à accroître l'adhésion et les échanges avec l'épiderme. Il est plus

cellulaire, vascularisé et innervé que le derme réticulaire. Il se compose de fines fibres de collagène et d'oxytaline qui s'entrecroisent pour former un réseau irrégulier et peu dense.

**Le derme réticulaire** (profond) : Il contient des fibres de collagène, d'élaunine et d'élastine de diamètre plus important qui s'orientent parallèlement aux lignes de tension afin d'accroître la résistance mécanique de la peau. Le derme réticulaire constitue la plus grande portion du derme (4).

## I.D. La jonction dermo-épidermique

**La jonction dermo-épidermique** est une région acellulaire séparant le derme de l'épiderme qui assure plusieurs fonctions fondamentales (6, 8, 9) ([Figure 2](#)):

- Support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme.
- Déterminer la polarité des kératinocytes de la couche basale de l'épiderme essentielle pour la différenciation.
- Barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments.

La jonction dermo-épidermique est classiquement divisée en 4 zones, de l'épiderme au derme (8):

**La membrane des kératinocytes** de la couche basale de l'épiderme, par l'intermédiaire des hémidesmosomes, assure leur ancrage à la lame basale, aussi appelée lame basilaire.

**La lame basale** est, quant à elle, composée de deux structures :

**La lamina lucida** (20 à 40 nm d'épaisseur) est traversée par des filaments d'ancrage riches en laminines qui se lient essentiellement aux extrémités extracellulaires des intégrines  $\alpha 6\beta 4$  à la surface des kératinocytes pour former un complexe d'adhésion avec les hémidesmosomes (10).

**Les hémidesmosomes** sont formés de plaques denses composées de plectines et des BP180 et 230, dans lesquelles viennent s'insérer les filaments intermédiaires de kératines (11).

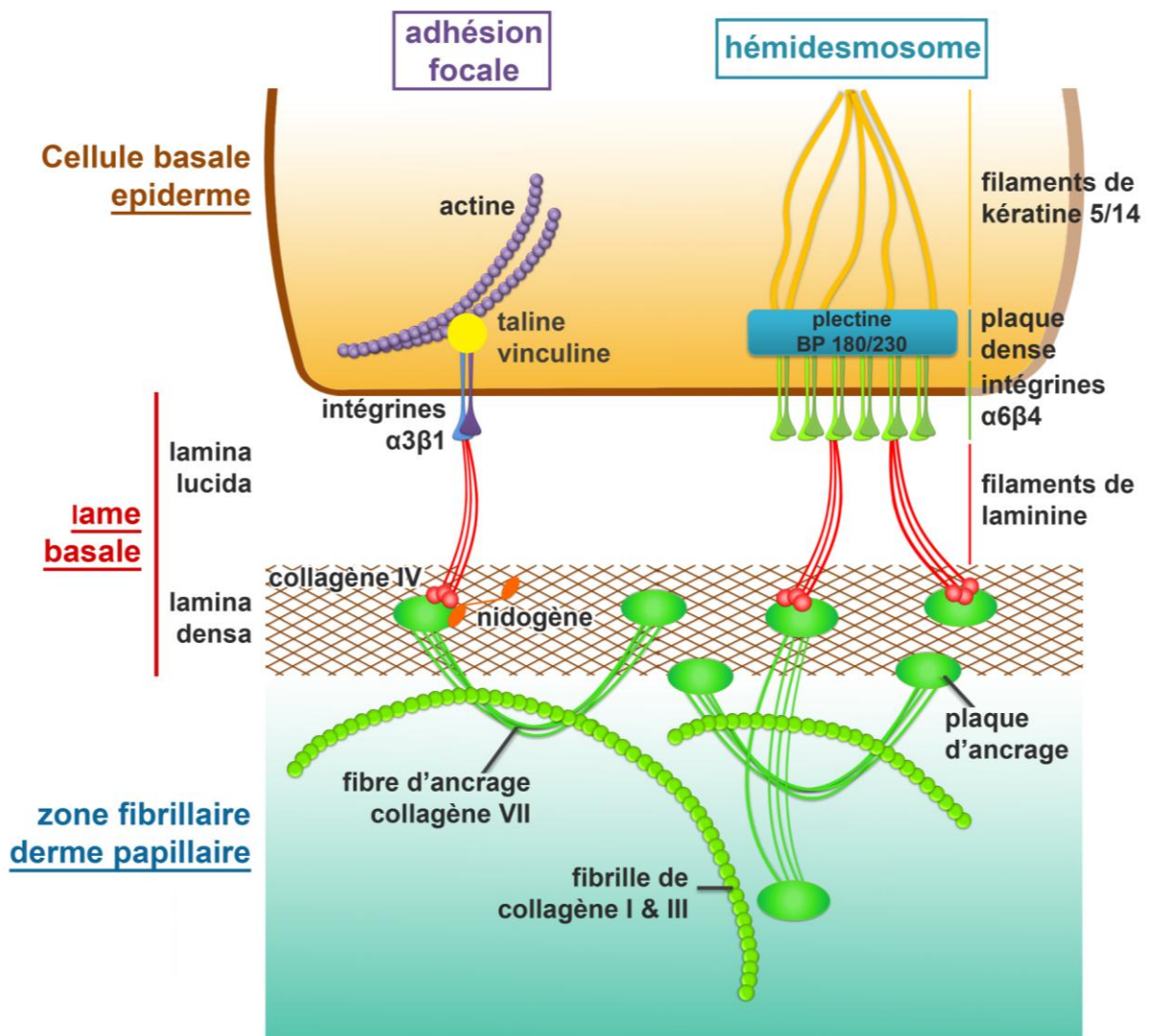
Entre les hémidesmosomes, les filaments d'ancrages se lient aux intégrines  $\alpha 3\beta 1$  pour former des adhésions focales (10, 12).

**La lamina densa** (30 à 60 nm) est majoritairement constituée de collagène de type IV, de laminines, de nidogène et de proteoglycanes. Elle constitue une zone d'ancrage

intermédiaire pour les filaments et les fibres issus de l'épiderme et de la zone fibrillaire (8, 13).

**La zone fibrillaire** contient des fibres d'ancrages (collagène de type VII) reliant la lamina densa de la membrane basale à des plaques d'ancrage dans le derme papillaire (8).

## LA JONCTION DERMO-EPIDERMIQUE



**Figure 2** : Représentation des différentes structures composant la jonction dermo-épidermique, des cellules basales épidermiques à la zone fibrillaire du derme papillaire. (Modifié à partir de © 2006 Netzwerk Epidermolysis bullosa)

## I.E. L'épiderme

**L'épiderme** est un tissu dérivé de l'ectoderme embryonnaire qui forme la couche la plus externe de la peau (5). Il s'agit d'un épithélium pavimenteux pluristratifié, kératinisé, dont l'épaisseur varie entre 0.05 et 1 mm en fonction de sa localisation. On dit que cet épithélium est pavimenteux car les cellules superficielles sont plates et forment un pavage. Ce tissu est aussi qualifié de pluristratifié ou de « malpighien », car il est composé de plusieurs assises cellulaires. Enfin, cet épithélium est dit kératinisé, car il est le lieu de synthèse de protéines particulières, les kératines.

L'épiderme est composé de plusieurs types de cellules épithéliales. On distingue les kératinocytes (du grec *keras*, corne) qui sont les cellules majoritaires de l'épiderme (entre 80 et 90%). Ces cellules synthétisent des kératines, protéines fibreuses insolubles dans l'eau, qui leur confèrent des propriétés mécaniques singulières, à l'origine de la fonction protectrice de l'épiderme (14). On distingue également 3 autres types de cellules, les mélanocytes, les cellules de *Langerhans* et les cellules de *Merkel*. Ces cellules participent à des fonctions spécialisées, fondamentales de l'épiderme (15). Les mélanocytes ont pour fonction de synthétiser la mélanine, un pigment nécessaire à la protection des cellules de la couche basale de l'épiderme des effets délétères des rayonnements Ultra-Violets (UV) et qui détermine la couleur de la peau (phototype) (16, 17). Les cellules de Langerhans sont des cellules à caractère immunitaire dont l'activité assure le premier élément de la barrière immunitaire de la peau (18, 19). Enfin, les cellules de Merkel jouent un rôle de mécanorécepteur et sont impliquées en particulier dans la fonction du toucher (20, 21). Ces cellules interagissent avec des fibres nerveuses sensibles contenues dans l'épiderme afin d'intégrer les signaux tactiles au niveau central.

Au niveau structural, l'épiderme s'organise en quatre couches distinctes qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle : la couche basale (ou *stratum basal*), la couche épineuse (ou *stratum spinosum*), la couche granuleuse (ou *stratum granulosum*), et la couche cornée (ou *stratum corneum*) (1). Dans la peau dite « épaisse », on distingue une cinquième couche appelée la couche de transition aussi appelée couche claire (ou *stratum lucidum*) située entre les couches granuleuse et cornée (22). Au cours de leur progression de la couche basale vers la couche cornée, les kératinocytes passent par différentes étapes du processus de différenciation terminale. Cette maturation prend de 4 à 6 semaines et permet à l'épiderme de se renouveler continuellement.



La suite de l'introduction générale de cette thèse se focalisera sur la structure et les principales fonctions physiologiques de l'épiderme, et plus précisément des kératinocytes.

## II. Croissance de l'épiderme

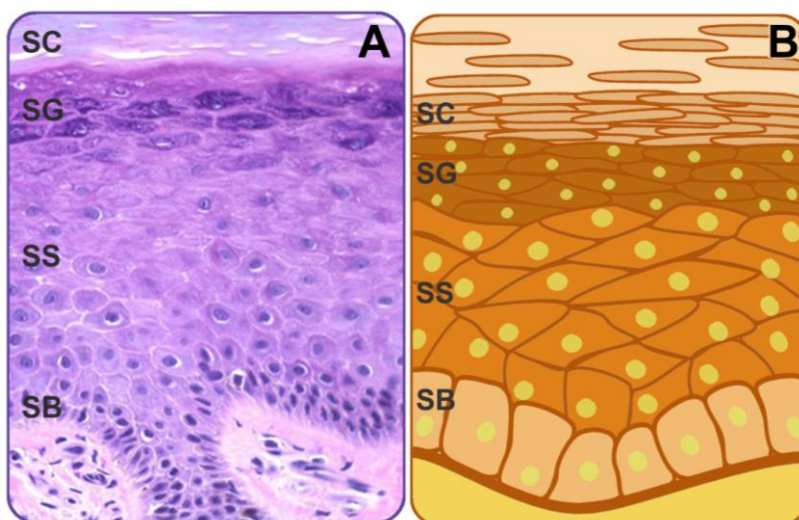
### II.A. Ultrastructure de l'épiderme

L'**épiderme** est un épithélium pavimenteux stratifié. Ce caractère est la conséquence de la répartition des kératinocytes en 4 ou 5 couches différentes. Classiquement, on distingue de la profondeur vers la superficie (*Figure 3*) :

- La **couche basale** ou couche germinative
- La **couche épineuse** ou couche du corps muqueux de Malpighi
- La **couche granuleuse**
- La couche de transition (uniquement dans la peau très épaisse)
- La **couche cornée**

La différenciation des kératinocytes se fait de la couche basale vers la surface de l'épiderme.

### L'ÉPIDERME



**Figure 3** : A. Coupe de peau humaine marquée à l'éosine et hématoxyline. B. Représentation schématique de la composition cellulaire de l'épiderme. On retrouve dans les deux figures la séparation de l'épiderme en plusieurs strates/couches, **SB** : Stratum Basale ; **SS** : Stratum Spinosum ; **SG** : Stratum Granulosum ; **SC** : Stratum Corneum).

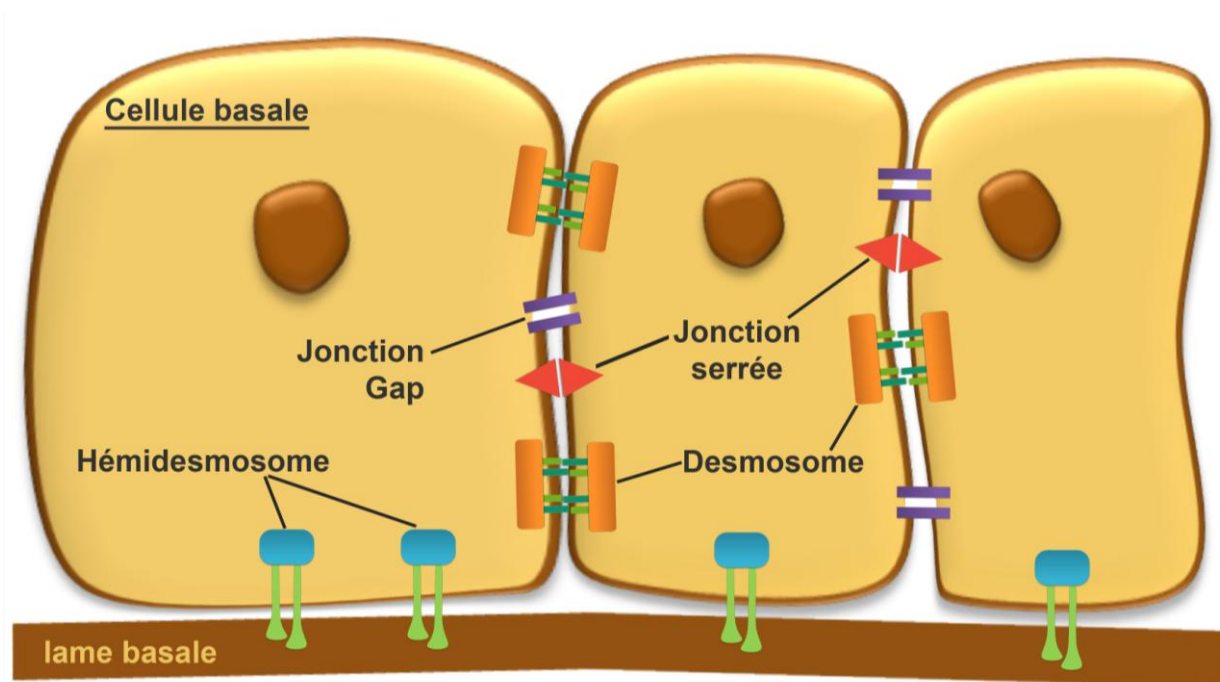


## II.A.1. La couche basale

La **couche basale** de l'épiderme est formée de l'ensemble des kératinocytes directement en contact avec la jonction dermo-épidermique sur laquelle ils s'accrochent. Ils forment une seule assise de cellules cylindriques à noyau allongé, dont le grand axe est perpendiculaire à la lame basale. Cette couche de cellules est responsable des grandes fonctions physiologiques indispensables au développement de l'épiderme telles que la **prolifération**, la **migration** et la **différenciation**.

Le nom de cellules germinatives que l'on donne aux kératinocytes de la couche basale vient du fait que ces cellules sont, mitotiquement, les plus actives de l'épiderme. En effet, les cellules de la couche basale de l'épiderme se divisent constamment pour contrebalancer le phénomène de desquamation à la superficie.

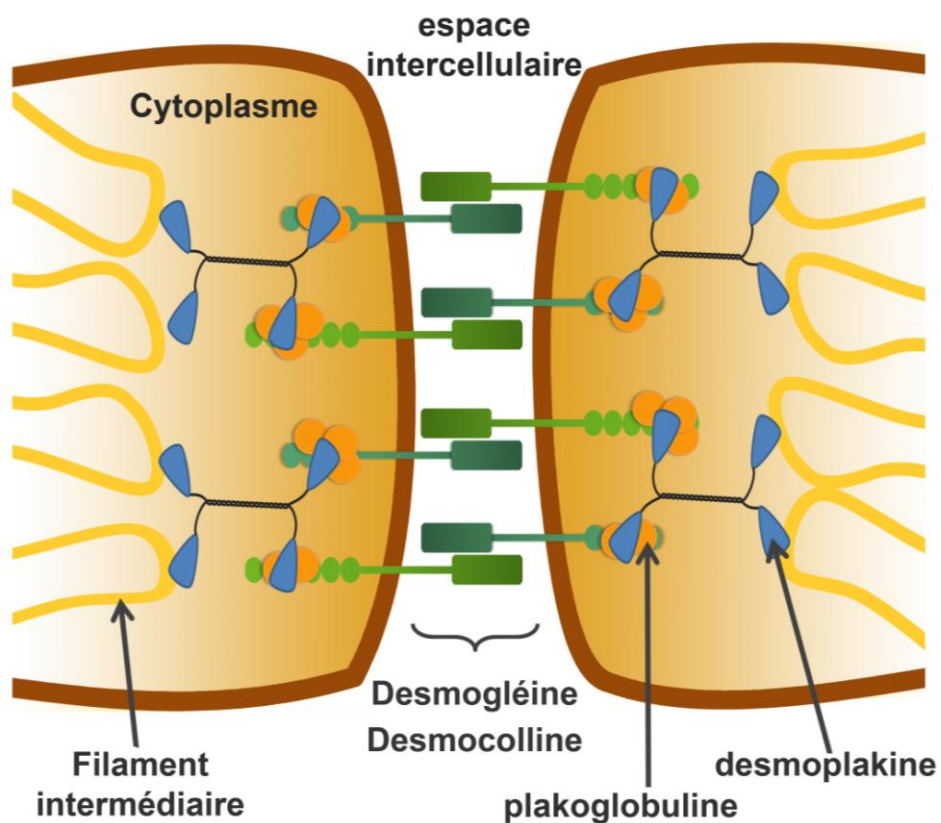
### LES JONCTIONS DES CELLULES BASALES



**Figure 4** : Représentation des principales jonctions présentes entre les cellules basales et la lame basale et entre les cellules conférant ainsi une cohésion tissulaire stable.

Ces cellules sont caractérisées par la présence de nombreuses protéines de structures et d'adhésions responsables d'un attachement solide entre les cellules, et entre les cellules et la lame basale ([figure 4](#)). On retrouve des tonofilaments regroupés en faisceaux correspondant à des **kératines** (23). Les cytokératines 5 et 14 sont spécifiques à cette couche et vont se lier à des **hémidesmosomes**, des **desmosomes**, ou des **jonctions serrées**. On y trouve également des **jonctions gap** formées par des connexines (24-27). Les hémidesmosomes, assurant la cohésion des cellules à la lame basale, sont exclusivement exprimés dans cette couche de l'épiderme. Tandis que l'expression des autres structures d'adhésions sera plus importante dans les couches suprabasales.

## STRUCTURE DES DESMOSOMES



**Figure 5** : Représentation schématique de l'aspect ultrastructural des desmosomes dans les kératinocytes humains.

Les **desmosomes** (du grec desmos : lien et sôma : corps) sont formés de deux plaques de forme discoïde et symétriques permettant de lier solidement les cellules entre elles ([figure 5](#)). Autrement dit, les desmosomes constituent des jonctions d'ancrage. Sur chaque plaque est fixé un certain nombre de tonofilaments (cytokératines). De fines protéines, les cadhérines, relient les plaques de chaque cellule entre elles et forment une ligne dense appelée desmogleie. Parmi ces cadhérines, on retrouve principalement les desmogléines 1 et 3 (Dsg1 et 3) ainsi que les desmocollines I et II (Dsc). Les protéines des plaques desmosomiales contiennent pour leur part, les desmoplakines I et II (DPI et II) ainsi que la plakoglobuline et la plakophiline (28, 29). On retrouve les desmosomes dans les différentes couches de l'épiderme, bien qu'ils soient plus abondants dans les couches suprabasales. Des expériences ont montré que l'augmentation du  $Ca^{2+}$  extracellulaire stimulait la production de cadhérines desmosomiales (30).

**Ainsi, l'ensemble de ces structures protéiques assurent une grande cohésion entre les cellules épidermiques et sont responsables de la grande résistance mécanique de la couche basale.** En effet, une perte de cette adhérence (acantholyse) est observée dans certaines pathologies telles que le pemphigus, dans laquelle des auto-anticorps contre les protéines desmosomiales sont synthétisés par le malade, conduisant à la dégradation des desmosomes et à la formation de bulles intra-épidermiques caractéristiques (31, 32).

## **II.A.2. La couche épineuse**

Les **cellules épineuses** forment 5 à 6 couches entre la couche basale et la couche granuleuse. Il s'agit de volumineuses cellules polygonales qui s'aplatissent dans les couches les plus superficielles. On observe dans le cytoplasme de ces cellules, des tonofilaments constitués de kératines. Ces kératines sont différentes et plus nombreuses que celles synthétisées dans la couche basale, il s'agit des **cytokératines 1 et 10** (CK1 et CK10) (23). Ces kératines sont ancrées aux **desmosomes** des cellules, ce qui leur attribue une allure épineuse en histologie. C'est ainsi que le nom de couche épineuse lui a été attribué. L'expression de ces cytokératines propres aux cellules suprabasales a conduit à l'utilisation de ces protéines comme marqueurs de différenciation absolus, largement utilisés dans la littérature afin d'identifier les cellules différenciées (33).

### II.A.3. La couche granuleuse

Cette couche est classiquement constituée de 3 couches de kératinocytes aplatis. On remarque en particulier dans ces cellules, une diminution nette de la quantité d'organites. Les kératines sont désorganisées par rapport à la couche précédente et les cellules perdent donc leur aspect épineux. Les cellules de la **couche granuleuse** sont également caractérisées par la présence de granulations à l'origine de la distinction de cette strate en histologie. Il existe 2 types de granulations, les **granulations de kératohyalines**, qui sont volumineuses et dépourvues de membrane apparente et les granulations de petite taille, appelées **kératinosomes**, corps lamellaires ou corps d'Odland, qui sont entourées d'une double membrane. Ces structures, en provenance de l'appareil de Golgi, migrent vers la périphérie des cellules, fusionnent avec la membrane plasmique et déversent dans le milieu extracellulaire des lipides qui vont jouer un rôle de ciment intercellulaire (34). Ceci participe à la constitution d'une barrière cutanée imperméable (35).

### II.A.4. La couche cornée

La **couche cornée** est la plus superficielle de la peau, elle est en contact avec l'environnement extérieur. Elle est composée de 4 à 20 couches de cellules en fonction de la localisation de la peau. Cette couche est responsable de la fonction de barrière de l'épiderme, d'où la nécessité d'assurer son renouvellement permanent (35). Les kératinocytes de la couche cornée ne possèdent plus de noyau, ni d'organites cytoplasmiques, ni de granules de kératohyaline (36). Ces cellules vestigiales sont alors appelées **cornéocytes**. La cellule est remplie de kératine qui se présente sous forme de faisceaux de filaments. La membrane plasmique persiste et s'épaissit. Elle est bordée sur sa face cytoplasmique d'une structure protéique (involucrine et kératohyaline) qui constitue un véritable squelette pour le cornéocyte. Une couche lipidique double la membrane sur sa face extracellulaire dans l'espace intercellulaire.

On distingue deux sous-couches à la couche cornée :

**La couche compacte** (*stratum compactum*), qui est formée des cellules kératinisées étroitement soudées. Elle fait suite à la couche granuleuse et assure la fonction barrière de l'épiderme. Dans cette sous-couche, les desmosomes sont remplacés par des structures simplifiées, les cornéodesmosomes, qui continuent à assurer une cohésion entre les cornéocytes et sont formés de structures spécifiques, les cornéodesmosines (37).

**La couche desquamante** (*stratum disjonctum*) qui se trouve en surface et au niveau de laquelle se fait la desquamation des cornéocytes (38).

**L'intégrité de la structure de l'épiderme est dépendante du bon déroulement du cycle de développement des kératinocytes, qui permet de renouveler la composition cellulaire du tissu. Le maintien de cette structure et de cette organisation tissulaire est responsable de la fonction première de la peau qui est de protéger l'organisme contre les agressions extérieures. Ceci est permis grâce à un équilibre entre la prolifération et la migration des cellules germinatives de la couche basale et la différenciation des kératinocytes au travers des couches de l'épiderme. La perturbation de cet équilibre peut, par conséquent, donner lieu au développement de cancers ou d'autres pathologies dermatologiques bénignes.**

## **II.B. Différenciation des kératinocytes**

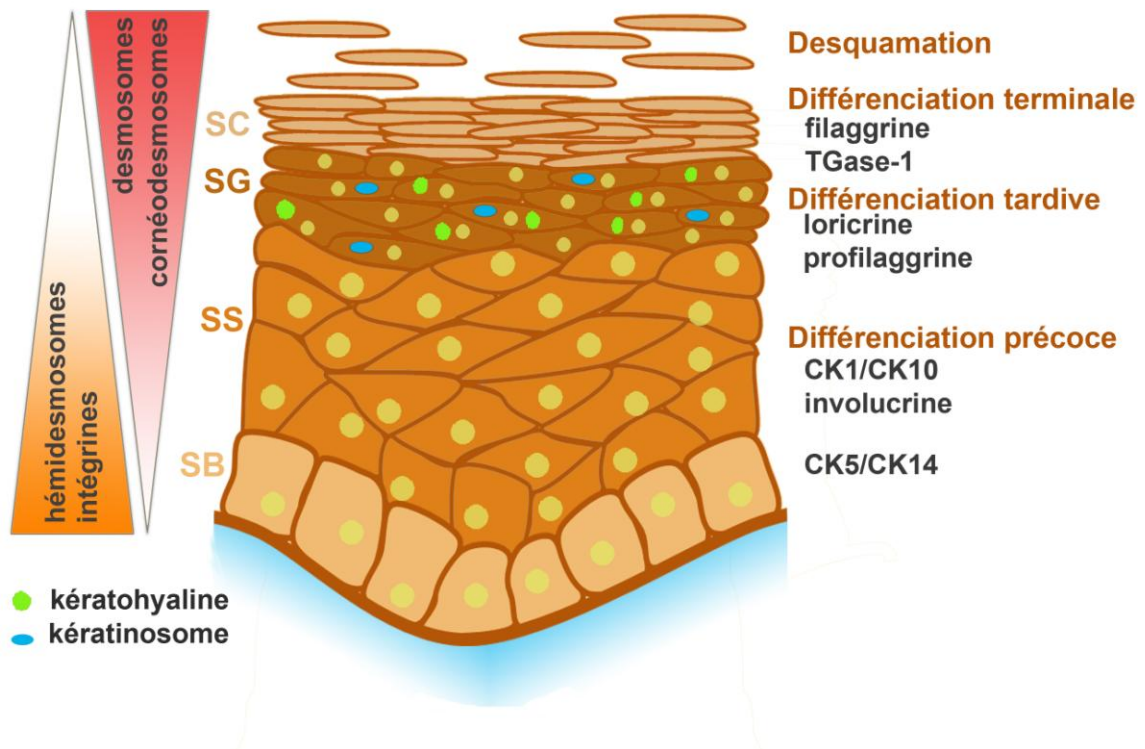
**Le processus de différenciation** d'un kératinocyte depuis la couche basale jusqu'à sa desquamation prend environ 4 à 6 semaines. Cette durée correspond au temps nécessaire à un kératinocyte de la couche basale pour se différencier et migrer jusqu'à la couche granuleuse, et le temps que les cellules restent dans la couche cornée (4). Par ailleurs, il a été montré que le renouvellement complet de l'épiderme est d'une durée variable en fonction de l'exposition de la peau et des conditions externes, ce laps de temps est compris entre 50 et 75 jours. Cependant ce temps peut être modifié dans des conditions pathologiques, c'est le cas du psoriasis dans lequel le renouvellement complet de l'épiderme est réduit à 8 jours conduisant à la formation d'un épiderme partiellement différencié jouant mal son rôle de barrière.

**La différenciation** progressive des cellules de la membrane basale vers la surface de l'épiderme s'accompagne d'une multitude de changements à l'échelle cellulaire. Les changements observés au cours de la différenciation sont très variables et incluent entre autre : la synthèse de protéines de structure, la réorganisation puis la perte des organelles, des variations du volume cellulaire, la modification des propriétés de la membrane plasmique et la déshydratation progressive du cytoplasme.

## II.B.1. la différenciation précoce

L'entrée des cellules de la couche basale dans un processus de différenciation est caractérisée par des modifications de l'expression de nombreuses protéines entraînant des changements de la morphologie et de la fonction des cellules.

## LA DIFFERENCIATION DES KERATINOCYTES



**Figure 6 :** Schéma représentatif de l'évolution des kératinocytes lors de leur progression dans le processus de différenciation. On observe alors une extinction de l'expression de certaines protéines d'adhésion (hémidesmosomes, intégrines) et de structure (CK1/14) ; accompagnée par une expression progressive d'autre protéines d'adhésion (desmosomes, cornéodesmosomes) et de structure (CK5/14, involucrine, profilaggrine, loricrine, TGase-A, filaggrine).

On observe, entre autre, la perte de l'attachement de ces cellules à la lame basale, majoritairement assuré par les **hémidesmosomes**. Les kératinocytes de la couche basale expriment également de nombreuses intégrines, certaines impliquées dans la structure des hémidesmosomes, d'autres dans la communication avec la matrice extracellulaire, l'adhésion cellulaire et la migration. Lorsque les kératinocytes se différencient, ils perdent l'expression de ces intégrines.

L'une des étapes principales de la différenciation des kératinocytes est le processus de « **kératinisation** », c'est-à-dire l'expression de diverses kératines, leurs interactions avec d'autres protéines et leur modification en fonction du stade de différenciation (24) ([figure 6](#)). Les cytokératines appartiennent à une classe complexe de protéines fibreuses à structure  $\alpha$ -hélicoïdale. Il s'agit de dimères à 6 chaînes polypeptidiques qui s'organisent pour former des filaments de 8 nm de diamètre. Il existe au moins 20 formes distinctes de kératines dans l'épithélium cutané et 10 autres dans les phanères qui sont qualifiées de kératines « dures ». Les kératines du groupe I sont des polypeptides acides de poids moléculaire compris entre 40 et 56,6 kDa. Les kératines de groupe II ont un point isoélectrique neutre ou basique et un poids moléculaire compris entre 52 et 67 kDa. Lors de la formation de filaments intermédiaires, les kératines s'associent par paires acide/basique puis se polymérisent. La synthèse des kératines débute dès la couche basale, où les cellules synthétisent les paires **CK5/CK14**. Cette synthèse continue dans les couches suprabasales par la formation des paires **CK1/CK10** et l'arrêt de l'expression des paires CK5/CK14 (39).

**Ces cytokératines** se regroupent en tonofilaments et s'associent avec des protéines de jonction interkératinocytaires comme les desmosomes, qui sont eux aussi surexprimés dans les couches suprabasales de l'épiderme (40).

La variation de l'expression de certaines protéines au cours de la différenciation a permis le développement de **marqueurs de différenciation**. L'expression de cytokératines distinctes dans la couche basale (CK5/14) et dans les couches suprabasales (CK1/10), a conduit à l'utilisation de ces protéines comme marqueurs de différenciation, largement utilisés dans la littérature afin d'identifier les cellules différenciées (33). D'autres marqueurs ont ensuite pu être mis en évidence et permettent de discriminer les phases précoces et tardives de la différenciation, correspondant respectivement à la couche épineuse et la couche granuleuse de



l'épiderme. Les cellules différenciées précoces sont ainsi caractérisées par l'expression des CK1 et 10, les Dsg1 et 3 (éléments des desmosomes) ainsi que l'**involucrine**.

Les cellules **différenciées tardives** expriment d'autres protéines telles que la **loricrine** et la **filaggrine** ([Figure 6](#)).

## II.B.2. La différenciation terminale

**La différenciation** est un processus génétiquement programmé qui s'observe aisément en microscopie par des changements structuraux au sein de l'épiderme. En se différenciant, les cellules deviennent de plus en plus spécialisées dans leur structure et leurs fonctions. Le stade ultime de cette **différenciation dite « terminale »** est la formation de cornéocytes qui sont des cellules complètement aplaties, qui ne possèdent ni noyau, ni organites cytoplasmiques. Ces cellules sont donc biologiquement mortes mais n'en demeurent pas moins actives (36, 41). Elles sont remplies de kératines et d'autres molécules comme des lipides, des acides gras et des céramides.

**La différenciation terminale** des kératinocytes implique la formation d'une matrice fibreuse intracornéocytaire, la production de lipides intercellulaires et l'apparition d'une couche cornée. La production de la matrice fibreuse est réalisée par l'interaction entre la **kératohyaline** et les cytokératines. Les granules de kératohyaline formés au niveau de la couche granuleuse produisent une protéine de grande taille (400 kDa) hautement phosphorylée, la **profilaggrine**, formée de 10 à 12 sous-unités de filaggrine (42). Au cours de la transition entre kératinocytes granuleux et cornéocytes, la profilaggrine est déphosphorylée puis clivée conduisant à la production de filaggrine qui va s'agréger avec les cytokératines et ainsi former une matrice fibreuse intracornéocytaire (43). Cette matrice protéique est riche en cystine, ce qui permet la formation de ponts disulfures entre les chaînes adjacentes de protéines fibreuses et donc augmente la résistance ainsi que le caractère insoluble de la kératine.

Au niveau de la couche granuleuse, les kératinosomes extrudent leur contenu lipidique dans l'espace intercellulaire. Ces vésicules contiennent plusieurs composés lipidiques tels que le cholestérol, des acides gras libres saturés et des céramides. Ces lipides s'organisent en feuillets intercornéocytaires qui participent à la cohésion de la couche cornée ainsi qu'à l'imperméabilisation de cette couche de l'épiderme (44). La formation de la couche cornée, ou **cornification**, correspond à la formation d'une matrice protéique rigide sous la membrane plasmique. Les **transglutaminases** (TGase) catalysent la formation de liaisons covalentes



entre deux protéines majeures de l'épiderme, la loritrine et l'involucrine. D'autres protéines sont de la même façon liées entre elles : on peut citer la cornifine et la loritrine, la pancornuline et les cornifines et enfin la filaggrine et les cornéodesmosines (45). Les interactions fortes entre l'ensemble de ces protéines donnent naissance à une forme de coque protéique très résistante à l'origine des propriétés mécaniques de la couche cornée et notamment de son rôle de barrière physique contre l'environnement.

### II.B.3. La desquamation

En y regardant de plus près, on distingue deux couches différentes de cornéocytes : la couche compacte où les cornéocytes, reliés les uns aux autres par les cornéodesmosomes, assurent la fonction barrière, et la couche desquamante où la dégradation de ces cornéodesmosomes provoque le phénomène de desquamation (35, 37, 38).

**La desquamation** résulte d'un double mécanisme : d'une part la destruction des membranes lipido-protéiques cornéocytaires et d'autre part, la dégradation enzymatique des cornéodesmosomes par des protéines spécialisées telles que la SCCE (*Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme*) (46). La desquamation est un mécanisme finement régulé mais dont les facteurs régulateurs sont encore mal connus.

## II.C. Régulation de la différenciation

Le développement de l'épiderme est sous le contrôle de plusieurs processus distincts et complémentaires permettant de remplir le rôle principal de la peau : former une barrière structurale contre les attaques de l'environnement. La conservation d'une structure stable est la conséquence de l'équilibre entre la **prolifération**, la **migration** et la **différenciation** des kératinocytes. Ces processus sont contrôlés par une quantité d'agents biologiques permettant de maintenir cet équilibre. Une altération quelconque de cette balance peut induire l'apparition de pathologies dermatologiques variées telles que des cancers, un psoriasis ou encore des dermatoses.

L'identification de ces agents régulant la différenciation des kératinocytes est donc d'un intérêt majeur.

## II.C.1. Régulation par le Calcium

L'épiderme *in vivo* et les kératinocytes *in vitro* constituent de bons modèles d'étude du mécanisme de différenciation. **Le calcium** est, quant à lui, un élément dont le rôle a été largement étudié dans le cadre de la différenciation des kératinocytes (47-49). En effet, si les kératinocytes sont cultivés dans un milieu de culture avec une concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  inférieure à 0.07 mM, ils continuent à proliférer et ne se différencient pas ou, du moins, très lentement. Réciproquement, l'augmentation de la concentration calcique au-delà de 0.1 mM, désignée dans la littérature comme le « *Calcium switch* », déclenche la **différenciation**. Ceci se traduit par une redistribution des protéines telles que la desmoplakine, la cadherine, les intégrines, les caténines, la plakoglobuline, la vinculine et l'actine du cytosol à la membrane où elles participent à la formation de jonctions intercellulaires (50). Le calcium induit également le transport à la membrane de la calmoduline (CaM) et la protéine kinase  $\text{Ca}$  (PKCa) (51).

Dans les heures suivant le *calcium switch*, les keratinocytes subissent des changements morphologiques et arrêtent de synthétiser les cytokératines 5 et 14 au profit des cytokératines 1 et 10 (49). Ils expriment par la suite d'autres protéines spécifiques de l'état différencié, telles que la profilaggrine, l'involucrine et la loritrine qui sont des précurseurs de la couche cornée (52, 53). Vient ensuite la synthèse d'une enzyme majeure dans la physiologie de l'épiderme, la transglutaminase (54, 55). Ainsi, la loritrine, l'involucrine et d'autres protéines sont associées et organisées structurellement par la transglutaminase  $\text{Ca}^{2+}$  sensible, exprimée à la surface des kératinocytes différenciés (56). Ceci conduit à la formation de la couche cornée visible dès 2 jours après addition de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture.

L'induction de l'expression de ces protéines est probablement le résultat d'une action génomique du calcium (directe ou indirecte) dans la mesure où l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est suivie d'une augmentation de la quantité d'ARNm ainsi que du taux de transcription (52, 57).

Plusieurs travaux ont par ailleurs déjà démontré que l'augmentation soutenue de  $\text{Ca}^{2+}$  activait des protéines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , telles que des facteurs de transcription AP-1 comprenant *JunB*, *JunD*, *Fra1* et *Fra2* qui stimulent l'expression de protéines fondamentales pour la différenciation (involucrine et transglutaminase-1) (58, 59).

La pertinence de la différenciation induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  *in vitro* par rapport aux conditions *in vivo* a pour origine l'existence d'un **gradient de  $\text{Ca}^{2+}$**  dans le milieu extracellulaire des

kératinocytes au sein de l'épiderme. Les couches les plus basales de l'épiderme ont une concentration calcique intercellulaire faible alors que les couches superficielles, où les cellules sont les plus différenciées, présentent les concentrations calciques les plus élevées (60, 61). Ce gradient calcique participe au maintien du processus de différenciation des kératinocytes et ainsi à la fonction de barrière de l'épiderme. Par ailleurs, on observe qu'une rupture de cette barrière épidermique mène à une perte du gradient calcique extracellulaire, associée à une augmentation de la prolifération des kératinocytes, ainsi qu'à une diminution du taux d'expression des marqueurs de différenciation, tels que la loricrine, la profilaggrine ou l'involucrine (62).

La réponse des kératinocytes au calcium est complexe. Le *calcium switch* induit une augmentation du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique biphasique que l'on peut décomposer en un pic initial suivi d'un plateau (63). Notons que des agents pro-prolifératifs tels que l'ATP stimulent uniquement des influx calciques transitoires au sein des kératinocytes. Ces influx sont comparables à la phase initiale de la réponse au *calcium switch*. Or les entrées de  $Ca^{2+}$  provoquées par de tels agonistes n'étant pas soutenues, ils sont incapables de déclencher le processus de différenciation (64).

Plusieurs acteurs protéiques fondamentaux dans la voie de transduction associée au *calcium switch* ont été identifiés au cours des dernières années.

Il a été mis en évidence l'expression d'un **récepteur au calcium** (CaR :  $Ca^{2+}$ -sensing Receptor). Les premiers travaux rapportant la réponse des kératinocytes au  $Ca^{2+}$  extracellulaire ont tout de suite été comparés à ceux réalisés dans les cellules des glandes parathyroïdes. En effet, il avait été démontré dans ces travaux que les cellules des glandes parathyroïdes expriment un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G, sensible au  $Ca^{2+}$  extracellulaire baptisé le **récepteur au  $Ca^{2+}$  (CaR)** (65). Or, l'expression de ce même récepteur a été démontrée dans les kératinocytes (66). Il existe en fait deux formes du CaR, une forme dite longue (CaR<sub>FL</sub> - Full Length- longueur complète) et une forme issue de l'épissage alternatif du gène du CaR caractérisée par une délétion de l'exon 5 (CaR<sub>ALT</sub> - forme Alternative) qui apparaît lors de la différenciation (67). La souris possédant une extinction du gène (ou souris KO - *knock out*) codant la forme CaR<sub>FL</sub>, continue à synthétiser la forme alternative CaR<sub>ALT</sub> et est caractérisée par une altération importante de l'expression des marqueurs de différenciation de la peau. Ceci suggère que la protéine CaR<sub>FL</sub> est importante pour la différenciation terminale de la peau chez la souris. Une récente

découverte du groupe de *Bikle* et collaborateurs a montré que cette protéine n'était en fait que très faiblement exprimée à la surface des kératinocytes. La majorité des CaR est exprimée à l'intérieur de la cellule, à la surface de l'appareil de Golgi, et interagit avec des acteurs importants de la régulation de la concentration des stocks calciques intracellulaire tels que les récepteurs IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>-R), les pompes calciques de l'appareil de Golgi (ATP2C1 ou SPC1) et la phospholipase Cγ1 (68).

D'autre part, les niveaux d'IP<sub>3</sub> (Inositol trisphosphate) et de DAG (Diacylglycerol) augmentent dans les quelques secondes à quelques minutes suivant l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire des kératinocytes (*Calcium switch*), témoignant de l'activation d'une voie de transduction liée à la **Phospholipase C (PLCβ)** conduisant ensuite à une augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique (69). L'IP<sub>3</sub>, en se fixant sur son récepteur réticulaire, active la vidange des stocks réticulaires en Ca<sup>2+</sup> qui serait responsable du pic initial de l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Cette élévation du Ca<sup>2+</sup> va également activer la PLCγ1 qui prolonge la synthèse d'IP<sub>3</sub> et participe à l'activation de protéines transmembranaires responsables d'influx calciques, telles que les canaux calciques (70). Ceux-ci pourraient ainsi être à l'origine du plateau lors de l'augmentation du Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol.

Plusieurs **canaux calciques** ont été identifiés dans les kératinocytes. Ces différents canaux ont été proposés comme porteurs de l'influx de Ca<sup>2+</sup> activé par le *calcium switch* (71, 72). Parmi ces canaux, il a récemment été rapporté l'expression de canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential) dont l'activité serait liée à la production d'IP<sub>3</sub> et à la vidange des stocks calciques réticulaires (73). De plus, il a aussi été montré que le CaR, les IP<sub>3</sub>-R, les pompes calciques ATP2C1 situées à la surface de l'appareil de Golgi, ainsi que les Phospholipases PLCγ1 étaient situés dans un même complexe protéique suggérant leur action coordonnée pour réguler à la fois la vidange des stocks calciques et les influx calciques par les canaux ioniques membranaires (68).

De nombreux travaux ont mis en évidence l'implication de différentes protéines liées à l'homéostasie calcique dans la différenciation des kératinocytes humains, suggérant une cascade de mécanismes complexes en réponse au Ca<sup>2+</sup>.

## II.C.2. Régulation par la vitamine D3

Il est connu de longue date que la **vitamine D3** (VD3) est un puissant inducteur de la différenciation des kératinocytes (74). La stimulation des kératinocytes par la VD3 conduit notamment à la synthèse de l'involucrine et de la transglutaminase participant à la formation de la couche cornée (75).

De plus, les animaux possédant des mutations conduisant à des modifications du métabolisme de la VD3, présentent des altérations importantes de la structure de l'épiderme ainsi que de l'expression des marqueurs de différenciation (75, 76). Ces observations prouvent le caractère fondamental de la VD3 dans la physiopathologie cutanée.

### Synthèse de la VD3 :

Au niveau de la peau, un dérivé du cholestérol, le 7-déhydrocholestérol est transformé en cholécalciférol (ou provitamine D3) sous l'action des rayons UV dans la couche épineuse de l'épiderme. Ce précurseur de la VD3 est hydroxylé au niveau hépatique en 25-hydroxycholécalciférol sous l'action de la 25-hydroxylase, puis au niveau rénal où il est changé en 1,25-dihydroxycholécalciférol ( $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ , Vitamine D3 ou calcitriol) sous l'action de la  $1\alpha$ -hydroxylase ( $1\alpha\text{OHase}$ ). Cette enzyme est également présente au niveau de l'épiderme et permet une synthèse locale de VD3 qui, chez l'adulte, influence peu la concentration circulante mais constitue une source locale importante pour les kératinocytes. La VD3 est donc vraisemblablement un facteur autocrine et/ou paracrine pour la différenciation des kératinocytes (77). De plus, la synthèse de la VD3 ainsi que de son récepteur (Vitamin D3 Receptor – **VDR**) varie au cours de la différenciation des kératinocytes d'une façon qui laisse supposer l'intervention d'un rétrocontrôle négatif (57, 78).

Le VDR est un élément fondamental de l'action génique de la VD3. En effet, une fois couplée à son récepteur, la VD3 va pouvoir modifier la transcription des gènes. La présence d'un VDRE (*VD3 responding element* : élément de réponse à la VD3) dans le promoteur de gènes codant pour des protéines cruciales dans le processus de différenciation tels que celui de l'involucrine est à l'origine de cet effet génique (75).

Les connaissances sur le rôle de la VD3 et de son récepteur ont été accrues suite à la création de souris portant une mutation du gène du VDR ou de l'enzyme responsable de la synthèse de la VD3 (79, 80). Les souris KO pour le VDR sont caractérisées par une alopecie, tout comme

les patients atteints d'une mutation de ce gène (81). Ces souris présentent également un défaut de différenciation épidermique illustrée par la diminution de l'expression des marqueurs tels que l'involucrine, la profilaggrine et la loricrine. Notons néanmoins que d'après Bikle et coll., ces altérations de l'expression des marqueurs de différenciation peuvent être compensées par un régime riche en  $\text{Ca}^{2+}$  alors que l'alopécie n'est pas modifiée. Les souris KO pour le gène  $1\alpha\text{OHase}$  présentent un phénotype différent. Elles présentent une diminution de l'expression des marqueurs de différenciation, mais celle-ci ne peut pas être compensée par un régime riche en  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Interactions de la VD3 avec le $\text{Ca}^{2+}$**

La VD3 est un élément important dans la régulation de la différenciation des kératinocytes, cependant, la VD3 est plus souvent qualifiée de **cofacteur de la différenciation** des cellules épidermiques car, en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire, elle induit une différenciation incomplète des cellules.

En effet, la VD3 augmente l'expression du CaR, rendant ainsi les kératinocytes plus sensibles à l'effet pro-différenciateur du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (82). De plus, le  $\text{Ca}^{2+}$  et la VD3 nécessitent tous deux l'activité de la  $\text{PLC}\gamma 1$ , comme le suggère l'inhibition de la différenciation induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  et la VD3 par les oligonucléotides antisens contre l'ARNm de la  $\text{PLC}\gamma 1$  (83). Or la présence d'un VDRE dans le promoteur du gène de la  $\text{PLC}\gamma 1$  a été démontrée alors que la présence d'un hypothétique CaRE (*Ca<sup>2+</sup> responding element* : élément de réponse au  $\text{Ca}^{2+}$ ) n'a pas été rapportée. Concernant la synergie du  $\text{Ca}^{2+}$  et de la VD3 dans l'induction de la différenciation, une des explications vient de la proximité spatiale des VDRE et des CaRE dans le promoteur de gènes de marqueurs de différenciation tels que l'involucrine (75). Les travaux de Ng et coll., ont néanmoins démontré que des mutations du site AP-1 dans le CaRE du gène de l'IVL bloquent l'induction de l'expression de ce marqueur de différenciation par le  $\text{Ca}^{2+}$  et la VD3 alors qu'une mutation du VDRE ne bloque que l'induction de l'expression de ce gène par la VD3 (58, 75). Il faut ajouter à ces résultats, la régulation calcique de la fixation de co-activateurs du VDR. L'ensemble de ces données confère à la **VD3 un rôle de cofacteur de la différenciation** des kératinocytes et au  $\text{Ca}^{2+}$ , un rôle majeur dans l'induction de ce mécanisme.

Des travaux ont également démontré que l'application de VD3 induisait une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique associée à une augmentation des niveaux d' $\text{IP}_3$  et de DAG ainsi qu'une translocation de la protéine kinase C (PKC) à la membrane (82). D'autres travaux ont montré

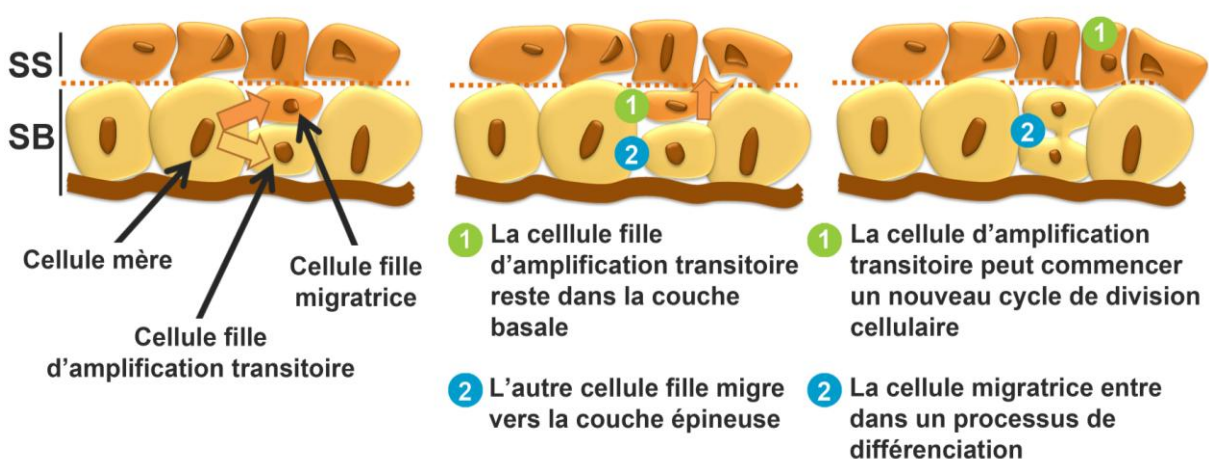
que l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induite par la VD3 été liée à la surexpression d'un canal calcique de la famille des TRP, **TRPV6** (84). De plus, l'inhibition de l'expression de ce canal calcique annule les effets de VD3 sur la synthèse des marqueurs de différenciation. Par conséquent, l'effet pro-différenciateur de la VD3 passerait par la stimulation de l'expression de **canaux calciques** membranaires, permettant ainsi l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique.

## II.D. Prolifération des kératinocytes

L'épiderme humain est en renouvellement permanent, le cycle complet pour obtenir un nouvel épiderme prend de 4 à 6 semaines. Sa principale fonction est de créer une couche de cellules cornées responsables de la protection de l'organisme contre l'environnement. Sachant que le nombre de kératinocytes dans l'épiderme est relativement constant, ce processus va nécessiter la création de nouvelles cellules pour palier au phénomène de desquamation.

### II.D.1. La division asymétrique des kératinocytes

## LA DIVISION ASYMETRIQUE DES KERATINOCYTES



**Figure 7** : Schéma représentant les différentes étapes de la division asymétrique d'une cellule épidermique humaine de la couche basale.

L'activité mitotique des cellules de la **couche basale** est donc très importante : environ 17% des cellules sont en division. Les cellules souches épidermiques représentent 2 à 7% des kératinocytes de la couche basale, elles sont caractérisées par un gros noyau en rapport au cytoplasme, et une activité mitotique lente mais illimitée. **La division de ces cellules est dite asymétrique** ([Figure 7](#)). Lors de la division cellulaire asymétrique, une cellule mère va donner deux cellules filles, l'une reste dans la couche germinative et continue de se diviser, on l'appelle : cellule d'amplification transitoire, alors que l'autre va migrer vers les couches supérieures de l'épiderme et entrer dans un processus de différenciation terminale. Les cellules d'amplification transitoire ont une capacité mitotique plus rapide que les cellules souches mais limitée (85, 86).

## II.D.2. Régulation par les facteurs de croissance

**La prolifération** des kératinocytes est un processus constant et régulier qui doit être contrôlé et maintenu à un certain niveau d'équilibre pour pallier la perte des cellules par desquamation, mais aussi pour prévenir une entrée en phase hyperproliférative, cause de l'apparition de cancers, de psoriasis et d'autres pathologies (87). Ainsi, la prolifération des cellules germinatives de l'épiderme est stimulée par plusieurs facteurs incluant des facteurs de croissance, des cytokines et des chemokines, pouvant être apportés par la circulation sanguine mais aussi synthétisés par les kératinocytes eux-mêmes, agissant de manière paracrine et/ou autocrine.

Parmi les facteurs de croissance stimulant la prolifération des kératinocytes, on retrouve la famille des **facteurs de croissance épidermique** (EGF : epidermal growth factor), dont font partie le facteur de croissance transformant  $\alpha$  (TGF- $\alpha$  : transforming growth factor), le facteur de croissance de type EGF fixant l'héparine (HB-EGF : heparin-binding EGF-like growth factor), l'amphireguline, la betaculluline, et les neureguline NRG-1 à 4 (88, 89). Ces facteurs de croissance activent une cascade de signaux intracellulaire en se fixant à leurs récepteurs de la famille ErbB. Il en existe 4 types différents : ErbB1, plus connu comme l'EGFR (EGF-recepteur), ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Seul ErbB4 n'est pas exprimé dans les cellules de l'épiderme.

On retrouve également la famille des **facteurs de croissance des fibroblastes** (FGF : fibroblast growth factor) composée de 20 membres. Par exemple, FGF2 intervient dans la



migration des kératinocytes par la voie *rac*, tandis que FGF7 (aussi appelé KGF : keratinocytes growth factor) présente un pouvoir mitogène important (88, 89).

Les **facteurs de croissance des nerfs** (NGF : nerve growth factor) : NGF, Neurotrophine-3 et 4 (NT-3 et NT-4), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF : brain-derived neurotrophic factor) sont synthétisés par les kératinocytes et agissent de manière autocrine en se fixant sur leurs récepteurs correspondant (88, 89).

Enfin, la famille des **facteurs de croissance type-insuline** (IGF : insulin-like growth factor), les **facteurs de croissance des hépatocytes** (HGF : hepatocytes growth factor), les **facteurs stimulants des colonies granulocyte-macrophage** (GM-CSF : granulocyte-macrophage stimulating factor), et l'**endothéline-1** sont aussi d'important facteurs mitogènes pour les kératinocytes basaux.

### II.D.3. Régulation par le calcium

La prolifération des kératinocytes a lieu au niveau de la couche basale de l'épiderme où la concentration externe en  $\text{Ca}^{2+}$  est relativement faible. Le maintien d'une faible concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est primordiale pour garder une prolifération continue des kératinocytes car une augmentation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire induit leur différenciation.

Aussi, l'action de certains agents pro-prolifératifs est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et extracellulaire.

La prolifération des kératinocytes peut être induite par la fixation de l'**ATP** (Adenosine TriPhosphate) sur des récepteurs membranaires purinergiques P2. En effet, la stimulation des cellules de la lignée cellulaire HaCaT par l'ATP induit une augmentation biphasique de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (90). L'action de l'ATP sur la prolifération passe par l'activation de la voie intracellulaire de la PLC qui est à l'origine de la synthèse d'**IP<sub>3</sub>** et de **DAG** (64). L'**IP<sub>3</sub>** induit la vidange des stocks réticulaires en  $\text{Ca}^{2+}$  correspondant à la première phase d'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, tandis que le DAG est à l'origine d'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  plus soutenue dans le temps via l'activation directe de canaux ioniques membranaires. Des travaux effectués sur la lignée HaCaT ont montré l'implication du canal TRPC7 dans cette voie (91), néanmoins, cela n'est pas encore vérifié sur les cellules primaires. Par ailleurs, la vidange des stocks réticulaires en  $\text{Ca}^{2+}$  induite par l'**IP<sub>3</sub>** active un influx calcique appelé SOCE (Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) (92). La prolifération des kératinocytes induite par l'ATP extracellulaire implique donc des variations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol mettant en jeu la participation de canaux calciques

membranaires. Toutefois, l'identification de la nature moléculaire des canaux calciques reliant l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  et l'induction de la prolifération des kératinocytes humains reste encore à être déterminée.

D'autres travaux ont montré que la **calmoduline** été exprimées de façon importante dans l'épiderme humain (93) et qu'elle intervenait dans la prolifération des kératinocytes de la couche basale. Le psoriasis est une pathologie dermatologique caractérisée par l'hyperprolifération des kératinocytes, il a été noté que l'activité de la calmoduline était augmentée aussi bien dans les cellules épidermiques issues des plaques de psoriasis que celle issues de régions non atteintes (94). Dans la cellule, la calmoduline est une protéine possédant 4 domaines « EF-hand » permettant de fixer le  $\text{Ca}^{2+}$ , suite à son activation par des variations de la concentration calcique cytosolique, elle induit l'activation de plusieurs kinases intracellulaires, comme les MAP kinases (Mitogen-Activated Protein Kinase) (95), connues pour leur rôle dans l'induction de la prolifération des kératinocytes humains. Cependant, les acteurs protéiques impliqués dans les échanges de  $\text{Ca}^{2+}$  intervenants en amont de l'activation de la calmoduline n'ont pas encore été identifiés.

#### **II.D.4. Facteurs inhibant la prolifération**

**La prolifération** des kératinocytes est également régulée négativement. La prolifération des kératinocytes peut être inhibée par le **TGF- $\beta$** , la **vitamine D3**, l'**interferon- $\gamma$**  (89).

**La famille des TGF- $\beta$**  comprend de nombreux membres. En particulier, TGF- $\beta$ 1 inhibe la prolifération des kératinocytes par une rapide répression de l'expression du facteur de transcription c-myc.

La **vitamine D3** (1  $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) agit en se fixant sur son récepteur nucléaire VDR pour inhiber la prolifération et activer la différenciation des kératinocytes.

**L'interferon- $\gamma$**  est un polypeptide de 14 kDa sécrété par les lymphocytes T actifs. Il est connu pour intervenir dans de nombreux processus cellulaires, et en plus de sa fonction immunitaire il inhibe la prolifération des kératinocytes.

En règle générale, il est admis que l'induction de la différenciation des kératinocytes provoque l'arrêt de leur prolifération. Donc, tout facteur stimulant la différenciation des kératinocytes peut être classé comme inhibiteur de la prolifération. Ainsi, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire va inhiber la prolifération des kératinocytes. La perte de l'attachement des kératinocytes à la lame basale, induite par la diminution d'expression des

**intégrines**, provoque l'entrée des cellules dans un processus de différenciation, et par conséquent l'arrêt rapide de leur prolifération (96, 97).

## II.E. Migration des kératinocytes

Du fait du renouvellement permanent de l'épiderme, les kératinocytes sont soumis à un mouvement vertical de l'assise basale vers la couche cornée. En effet, lors de la division asymétrique d'une cellule germinative, une des cellules filles reste ancrée à la lame basilaire et continue de proliférer, tandis que l'autre entre dans une phase de migration et de différenciation. Comme il est noté précédemment, l'attachement des cellules germinatives à la lame basale est en grande partie dépendant de l'expression d'intégrines spécifiques ( $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ) (10, 11). Il a été suggéré que lors d'une division asymétrique, la cellule mère engendrait une cellule fille riche en intégrines  $\alpha 6\beta 4$ , et une autre cellule qui en exprime moins, cette dernière pouvant alors se détacher de la lame basale et migrer verticalement puis se différencier (97).

La migration des kératinocytes est un processus important pour le développement normal de l'épiderme et la formation de la couche cornée protectrice. Ce mécanisme est d'autant plus important lors d'une blessure cutanée, et participe fortement à la cicatrisation.

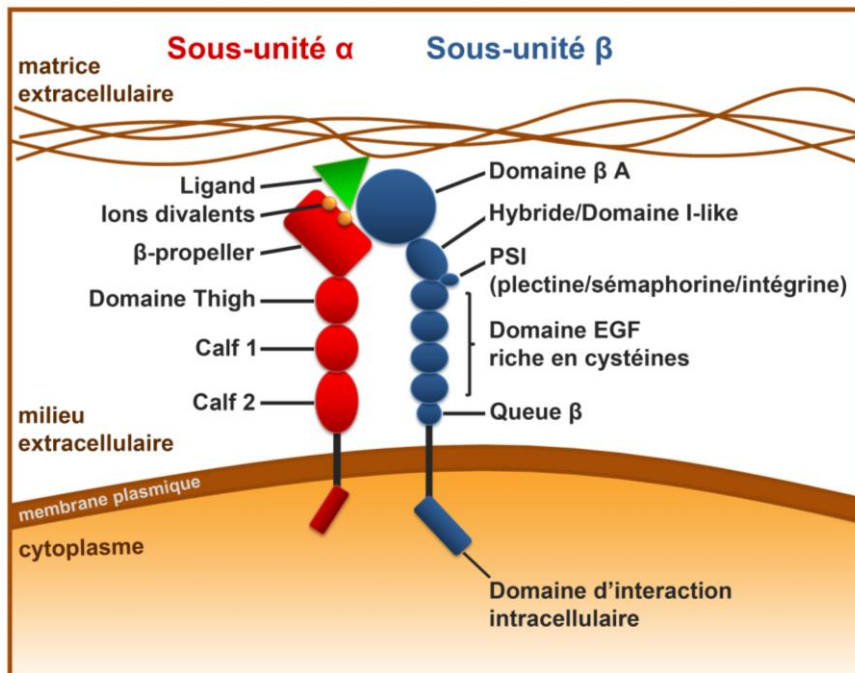
**La migration** des kératinocytes est un processus complexe contrôlé par l'interaction des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) avec des protéines transmembranaires : les intégrines, qui, par l'intermédiaire de nombreuses molécules intracellulaires, module l'organisation du cytosquelette au niveau de ce qu'on appelle les adhésions focales (98).

### II.E.1. Les intégrines

**Les intégrines** sont des récepteurs transmembranaires présents sous la forme d'hétérodimères composés de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  ([figure 8](#)). L'interaction des deux sous-unités permet la fixation de ligands, participants de ce fait à de nombreuses fonctions cellulaires comme l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. La spécificité du ligand est déterminée par sa composition hétérodimérique, tandis que la force

de leur fixation est régulée par des ions divalents (comme le  $\text{Ca}^{2+}$ ), le regroupement des récepteurs en « cluster » et la fixation des protéines partenaires des intégrines (99).

## STRUCTURE DES INTEGRINES



**Figure 8 :**

Représentation de la composition générale des 2 sous-unités des intégrines. Le ligand se lie à une région comprise entre le  $\beta$ -propeller de la sous-unité  $\alpha$  et le domaine  $\beta A$  de la sous-unité  $\beta$ . (adapté d'après Askari et al., 2009)

**Les intégrines** les plus abondantes et constitutivement exprimées dans les kératinocytes sont les  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  et  $\alpha 6\beta 4$ . On retrouve également les  $\alpha \nu\beta 5$  exprimées plus faiblement, tandis que les  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha \nu\beta 6$  sont exprimées en culture et pendant la cicatrisation. Ces intégrines sont exclusivement exprimées dans les cellules de la couche basale de l'épiderme. L'intégrine  $\alpha 6\beta 4$  est localisée dans la zone d'attachement à la lame basale et est un composant majeur des hémidesmosomes. Les autres intégrines sont distribuées dans les régions basales, latérales et apicales des cellules germinatives. On retrouve particulièrement les intégrines  $\beta 1$  au niveau des adhésions focales, autour de la cellule et formant une sorte « d'anneau » (99).

Il a été montré que la diminution de l'expression des intégrines dans les kératinocytes provoque leur détachement de la lame basale et leur différenciation dans un processus de

migration verticale. D'autres études ont montré que la délétion ciblée des gènes codant pour les intégrines hémidesmosomales  $\alpha 6\beta 4$  induit un détachement de l'épiderme du derme, l'apparition de cloques et une altération de la survie cellulaire (100, 101). Par ailleurs, la délétion des sous-unités  $\alpha 3$  et  $\beta 6$  induit, respectivement, l'apparition de micro-ampoules et une altération de la cicatrisation, tandis que l'absence d'expression de  $\beta 1$  cause des défauts de l'attachement de l'épiderme au derme, de l'organisation et de l'assemblage de la lame basale et de la cicatrisation (99, 102-104).

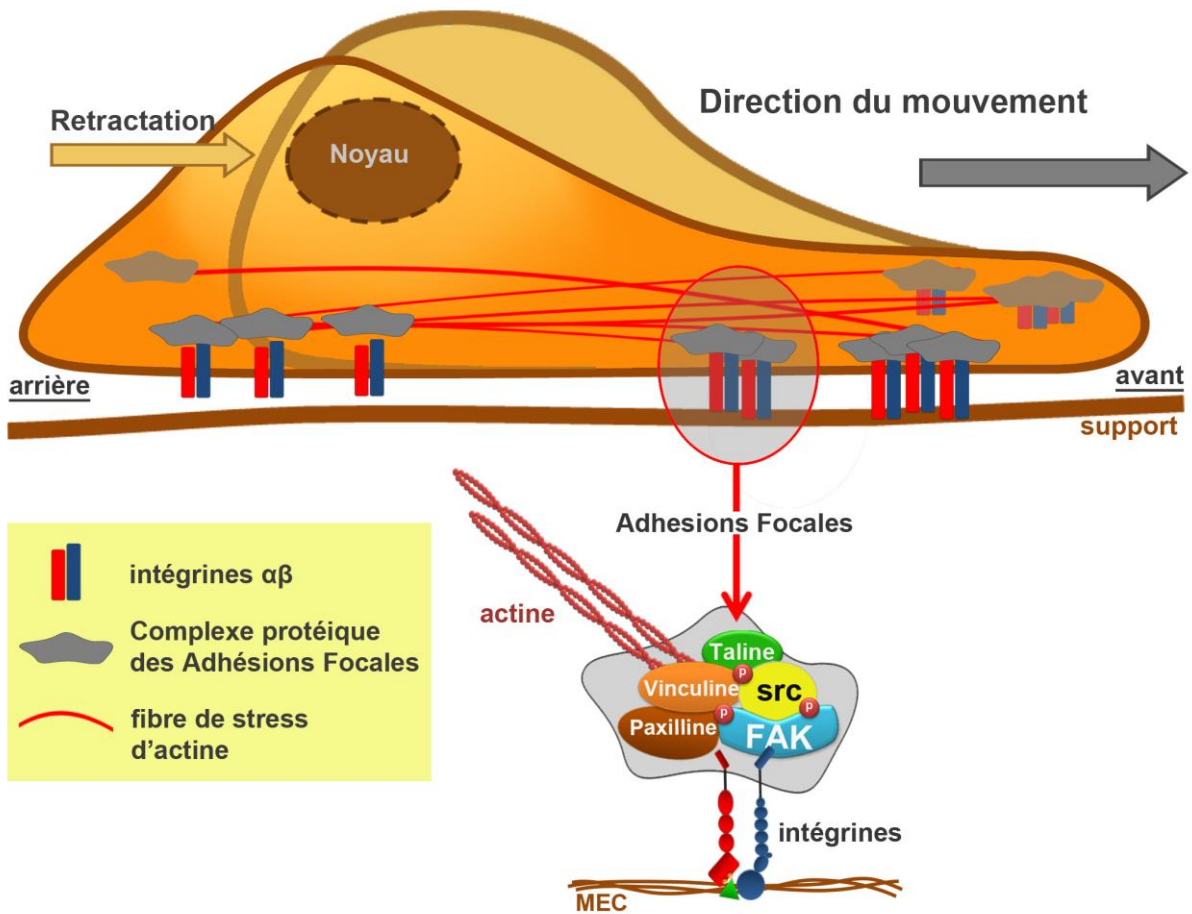
**Les intégrines** exprimées dans les kératinocytes ont plus ou moins d'affinité pour lier l'une ou l'autre des protéines composant la MEC : le collagène, la fibronectine, la vitronectine ou encore les laminines. Les intégrines, ne possédant pas d'activité enzymatique, dépendent de seconds messagers comme la protéine kinase d'adhésion focale (**FAK : focal adhesion kinase**) pour agir sur la réorganisation des filaments d'actine et des microtubules du cytosquelette. En effet, l'activation des intégrines  $\beta 1$  par la MEC active FAK, qui interagit réciproquement avec son domaine cytoplasmique ainsi qu'avec une variété d'autres molécules de la signalisation des **adhésions focales (FA : focal adhesion)** (98). D'autre part, des cellules dont l'expression des intégrines  $\beta 1$  est altérée montrent une diminution significative de l'activité enzymatique de FAK.

## II.E.2. Les adhésions focales (FA)

**Les adhésions focales** sont des complexes de protéines connectant la MEC au cytosquelette des kératinocytes. C'est ainsi que les protéines de la MEC, en se fixant aux intégrines membranaires, agissent sur la réorganisation du cytosquelette et donc sur l'adhésion intercellulaire et la migration des cellules. Les adhésions focales, avec les hémidesmosomes, participent à l'ancrage des cellules basales d'épiderme à la lame basale.

**Les FAs** sont principalement composées d'intégrines  $\beta 1$ , en liaison avec la MEC et le milieu intracellulaire, de la FAK, représentant l'intermédiaire entre les intégrines et le reste des protéines du complexe, telles que la **Src** (prononcé « sarc » : diminutif pour sarcome), la vinculine, la taline, la paxilline, la zyxine ou la tensine qui vont fixer les filaments d'actine et les microtubules (105) ([figure 9](#)).

## COMPLEXE D'ADHESION FOCALE

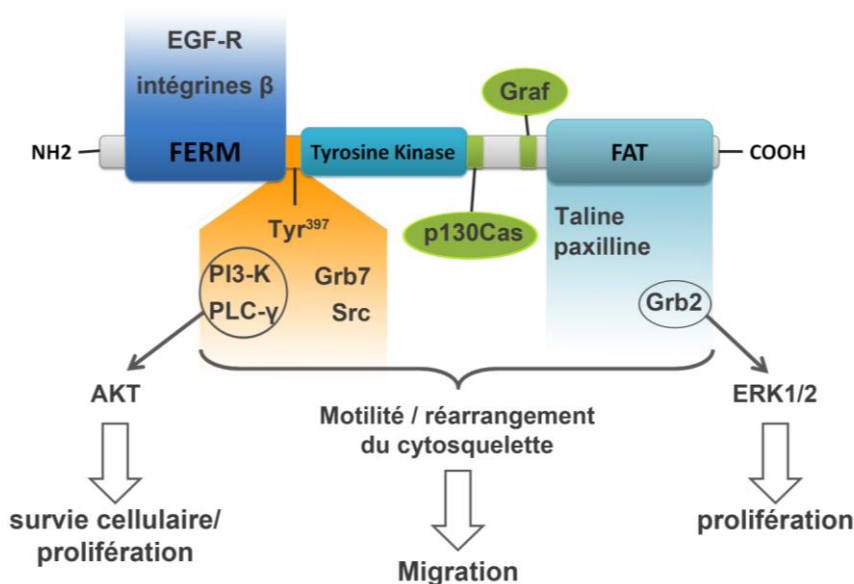


**Figure 9 :** Représentation du rôle des adhésions focales dans la motilité polarisée des kératinocytes. Des points d'ancrage à la MEC sont formés à une extrémité de la cellule pendant que le désassemblage du complexe protéique orchestré par FAK, à l'autre extrémité, permet le détachement de la cellule de son support. Les filaments d'actine vont alors se contracter pour ramener l'arrière de la cellule et permettre ainsi d'avoir un mouvement unidirectionnel. L'agrandissement d'un complexe d'adhésion focale montre l'assemblage des intégrines à l'actine, par l'intermédiaire de l'association de plusieurs protéines kinases entre elles.

Les kératinocytes sont caractérisés par une **migration polarisée**, c'est-à-dire qu'ils vont avoir un mouvement unidirectionnel. Ceci est la conséquence de la régulation de la dynamique de l'assemblage et du désassemblage des complexes d'adhésion focale. A l'avant de la cellule

(dans le sens du déplacement), des adhésions focales se forment par l'interaction des intégrines avec la matrice extracellulaire (ou le support) et le recrutement consécutif de protéines kinases FAK et de ses protéines partenaires, établissant une connexion avec le cytosquelette et notamment les filaments d'actine (105). Cette première phase d'assemblage des adhésions focales confère à la cellule des points d'ancrage solide, créant une tension des filaments d'actine. A l'arrière de la cellule, le désassemblage des adhésions focales, est attribué à des protéases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  appelées **Calpaïne** (106, 107). Ces protéases peuvent cliver la FAK et ainsi induire le désassemblage des adhésions focales ayant pour conséquence la rupture des points d'ancrage de la cellule à la MEC. La tension exercée sur les filaments d'actine va alors induire la rétraction de l'arrière de la cellule, permettant la création de nouveaux points d'ancrage et le déplacement de la cellule (désassemblage des adhésions focales à l'avant). C'est pourquoi les adhésions focales sont des structures importantes dans la migration des kératinocytes.

## La protéine FAK



**Figure 10 :**

Structure de la protéine kinase FAK et représentation des sites d'interaction avec d'autres protéines illustrant l'implication de FAK dans la migration et la prolifération des kératinocytes. (adapté de Cornillon *et al.*, 2003)

**La FAK** est une protéine kinase clé dans la formation des complexes d'adhésion focale et dans la transmission du signal de la MEC au cytosquelette. C'est une protéine de 125 kDa

dont la séquence est divisée en quatre domaines distincts : un domaine FERM (F pour protéine 4.1, ezrine radixine moésine) dans la région N-terminale, un domaine catalytique tyrosine kinase en position centrale, un domaine FAT (focal adhesion-targeting) dans la région C-terminale et une région riche en proline entre les domaines catalytiques et la région FAT (108) ([figure 10](#)). Lorsque FAK n'est pas active la région N-terminale est repliée sur le domaine catalytique empêchant ainsi l'accès à sa boucle d'activation et son site d'autophosphorylation principale Y397. Au contraire, lorsque FAK est activée (par le domaine cytoplasmique des intégrines  $\beta$  ou par d'autres activateurs), le domaine FERM est déplacé, permettant l'autophosphorylation rapide de la tyrosine Y397 et l'exposition des sites de fixation pour les protéines **Src**, phosphorylant d'autres régions de FAK pour son activation complète. Le domaine FERM peut être activé par des signaux extracellulaires via l'EGFR (récepteur à l'EGF) et/ou les intégrines  $\beta$  pour induire la phosphorylation de FAK. La région FAT, quant à elle, va lier la taline et la paxilline pour agir sur les filaments d'actine. La FAK va également se fixer et activer plusieurs autres protéines. L'association de FAK avec Grb, Grb7 ou la p130Cas va être impliquée dans le remaniement du cytosquelette d'actine et donc la migration cellulaire. La phosphorylation des protéines Grb2, PLC- $\gamma$  et PI3-kinase va induire l'activation des voies de signalisation intracellulaire AKT et ERK 1/2 qui interviennent dans les processus de survie cellulaire, de prolifération et de migration (108-110).

### II.E.3. Le Calcium dans la migration

La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire est un facteur important lors de la migration des kératinocytes. En effet, une concentration faible de  $\text{Ca}^{2+}$ , en dessous de 1 mM, stimule la migration des kératinocytes. L'élévation de cette concentration aura pour effet l'arrêt de la migration et l'entrée dans un processus de différenciation.

D'autre part, le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire joue également un rôle important. L'**EGF** est un facteur de croissance stimulant de la migration des kératinocytes suivant différentes voies de signalisation. L'activation du récepteur membranaire à l'EGF induit, entre autres, le recrutement d'ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), de MAP kinases et de PLC $\beta$ . L'activation des voies ERK et MAPK contribue à au recrutement des **calpaïnes**. Ces calpaïnes sont des protéases sensibles aux concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol qui interviennent dans le clivage de FAK permettant ainsi le détachement des FA et la motilité des kératinocytes (106, 111). Cependant, les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de ces



calpaïnes par les voies ERK et MAPK restent à être identifiés. D'un autre côté, l'activation de la PLC $\beta$  par l'EGF permet la synthèse d'IP<sub>3</sub> qui conduit à l'augmentation de la concentration cytosolique en Ca<sup>2+</sup> induite par la vidange du RE et l'activation de canaux calciques membranaires. Par conséquent, le Ca<sup>2+</sup> peut activer les calpaïnes et participe ainsi à la migration des kératinocytes. Il existe également d'autres facteurs extracellulaires pouvant stimuler la migration par l'intermédiaire du Ca<sup>2+</sup>. L'**IP-9** (Interferon-inducible Protein 9) est une chémokine produite lors de lésions cutanées qui participe à la réépithélialisation de l'épiderme. L'action de cette chémokine sur la migration des kératinocytes passe également par l'activation d'une PLC $\beta$  permettant l'augmentation de la concentration en Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol et le clivage de FAK par des calpaïnes (*111*).

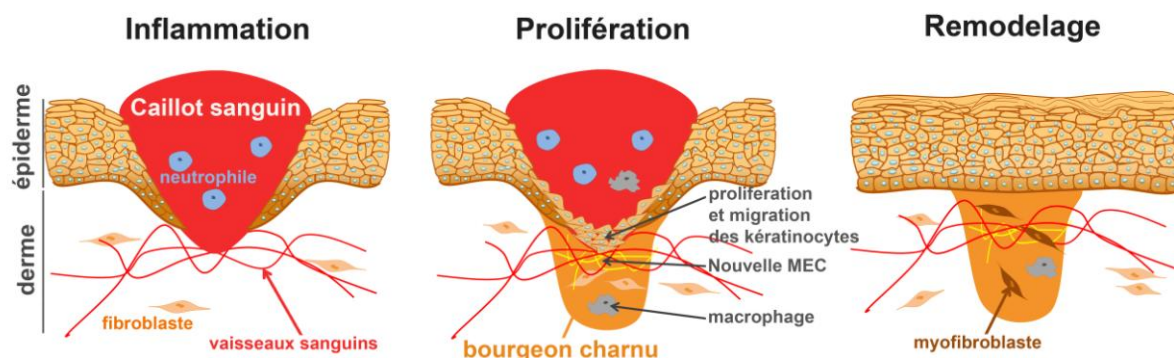
Cependant, que ce soit pour l'EGF ou l'IP-9, la nature moléculaire des acteurs responsables des flux calciques permettant l'activation des calpaïnes est encore méconnu.

## **II.F. La cicatrisation**

**La cicatrisation** du tissu cutané est un processus très complexe mettant en jeu la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes. Ce processus se déroule en 3 grandes étapes : la phase inflammatoire, la phase de prolifération et la phase de remodelage (*112, 113*) ([figure 11](#)).

Durant ces 3 étapes plusieurs mécanismes complexes vont intervenir comme la régénération des cellules épithéliales, la migration des fibroblastes et des cellules épithéliales, l'angiogénèse, la synthèse des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène), et le remodelage du tissu cicatriciel. Ces phénomènes sont régulés par les facteurs de croissance et par les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules inflammatoires.

# LA CICATRISATION DE L'ÉPIDERME



**Figure 11** : Représentation schématique des étapes de la cicatrisation de l'épiderme, faisant intervenir une batterie d'éléments apportés par la circulation sanguine et le derme sous-jacent, participant à l'induction de la prolifération et à la migration des kératinocytes.

**La phase inflammatoire** : la première étape de la cicatrisation, 12 à 24 heures après la blessure, est la coagulation sanguine qui permet d'arrêter l'hémorragie. Il en résulte la formation d'un caillot constitué de plaquettes, de cytokines, de facteurs de croissance, de la fibrine, et de la fibronectine. Les cellules de la **réaction immunitaire** (neutrophiles) apportées par la circulation sanguine vont avoir pour rôle de nettoyer la plaie (113, 114). Elles vont aussi libérer d'autres cytokines et des facteurs de croissance afin d'amplifier la réponse inflammatoire et de stimuler la prolifération et la migration des fibroblastes et des kératinocytes.

**La phase de prolifération** : la réépithélialisation de la plaie s'effectue entre 3 et 7 jours après la blessure grâce à la synthèse, par les fibroblastes, d'une nouvelle matrice extracellulaire (fibrine, fibronectine, collagène, protéoglycanes) responsable de la **migration** et la **prolifération** des cellules épidermiques des bords de la blessure (112, 113). On assiste alors à la formation d'un « **bourgeon charnu** » dans le tissu conjonctif qui va s'enrichir en vaisseaux sanguins. Les kératinocytes, eux, vont migrer au niveau de la plaie et proliférer afin de recouvrir cette dernière.

**La phase de remodelage** : La prolifération des fibroblastes et des kératinocytes est bloquée dès que la lésion est totalement comblée par le bourgeon charnu. Celui-ci se transforme alors en un tissu fibreux dense cicatriciel qui se rétracte en raison de **l'action contractile de myofibroblastes**. Ces cellules contractent les faisceaux de microfilaments reliés à la matrice extracellulaire, provoquant une augmentation de la densité du réseau de collagène et la contraction de la plaie (113).

Les cellules de ce nouvel épiderme vont alors se différencier pour former, de nouveau, une barrière cutanée solide.

Le **calcium** est un facteur important de la cicatrisation de l'épiderme. On observe notamment une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire au niveau de la blessure durant les trois phases de la cicatrisation, une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les kératinocytes et les fibroblastes du derme ainsi qu'une redistribution du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (115).

### III. Le Calcium

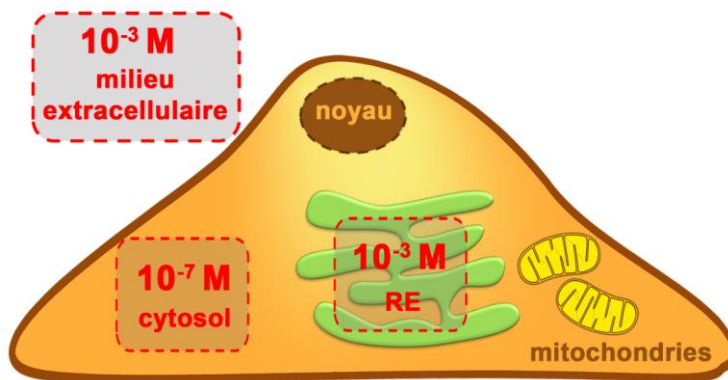
**Le calcium** est un élément indispensable pour l'Homme. Il représente environ 2% du poids total du corps humain, ce qui en fait le minéral le plus répandu au sein de l'organisme. Il est retrouvé en plus faible quantité chez la femme que chez l'homme. Le corps d'un adulte contient environ 1,2 kg de calcium, dont 98 à 99% se trouvent dans les os. L'os sert de réserve de calcium. Cette réserve permet un maintien constant de la concentration plasmatique en calcium ionisé, qui est nécessaire à de nombreuses fonctions physiologiques vitales. Le calcium intervient, aussi bien chez les animaux que les végétaux, pour transmettre des informations perçues au niveau de la membrane de la cellule vers des cibles intracellulaires.

Il intervient dans toutes les étapes de la vie : lors de la reprise de la méiose, à la fécondation et au cours de différents processus du développement embryonnaire et contrôle dans les cellules différenciées de nombreuses fonctions physiologiques telles que la contraction musculaire, la sécrétion, la mémoire, l'apprentissage....

### III.A. Distribution du calcium dans la cellule

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est retrouvé dans tous les organites intracellulaires à des concentrations plus ou moins importantes. Au niveau extracellulaire, la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) est de l'ordre de 1 à 2 mM, ainsi que dans le réticulum endoplasmique, mais oscille entre 100 nM et 1  $\mu\text{M}$  dans le cytosol. Il existe donc entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule un gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  de 1/10000 ([figure 12](#)).

## DISTRIBUTION DU CALCIUM DANS LA CELLULE



**Figure 12 :**

Représentation de la distribution de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les compartiments principaux de la cellule.

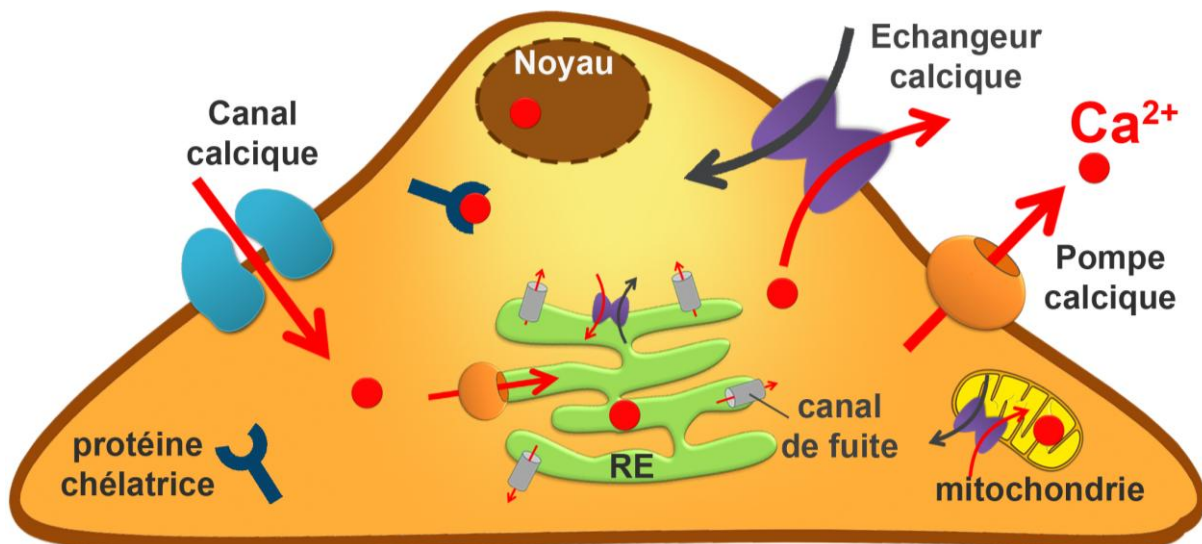
Pour maintenir ce gradient, les cellules utilisent des pompes calciques et des échangeurs, au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des organites (ex : RE et mitochondries). Ceci confère aux organites intracellulaires un rôle majeur de tampon calcique dans la cellule. Toutefois, la répartition du  $\text{Ca}^{2+}$  n'est pas homogène, on distingue le  $\text{Ca}^{2+}$  sous une forme dite libre et sous une forme chélatée par des protéines. Cette dernière correspond à un état d'interaction avec une protéine qui empêche le  $\text{Ca}^{2+}$  d'interagir avec d'autres acteurs sensibles à ce cation. Ces protéines chélatrices sont présentes aussi bien dans les organites tels que le RE (ex : la calréticuline, la calbindine) que dans le cytosol (ex : la calmoduline, la calcineurine) ([figure 13](#)). La compartimentation du  $\text{Ca}^{2+}$  et sa concentration cytosolique sont donc stables dans le temps, d'où le terme **d'homéostasie calcique**.

### III.B. La signature calcique

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est souvent considéré comme un second messager intracellulaire car de nombreuses protéines dans la cellule fixent et peuvent être régulées par le  $\text{Ca}^{2+}$  de façon réversible. On le retrouve ainsi impliqué dans beaucoup de voies de signalisation participant à de grandes fonctions biologiques telles que la contraction musculaire ou la sécrétion des neurotransmetteurs. (116, 117)

L'action du  $\text{Ca}^{2+}$  sur ces fonctions cellulaires passe par des variations de sa concentration dans le cytosol ou dans d'autres compartiments de la cellule. Toutefois, la cellule doit pouvoir discriminer quelles sont les voies de signalisation ciblées par ces modifications de  $\text{Ca}^{2+}$ . Pour cela, les différents signaux calciques assignés à une fonction cellulaire sont regroupés sous le terme de « **signature calcique** » (118). Cette signature calcique est codée sous la forme de 3 paramètres fondamentaux caractérisant les variations de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , l'**espace** (localisation), le **temps** (durée) et l'**intensité** (amplitude).

## LES ACTEURS DE LA SIGNALISATION CALCIQUE



**Figure 13** : Schéma représentant les différents acteurs participant à la signalisation calcique et au maintien des gradients de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule.

**L'espace** : Tout d'abord, il existe deux sources principales de  $\text{Ca}^{2+}$  intervenant dans ces signaux calciques. On distingue le  $\text{Ca}^{2+}$  apporté par le milieu extracellulaire, et le  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans les organites intracellulaires représentés principalement par le réticulum endoplasmique. Une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule du milieu extracellulaire mettra en jeu l'activation de protéines canal au niveau de la membrane plasmique tandis qu'une sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE vers le cytosol impliquera des récepteurs réticulaires comme le récepteur à l' $\text{IP}_3$  ou le récepteur à la ryanodine. La vidange des stocks réticulaires en  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la fixation de l' $\text{IP}_3$ , ou de la ryanodine, sur leur récepteur peut activer une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule par des canaux membranaires, ce mécanisme est appelé l'**Entrée Capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  (ECC)** ou **Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry (SOCE)** (119). Cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  a pour but de reconstituer les stocks calciques réticulaires. La notion d'espace met également en jeu l'étendu du signal dans la cellule qui définit directement la spécificité des mécanismes induits. Les événements confinés à de petites régions pré-membranaires, interviennent dans des processus fins comme la sécrétion de neurotransmetteurs par les neurones. Les événements de plus grande amplitude spatiale tels que les vagues calciques intracellulaires, correspondent à de plus grandes variations de  $\text{Ca}^{2+}$  et à l'activation de protéines réparties dans toute la cellule. De tels signaux régulent de grandes fonctions cellulaires telles que la sécrétion dans les cellules épithéliales polarisées (120) ou la contraction des cardiomyocytes.

**Le temps** : Les signaux calciques sont également codés en fonction de la durée de l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Le signal peut durer de quelques microsecondes à plusieurs heures, peut être transitoire ou peut présenter des variations de concentration oscillatoires. Ces signaux, caractérisés par leur durée et leur fréquence, participeront à des fonctions biologiques spécifiques. Il est généralement admis que des signaux calciques transitoires modulent des fonctions telles que la sécrétion ou la prolifération (121), tandis qu'une augmentation soutenue de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique ou mitochondriale déclenche l'apoptose des cellules ou leur différenciation dans le cas des kératinocytes (63). Une diminution de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans un compartiment code également un signal. Ainsi, l'apoptose des cellules peut également être provoquée par une diminution du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la lumière du réticulum endoplasmique (122).

**L'intensité** : Les signaux calciques sont également codés en fonction de l'amplitude des variations de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, les protéines cibles de ces signaux calciques

possèdent des affinités spécifiques pour le  $\text{Ca}^{2+}$ , il existe donc une notion de seuil d'activation. Suivant les mécanismes ciblés, une concentration trop faible de  $\text{Ca}^{2+}$  n'aura pas d'effet, tandis qu'à partir d'une quantité suffisante d'ion calcium, l'induction de la fonction aura lieu. Néanmoins, une concentration trop importante de  $\text{Ca}^{2+}$  impliquera une activation beaucoup moins spécifique des protéines cibles. Par conséquent, chaque fonction biologique possède une fenêtre d'activation spécifique de concentration calcique.

### III.C. Les acteurs de la signalisation calcique

#### III.C.1. les protéines chélatrices

Les protéines chélatrices sont des protéines cytosoliques ou membranaires, présentes dans le cytoplasme et dans les organites. Elles regroupent l'ensemble des protéines pouvant interagir directement avec le  $\text{Ca}^{2+}$  telles que la Calmoduline, régulant ainsi son interaction avec les protéines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ .

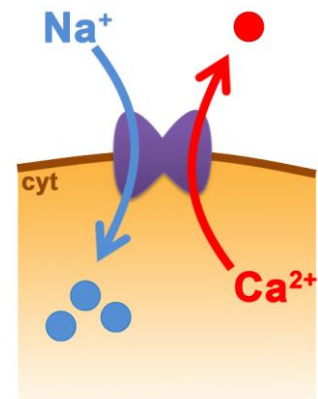
#### III.C.2. les pompes calciques

Dans la cellule, la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  varie entre les différents compartiments. Les échanges de  $\text{Ca}^{2+}$  entre le cytosol et les organites intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique, permettent un maintien des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique, et donc d'un gradient entre le milieu extracellulaire et le cytosol. Les pompes calciques ont pour rôle de transporter le  $\text{Ca}^{2+}$  contre son gradient de concentration. C'est un transport actif qui va consommer de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP, on les appelle alors des **Calcium ATPases**.

Il existe principalement deux formes d'ATPases dans la cellule, une forme localisée dans la membrane plasmique : **PMCA** (Plasma Membrane Calcium ATPase), et l'autre située dans la membrane du réticulum endoplasmique : **SERCA** (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase). La pompe PMCA a pour rôle d'extruder le  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule tandis que la pompe SERCA va séquestrer le  $\text{Ca}^{2+}$  à l'intérieure du RE. (123) ([figure 13](#))

### III.C.3. l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Comme pour les pompes calciques PMCA, l'échangeur Sodium/Calcium se trouve au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des organites intracellulaires, et permet un transport actif de  $\text{Ca}^{2+}$  contre son gradient de concentration. C'est un transport qui ne consomme pas d'ATP. La direction des mouvements ioniques est contrôlée par le gradient électrochimique du sodium, généralement, il y a sortie d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  pour l'entrée de 3 ions  $\text{Na}^+$ . (124)



### III.C.4. Les canaux calciques

Les canaux calciques sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface de la cellule et des organites intracellulaires. Lorsque ces canaux sont activés, ils assurent un transport passif du  $\text{Ca}^{2+}$  suivant son gradient de concentration. En règle générale, les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  se feront toujours vers le cytosol.

**La suite de cette thèse sera focalisée sur ce type de transporteurs.**

## IV. Les canaux calciques dans l'épiderme

Il est maintenant bien établi que le  $\text{Ca}^{2+}$  représente un acteur essentiel dans la plupart des processus physiologiques prenant place dans l'épiderme. Particulièrement, l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est impliquée dans un grand nombre de fonctions cellulaires selon sa localisation, sa fréquence et sa durée. Ces différents aspects du signal calcique sont en grande partie contrôlés par la présence de canaux calciques membranaires. La découverte d'une nouvelle famille de canaux ioniques, celle des canaux **TRP** (Transient Receptor Potential), a apporté une nouvelle impulsion dans l'étude du rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  et ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude de la physiologie de l'épiderme humain. Plus récemment, le canal **Orai1** a suscité un grand intérêt du fait de son rôle central dans l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  le plus important dans les cellules non excitables dénommé **SOCE** (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) : l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  induite par la vidange des stocks réticulaires.

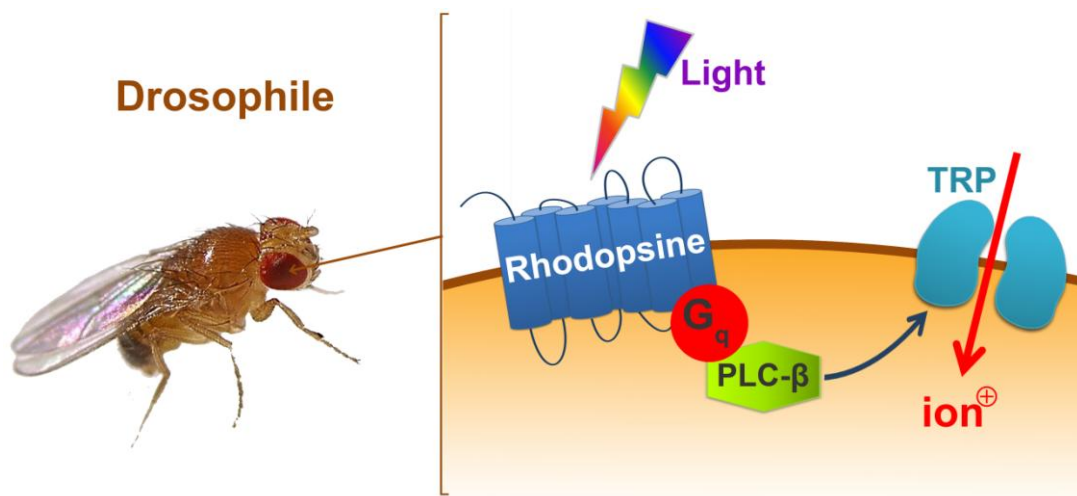


## IV.A. La super-famille des canaux TRP

L'histoire de la super-famille des canaux cationiques **TRP (Transient Receptor Potential)** a débuté en 1969 par l'isolation d'une forme mutante du « transient receptor potential » chez la Drosophile par *Cosens et Manning*. (125)

En étudiant l'activité électrique oculaire du nerf optique de la drosophile à l'aide d'un électrorétinogramme (ERG), ils ont pu mettre en évidence un retard dans la réponse de leurs photorécepteurs pendant une illumination continue de la rétine. Chez le modèle mutant TRP, l'enregistrement de l'ERG présentait une **dépolarisation transitoire** conduisant à une altération de la vision.

### TRANSDUCTION DU SIGNAL LUMINEUX CHEZ LA DROSOPHILE



**Figure 14** : Transduction du signal lumineux chez la drosophile. La stimulation de la rhodopsine par la lumière active une cascade de signalisation activant un canal membranaire : TRP.

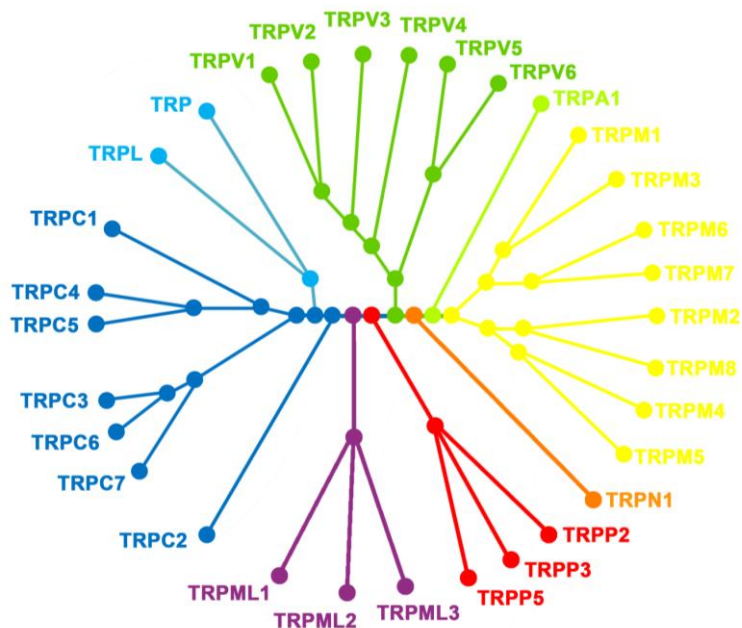
Chez la drosophile, la rhodopsine est un récepteur photosensible à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine Gq qui, suite à sa stimulation, active l'ouverture d'un canal cationique membranaire par l'intermédiaire de la PLC-β ([figure 14](#)). Les

drosophiles présentant une dépolarisation transitoire possédaient en fait une mutation du gène codant pour le canal ionique impliqué dans la transduction du signal lumineux, il fut alors appelé *trp* pour « transient receptor potential ». Par la suite, d'autres travaux ont montré l'existence, chez la drosophile, d'un autre canal activé par la PLC présentant une forte homologie avec le premier TRP, qui pourrait fonctionner en synergie avec ce dernier. Il fut nommé TRPL pour « TRP-like ». (126)

Les recherches se sont ensuite portées sur la caractérisation des orthologues des canaux TRP et TRPL chez les mammifères.

Le clonage de 7 gènes puis 20 supplémentaires, et la découverte d'ARNm alternatifs pour certains TRP a considérablement augmentée le nombre de protéines-canal TRP connue. (127, 128)

## LA SUPER-FAMILLE DES TRP



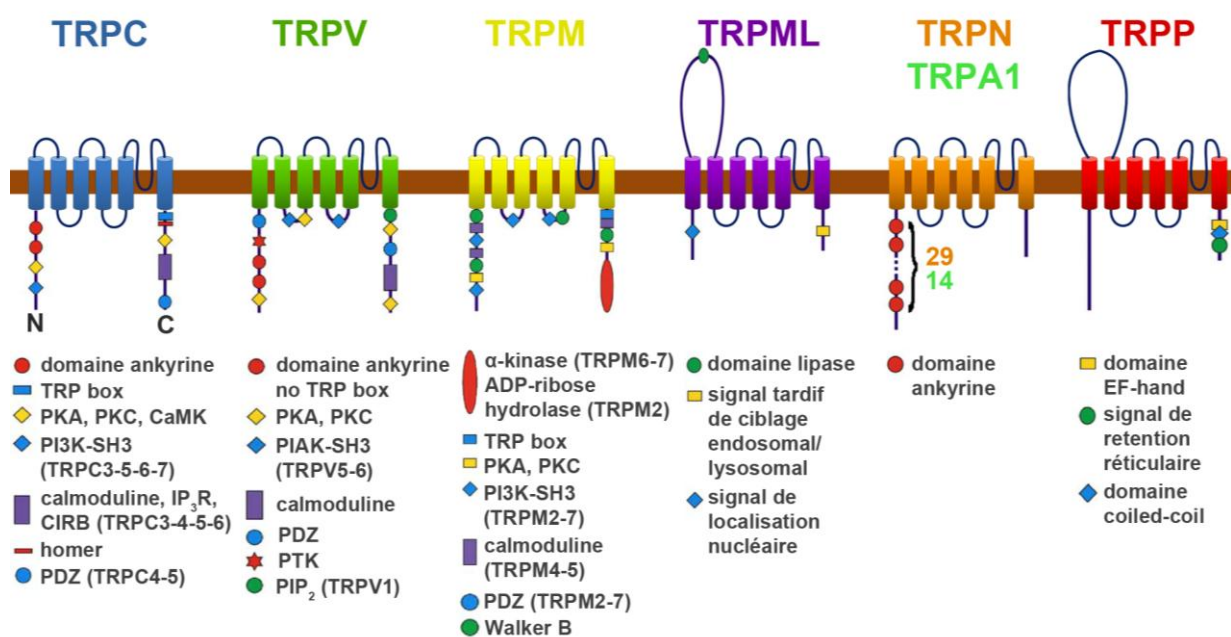
**Figure 15 :**

Arbre phylogénétique des canaux de la super-famille des TRP. Représentation des 7 sous-familles : TRPV, TRPM, TRPC, TRML, TRPP, TRPN, TRPL. (adapté de Gees, Colsoul and Nilius 2011)

L'analyse phylogénétique des gènes de cette super-famille a permis de les classer par groupes. Chez les mammifères, les 32 gènes ont été classés en 7 sous-familles (129) ([figure 15](#)):

- **TRPC** (7 membres) pour « Canonique » ou « Classique » en raison de leur forte homologie avec la protéine **TRP** originelle découverte initialement chez la drosophile.
- **TRPV** (6 membres) en référence au premier membre de cette famille (TRPV1 ou récepteur aux « Vanilloïdes ») qui fut identifié comme un canal activé par le principal composant irritant du piment rouge : la capsaïcine.
- **TRPM** (8 membres) en référence également au premier membre de cette famille (TRPM1 ou « Mélastatine ») qui a été cloné à partir d'une lignée cellulaire murine de mélanome.
- **TRPML** (3 membres) pour les « MucoLipines ».
- **TRPP** (5 membres) issus à l'origine de deux gènes *polycystic kidney diseases 1* et *2* (PDK1 pour TRPP1, et PDK2 pour TRPP2).
- **TRPN** (1 membre) aussi appelé NOMPC (no mechanoreceptor potential C), il se distingue des autres TRP par la présence au niveau de son extrémité amino-terminale de nombreux domaines ankyrines répétés (=29).
- **TRPA1** (ou « ANKTM1 »), un membre éloigné de la famille TRP, se distingue également par de nombreux domaines ankyrines répétés (=14).

## STRUCTURE DES TRP



**Figure 16** : Représentation schématique de la structure d'un monomère à 6 domaines transmembranaire pour les 7 sous-familles de canaux TRP, ainsi que les domaines caractéristiques qui y sont associés. (Adapté de Pedersen, Owsianik et Nilius, *Cell Calcium*, 2005)

Les canaux d'un même groupe possèdent une structure protéique primaire et secondaire proche. La structure générale d'un canal TRP comprend 6 segments transmembranaires hydrophobes, chacun séparé par de petites boucles hydrophiles. Les deux boucles carboxy- et amino-terminales sont cytoplasmiques et contiennent 1 à 2 zones hydrophobes relativement bien conservées ainsi que des structures en hélice alpha ([figure 16](#)). La séquence comprise entre les segments transmembranaires 5 et 6 comprend une boucle-P (« P-loop »), partiellement conservée par rapport à celle des canaux potassiques voltage-dépendants « Shaker », et forme le filtre de sélectivité du pore ionique. Cette analyse est en accord avec les résultats démontrant que les canaux de type TRP ne sont pas voltage-dépendants au sens classique du terme. Un petit segment qualifié de domaine TRP, adjacent au 6<sup>ième</sup> segment transmembranaire, est conservé dans les canaux TRP et TRPL de la drosophile ainsi que dans les groupes TRPC et TRPM chez les mammifères. Il a été proposé que ce segment soit impliqué dans la régulation de l'activité des canaux par certains lipides comme le phosphoinositol bisphosphate : PIP2 ([130](#), [131](#)). Enfin certains domaines protéiques bien connus comme les domaines ankyrines, principalement impliqués dans l'ancrage des canaux au cytosquelette, sont conservés dans la boucle amino-terminale des familles TRPC et TRPV. Finalement, de nombreux ARNm alternatifs ont été clonés pour certains TRP (jusqu'à 9 différents pour TRPM3) ([132](#), [133](#)). Ces ARNm issus d'épissages alternatifs peuvent coder des protéines tronquées ou des protéines présentant des insertions. Ces isoformes se comportent soit comme des canaux fonctionnels à part entière soit comme des dominants négatifs bloquant la fonction de la forme « classique ». Ainsi, une petite isoforme de TRPM1, surexprimée dans le mélanome, est capable de s'associer avec la forme complète pour bloquer la translocation du canal vers la membrane plasmique ([134](#)). Malgré des caractères très conservés, les canaux TRP présentent de nombreuses différences fondamentales laissant entrevoir un nombre conséquent de combinaisons préfigurant la diversité de leurs mécanismes d'activation.

Les canaux TRP peuvent être activés par une large variété de stimuli : par des messagers intra- ou extracellulaires, des produits chimiques, un stress mécanique ou osmotique, et certains par l'état de remplissage des stocks intracellulaires (RE, mitochondries). En plus de la régulation des canaux par leur activation directe, il semble que d'autres canaux TRP seraient constitutivement ouverts à la membrane plasmique et pourraient être régulés par la translocation de vésicules cytosoliques à la membrane plasmique ([135](#)). Certains canaux TRP

se caractérisent par leur sensibilité à des températures chaudes ou froides, ils sont appelés **ThermoTRP** (136). Des recherches sur l'expression des TRP chez l'homme ont montré que certains de ces canaux étaient exprimés dans la peau et notamment dans l'épiderme. Il semblerait même que ces canaux soit à l'origine des sensations douloureuses, ou non, suite à l'exposition de la peau à la chaleur et au froid.

Pour la suite, nous nous focaliserons sur les canaux TRP exprimés dans l'épiderme humain.

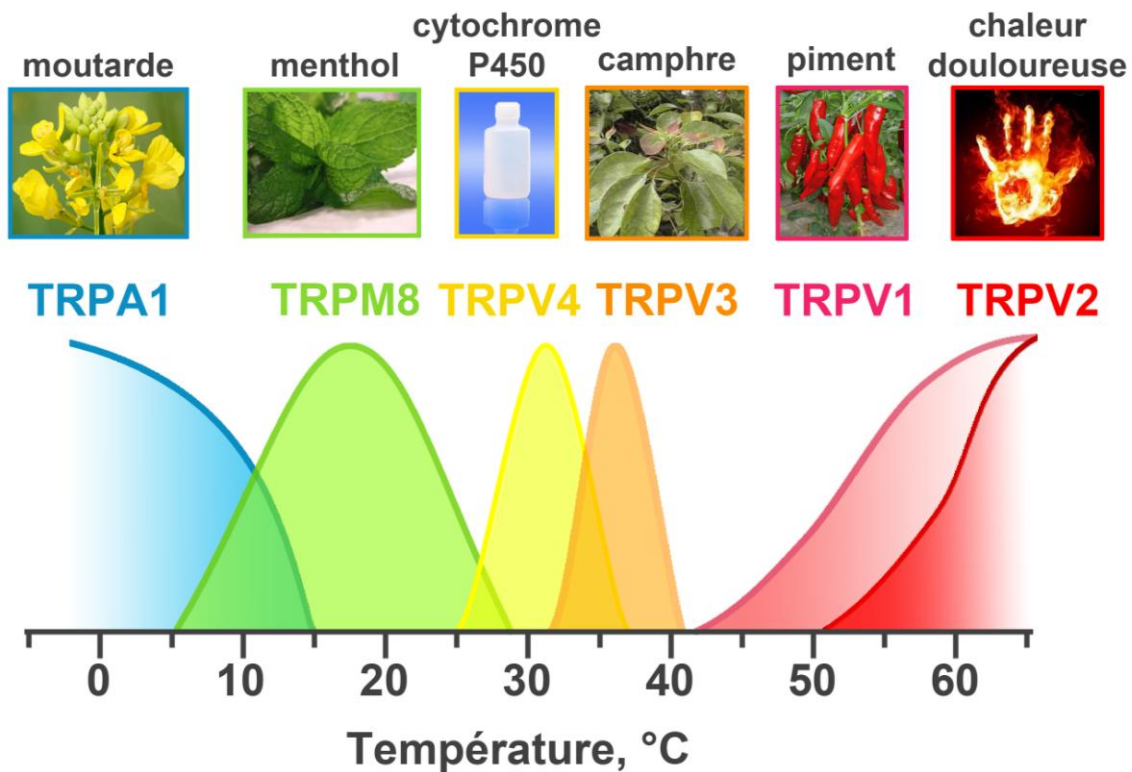
#### **IV.A.1. Les canaux TRP thermosensibles de l'épiderme**

Le support physique (moléculaire) responsable de la sensibilité aux variations de température est resté longtemps inconnu. C'est le clonage des canaux TRP qui a permis de caractériser les protéines responsables de ce phénomène. Il en ressort que ce n'est pas une seule protéine mais plusieurs membres d'une même famille qui assurent le rôle de thermorécepteur.

En effet, à ce jour, 6 membres de la superfamille des canaux TRP présentent une sensibilité aux variations de température et sont présents dans la peau humaine. **TRPA1** (ou ANKTM) et **TRPM8** sont activés par une diminution de la température alors que les canaux **TRPV1**, **TRPV2**, **TRPV3** et **TRPV4** sont sensibles à une augmentation de la température. D'autres membres des canaux TRP sont sensibles aux différences de températures, mais ne sont pas exprimés dans la peau : TRPM2, TRPM4 et TRPM5.

Ces canaux s'ouvrent pour des gammes de température différentes, mais qui se chevauchent, à tel point que la sensibilité à la température couvre une gamme allant de 8 à 52 degrés ([figure 17](#)) (137). Ils peuvent aussi être activés par l'application d'une variété de substances mimant la sensation de chaleur, comme par exemple la capsaïcine (le composé actif du piment) pour le canal TRPV1. Leur expression dans les kératinocytes de la peau humaine ayant été démontrée, de nombreuses études ont ensuite eu pour but de comprendre le rôle physiologique de ces canaux.

## ACTIVATION DES THERMO-TRP



**Figure 17** : Schéma représentant l'alignement des thermo-TRP en fonction de leur sensibilité à la température. Des exemples de substances pouvant également activer chacun des canaux sont présentés. (Adapté de McKenry, *Eur J Physiol*, 2007)

**TRPV1** : Le canal TRPV1 a été intensivement étudié pour son rôle dans les neurones sensitifs impliqués dans la sensation de la douleur. Il est activé par des températures au-delà de 43°C ou par des substances comme la capsaïcine. Plus tard, d'autres études ont montré que ce canal était également exprimé, en plus faible quantité, dans les kératinocytes de l'épiderme. Il a notamment été montré que l'activation de TRPV1 induit une production de substances pro-inflammatoires dépendante du  $Ca^{2+}$  telles que la prostaglandine E2 et l'interleukine-8. Ceci suggère que TRPV1 peut contribuer à l'induction de la réaction inflammatoire faisant suite à une agression thermique de la peau. (138, 139)

- TRPV2** : Ce canal partage 50% d'homologie de séquence avec TRPV1. Il est, lui aussi, majoritairement exprimé dans les neurones sensitifs. Il n'est pas activé par la capsaïcine mais par les très hautes températures : supérieures à 52°C. Il est donc impliqué dans la thermosensation nociceptive. Bien que le canal TRPV2 soit exprimé dans les kératinocytes, son rôle n'est pas encore bien compris (140).
- TRPV3** : Le gène codant pour le canal TRPV3 est immédiatement adjacent à celui de TRPV1. Il est activé par des températures comprises entre 32 et 42°C, mais aussi par le camphre (Le camphre est récupéré par distillation de morceaux de racines, de tiges ou d'écorces du camphrier). La particularité de ce canal est qu'il n'est pas exprimé dans les neurones sensitifs, alors son activation provoque une sensation de chaleur. Dans ce cas, il semblerait que les kératinocytes puissent transmettre cette sensation de chaleur aux terminaisons des neurones présents dans le derme. D'autres études ont récemment montré que TRPV3 pourrait également intervenir dans l'induction de la différenciation terminale des kératinocytes. (141, 142)
- TRPV4** : Ce canal est activé pour des températures comprises entre 25 et 37°C. Comme TRPV3, il semblerait ne pas être exprimé dans les neurones sensitifs. Cependant, contrairement à TRPV3, TRPV4 est majoritairement exprimé dans les couches supra-basales de l'épiderme et serait impliqué dans la formation des jonctions serrées et des jonctions gap nécessaires à la constitution de la barrière cutanée. (143, 144)
- TRPM8** : Ce canal a d'abord été découvert dans la prostate, il est exprimé dans les neurones, mais aussi dans les kératinocytes. Il est présent à la fois dans la membrane plasmique et dans la membrane du RE. TRPM8 est activé par des températures de 5 à 27°C et par des composés tels que le menthol et ses dérivés (=iciline). Son rôle dans la physiologie de la peau n'est pas encore bien compris, il semblerait toutefois que la stimulation de ce canal par le froid accélérerait la formation de la barrière cutanée. (145, 146)
- TRPA1** : TRPA1 est un membre éloigné de la famille des TRP qui s'active pour des températures très basses et douloureuses ainsi que par l'extrait de moutarde. A la différence de TRPM8, ce canal est impliqué dans la sensation de froid nociceptive. Toutefois, son rôle dans la physiologie de l'épiderme reste encore à être déterminer. (147, 148)



Comme il a été dit précédemment, d'autres canaux TRP sont exprimés dans les kératinocytes mais sont régulés par d'autres modes d'activation que la température. C'est le cas d'un autre canal de la famille des TRPV : TRPV6.

#### **IV.A.2. Le canal TRPV6**

Le canal **TRPV6** n'est pas sensible aux différences de température et aucun activateur ne lui est encore associé. Il semblerait que ce canal soit constitutivement ouvert à la membrane plasmique, c'est-à-dire qu'une fois localisé dans la membrane, TRPV6 serait à l'origine d'un influx de cations dans la cellule. TRPV6 est le canal le plus sélectif pour le  $\text{Ca}^{2+}$  parmi tous les TRP, il est notamment impliqué dans la réabsorption du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de l'intestin et du rein (135, 149). La création d'une souris possédant une délétion du gène codant pour le canal TRPV6 (KO-TRPV6) a confirmé le rôle fondamental de ce canal dans l'homéostasie calcique. Entre autres, ces souris KO-TRPV6 présentent une diminution de l'absorption de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'épithélium intestinal de l'ordre de 60% en l'absence de modifications des taux circulants de Vitamine D3. De plus, ces souris KO-TRPV6 sont également caractérisées par une diminution de l'épaisseur de la peau, en particulier la couche cornée et une perte du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  calcique, suggérant un rôle majeur du canal TRPV6 dans la physiologie de l'épiderme (150). Par la suite, des études *in vitro* utilisant l'induction de la différenciation des kératinocytes par le *calcium switch*, ont montré que d'une part, l'expression du canal TRPV6 est augmentée dans les kératinocytes différenciés, et d'autre part, que l'inhibition de l'expression de TRPV6, par des techniques d'ARN interférents et avant la stimulation par le *calcium switch*, prévient le phénomène de stratification et l'expression de marqueurs de différenciation (84). Il semblerait donc que l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique suite au *calcium switch* soit la conséquence d'un influx calcique porté par le canal TRPV6.

**Par conséquent, ces derniers résultats accordent au canal TRPV6 un rôle primordial dans la différenciation des kératinocytes humains et donc dans la physiologie de l'épiderme.**

Nous savons également que la **VD3** participe à la régulation de la différenciation (voir II.C.B), et qu'elle ne serait en fait qu'un cofacteur de l'action du  $\text{Ca}^{2+}$ . Or, la VD3 régule l'expression du canal TRPV6. En effet, que ce soit au niveau du rein, de l'intestin ou de la peau, la VD3 induit une **surexpression du canal TRPV6**. Par conséquent, TRPV6 représente la principale voie d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  lors de l'induction de la différenciation stimulée par l'action combinée de la VD3 et du  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire. (84, 151)



Par ailleurs, des études électrophysiologiques du canal TRPV6 ont mis en évidence des propriétés biophysiques rappelant celles du **CRAC** (**Ca<sup>2+</sup>-Release Activated Ca<sup>2+</sup> current**). Ce dernier est un courant caractéristique des lymphocytes T correspondant à une entrée de Ca<sup>2+</sup> activée par la vidange des stocks calciques intracellulaires, comme le RE par exemple. Ce courant est plus généralement appelée **SOC** (**Store-Operated Current**) dans les autres types cellulaires. Toutefois, bien que le canal TRPV6 partage certaines caractéristiques biophysiques avec ce type de courant calcique, il semblerait plutôt qu'il n'y participe que minoritairement. (152)

Le courant de type SOC représentant la plus importante voie d'entrée du Ca<sup>2+</sup> dans les cellules non excitables, il a pour rôle de remplir les stocks calciques intracellulaires après leur déplétion afin de maintenir l'homéostasie calcique. De récentes recherches se sont intéressées à son rôle et à la composition moléculaire des canaux qui y sont associés. Deux canaux de la famille des TRPC ont été proposés.

#### **IV.A.3. Les canaux TRPC1/TRPC4**

Le canal **TRPC1** est le premier canal à avoir été identifié comme un canal **SOC** (**Store-Operated Channel**). Son implication dans ce type de courant est reconnue dans un grand nombre de types cellulaires incluant les glandes salivaires, les muscles lisse et squelettiques, les cellules intestinales et endothéliales, ainsi que les kératinocytes (153). De même, **TRPC4** intervient également dans le courant de type SOC (154). De plus, comme pour le canal TRPV6, il a été montré que l'expression des canaux TRPC1 et TRPC4 est modifiée en fonction de l'état de différenciation des kératinocytes *in vitro*. En effet, l'expression du canal TRPC1 est faible dans les kératinocytes non différenciés et augmente lors de la différenciation, alors que le canal TRPC4 est peu ou pas exprimé dans les kératinocytes non différenciés et apparaît lors de la différenciation. Il a également été montré que l'amplitude du courant SOC augmente avec l'état de différenciation des kératinocytes, ce qui confirme le rôle des canaux TRPC1 et TRPC4 dans ce mécanisme. De plus, d'autres expériences ont montré que l'expression de ces canaux dans les kératinocytes non différenciés est nécessaire à l'induction de la différenciation par le *calcium switch*. (155)

Il existe plusieurs hypothèses quant aux modes d'activation de ces canaux membranaires suite à la vidange des stocks calciques réticulaires. Le plus étudié implique la participation d'une protéine transmembranaire située au niveau du RE, **STIM1** (**STromal Interaction Molecule**

1). STIM1 est caractérisée par la présence d'un motif EF-hand près de l'extrémité amino-terminale situé dans la lumière du RE, ce qui lui confère la propriété de senseur calcique. Ainsi, STIM1 peut sentir les différences de concentration en  $Ca^{2+}$  dans le RE (156, 157).

*Dans ces conditions, l'activation de la déplétion des stocks réticulaires, pouvant être induite par la fixation de l' $IP_3$  sur son récepteur, provoquerait la diminution de la concentration en  $Ca^{2+}$  dans le RE, qui serait alors détectée par STIM1, qui à son tour activerait les canaux SOC membranaires (figure 18).*

Le mécanisme d'activation des canaux SOC par la protéine réticulaire STIM1 a longtemps été sujet à discussion. Il en ressort maintenant qu'il y aurait une translocation et un regroupement des protéines STIM1 en « puncta » au niveau de régions du RE proche de la membrane plasmique, formant ce que l'on appelle un microdomaine, où STIM1 pourrait alors activer les canaux SOC (158). De récentes études ont montré que STIM1 active le canal TRPC1 par une interaction moléculaire électrostatique entre les résidus aspartate du canal chargés négativement et les lysines chargées positivement de STIM1. (157, 159)

Depuis 2006, un autre acteur important de l'entrée de  $Ca^{2+}$  de type SOC a été identifié, il s'agit du canal Orai1.

## IV.B. Le canal Orai1

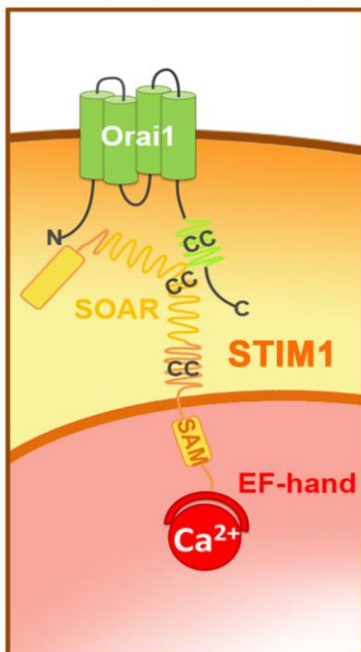
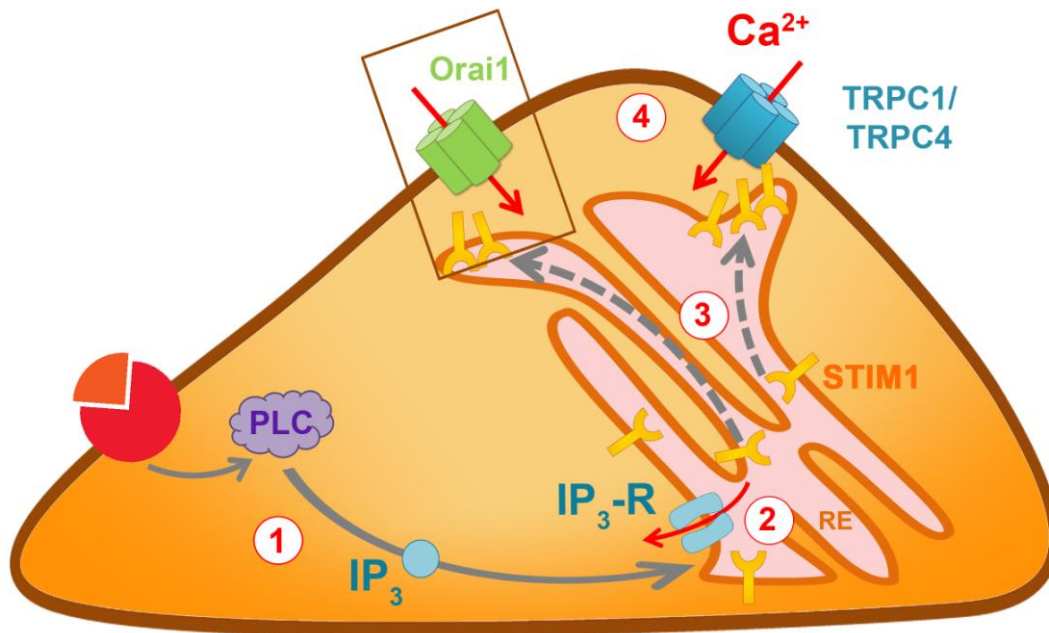
En 2006, il a été identifié un autre candidat pouvant intervenir dans le courant de type SOC. En effet, les lymphocytes de patients atteints du syndrome **SCID** (Severe Combined ImmunoDeficiency) montraient une altération de l'entrée de  $Ca^{2+}$  suite à la vidange du RE (160). Il a ensuite été montré que ces patients présentaient une mutation d'un gène codant pour un canal ionique et fut nommé Orai1 (d'après la mythologie grecque, les « Orai », Heures en français, sont les gardiennes des portes de l'Olympe) (161). Il a ensuite été mis en évidence que ce canal Orai1 participait à l'influx calcique de type SOC dans différents types cellulaires (162, 163).

**Orai1** est une protéine composée de 4 domaines transmembranaires dont les extrémités amino- et carboxy-terminales sont intracellulaires. Sa région N-terminale est caractérisée par une région riche en résidus proline et arginine, son extrémité C-terminale contient un domaine d'interaction protéique *coiled-coil*, tandis que la boucle extracellulaire entre le 3<sup>ième</sup> et le 4<sup>ième</sup>

domaine transmembranaire contient un site de N-glycosylation. Classiquement, 4 sous-unités Orai1 forment un canal fonctionnel, le 1er domaine transmembranaire de chaque sous-unité constitue le pore et définit la haute sélectivité au  $\text{Ca}^{2+}$  du canal. (164, 165)

Comme TRPC1, Orai1 est activé par une interaction avec la protéine réticulaire STIM1 suite à la vidange des stocks calciques, toutefois, il ne s'agirait pas d'interactions électrostatiques. Il semblerait plutôt qu'il y aurait une interaction physique entre STIM1 et Orai1. Un domaine *coiled-coil* situé sur la région cytoplasmique de STIM1 appelé **SOAR** (**S**TIM1 **O**rai1 **A**ctivating **R**egion) se lie à l'extrémité C-terminale d'Orai1 et induit l'ouverture du canal (166, 167).

## MECANISME D'ACTIVATION DU COURANT SOC



- 1 L'activation d'un récepteur membranaire couplé à une protéine G induit la synthèse d'IP<sub>3</sub> par la PLC
- 2 L'IP<sub>3</sub> se fixant sur son récepteur active la vidange des stocks calciques réticulaires. La diminution du Ca<sup>2+</sup> est sentie par STIM1
- 3 Suite à son activation, STIM1 est transloqué vers des régions du RE proches de la membrane plasmique, formant des microdomaines.
- 4 Le rapprochement de STIM1 de la membrane plasmique permet l'interaction de STIM1 avec des canaux calciques membranaires comme TRPC1/C4 ou Orai1  
L'activation de ces canaux induit une entrée de Ca<sup>2+</sup>

**Figure 18** : Représentation schématique des mécanismes cellulaires mis en jeu lors de l'activation de l'influx calcique de type SOC. Dans l'encadré, les structures générales de STIM1 et d'un monomère d'Orai1 sont représentées. STIM1 est composé d'un domaine EF-hand intra-réticulaire agissant comme senseur calcique, un motif stérile alpha (SAM), deux domaines Coiled-coil (CC) dont un comprenant la région SOAR (STIM1 Orai1Activating Region). C'est la région SOAR qui interagit directement avec la région coiled-coil cytoplasmique d'Orai1 et permet son activation et le passage des ions Ca<sup>2+</sup>.

La création d'une souris dont le gène codant pour ce canal a été délété a mis en évidence un rôle potentiel de ce canal dans le développement de la peau. En effet, ces souris présentent, entre autres, une irritation des paupières, une alopécie ainsi qu'une peau plus fine s'accompagnant d'une diminution du nombre de kératinocytes et d'une modification de leur morphologie (168). Ces dernières données montrent donc qu'Orail pourrait être un acteur important dans le développement normal de l'épiderme.

**Néanmoins, aucune étude n'a encore été menée sur le rôle potentiel de ce canal dans le développement de l'épiderme humain.**

# PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

*« Pour réussir, il ne suffit pas de prévoir. Il faut aussi savoir improviser. »*

**Isaac Asimov**

## ***Problématique***

Le maintien de l'intégrité structurale de l'épiderme humain, et donc de la barrière cutanée, est le résultat d'un équilibre délicat entre, d'une part la prolifération et la migration des cellules basales de l'épiderme et, d'autre part, la différenciation ascendante des kératinocytes vers sa superficie.

Depuis maintenant quelques années le  $\text{Ca}^{2+}$  est considéré comme l'un des acteurs majeurs dans la régulation de ces différents processus physiologiques. Il intervient comme second messenger dans un grand nombre de voies de signalisation cytosolique participant à la migration, la prolifération et la différenciation des kératinocytes humains.

Toutefois, les acteurs de la signalisation calcique intervenant dans ces processus sont encore mal connus. C'est pourquoi l'étude des flux calciques membranaires s'avère une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu lors du développement de l'épiderme humain.

**En conséquence, ce travail s'est focalisé sur les canaux perméables au calcium exprimés dans les kératinocytes humains. Le choix des cibles étudiées au cours de cette Thèse s'est fait autour de plusieurs données de la littérature montrant l'implication potentielle des canaux SOC et du canal TRPV6 dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme.**

## **Objectifs**

A l'heure actuelle, peu de recherche sont menées sur l'implication des canaux calciques sur l'épiderme humain ou sur des cellules primaires en culture. L'un des buts premiers de cette Thèse est précisément d'étudier le rôle de ces canaux calciques dans des kératinocytes issus de cultures primaires afin de se rapprocher le plus fidèlement possible de ce qu'il pourrait être *in vivo*. C'est pourquoi ce projet a consisté à étudier :

### **1) L'implication des canaux SOC dans le développement de l'épiderme humain**

Quel est nature moléculaire des canaux ioniques impliqués dans le courant SOC dans les kératinocytes humains ?

Quel est le profil d'expression des canaux SOC dans l'épiderme humain ?

Est-ce que les canaux SOC sont impliqués dans l'induction de la différenciation ?

Ou, est-ce qu'ils sont impliqués dans la prolifération et/ou la migration des kératinocytes ?

### **2) Le rôle du canal TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes humains**

Quelle est l'implication de TRPV6 dans les influx de  $Ca^{2+}$  survenant lors de la différenciation des kératinocytes humains ?

Par quel(s) mécanisme(s) TRPV6 peut être régulé pour induire la différenciation des kératinocytes humains ?

### **3) Recherche de cibles pharmacologiques potentielles dans le cadre d'une collaboration avec les laboratoires Johnson&Johnson**

Est-ce que les canaux calciques représentent des cibles de choix dans le développement de nouvelles stratégies contre les altérations du développement de l'épiderme humains ?

**L'objectif général de cette thèse est donc de comprendre le rôle des canaux calciques dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain.**



# **MATERIELS ET METHODES**

Dans cette partie seront décrites les différentes techniques utilisées au cours de cette thèse. Je me suis personnellement concentré sur les techniques de culture cellulaire, d'électrophysiologie, d'imagerie calcique, de microscopie confocale et de biologie cellulaire. J'ai également participé aux expériences en biologie moléculaire. Par contre, la plupart des travaux en biologie moléculaire ainsi que certains travaux d'imagerie cellulaire ont été réalisés à l'aide de collaborations internes ou externes au laboratoire.

Les « Matériels et méthodes » relatifs à chaque article sont associés à ces derniers dans le chapitre « Résultats » ; le chapitre présente globalement l'ensemble des techniques utilisées dans le cadre de l'étude des kératinocytes au laboratoire.

## **I. La culture cellulaire**

### **I.A. Les lignées cellulaires**

Les travaux de cette Thèse ont été focalisés sur l'étude des cellules primaires d'épiderme humain, afin de se rapprocher le plus fidèlement possible de la physiologie humaine. Néanmoins, je présenterai brièvement la lignée des cellules HaCaT, utilisée classiquement dans la littérature, ainsi que dans les précédentes études du laboratoire.

#### La lignée HaCaT :

La lignée HaCaT (**H**uman **a**dult low **C**alcium high **T**emperature) est une lignée de kératinocytes humains, aneuploïde et spontanément immortalisée. Elle a été créée par Boukamp et *coll.*, en 1988 et son principal intérêt est sa capacité à se différencier *in vitro* et *in vivo* comme les kératinocytes normaux, sous l'influence de stimuli spécifiques tels que l'augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  dans le milieu de culture cellulaire. Au-delà de la concentration seuil de 0,07 mM, ces cellules développent des jonctions intercellulaires, ralentissent progressivement leur vitesse de prolifération et synthétisent des protéines spécifiques des couches suprabasales de l'épiderme telles que la cytokératine 10 et l'involucrine.

### Les cultures primaires de kératinocytes (hPK) :

Les cellules primaires de kératinocytes ont été achetées chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Ces cellules sont essentiellement issues de pièces chirurgicales de donneurs adultes (réduction mammaire le plus souvent) et sont cultivées pendant quelques semaines avant de nous être envoyées congelées. Ces cellules constituent un outil précieux, néanmoins, elles ont une durée de vie très courte. ([figure 19](#))

## **I.B. Conditions de culture**

**La lignée HaCaT** est maintenue dans un milieu DMEM-HG dépourvu de calcium (Gibco, Life technologies, France) complété avec du sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (2 à 10% au besoin, Séromed, Strasbourg) ainsi qu'avec 1% de kanamycine (100µg/mL). En fonction des expériences, on ajoute 1.7 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture afin de favoriser la différenciation sans quoi cette concentration du milieu n'est estimée qu'à 0.07 mM ce qui est insuffisant pour déclencher la différenciation.

**Les cultures primaires de kératinocytes, hPK (human primary keratinocytes)** aussi appelés NHK dans la littérature (Normal Human keratinocytes) sont obtenues chez Invitrogen. Leur utilisation se fait conformément aux accords d'Helsinki ainsi qu'au guide d'éthique du CHRU de Lille. Les kératinocytes sont cultivés dans du milieu keratinocyte SFM complémenté avec 5 ng/ml d'EGF (Epidermal Growth Factor) et 50 µg/ml de BPE (Bovine Pituitary Extract) (Gibco Invitrogen Corp., Cergy Pontoise, France), dans des flasques de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> puis sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est remplacé 3 fois par semaines. Lorsque les cellules atteignent 80% de confluence, elles sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (0.25%, ICN, USA). Notons que les kératinocytes sont des cellules particulièrement adhérentes et que cette étape de trypsinisation peut prendre plusieurs minutes. Dès que les cellules sont décollées, l'action protéolytique de la trypsine est bloquée par l'addition de milieu de culture complet. Un volume de cette suspension cellulaire équivalent à 500.000 cellules est ensuite prélevé et ajouté à 10 mL de milieu complet et placé dans une nouvelle flasque.

En règle générale, les cellules cultivées dans un milieu pauvre en  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}] = 0,07 \text{ mM}$ ) correspondant au milieu K-SFM supplémenté sont considérées comme non-différenciées

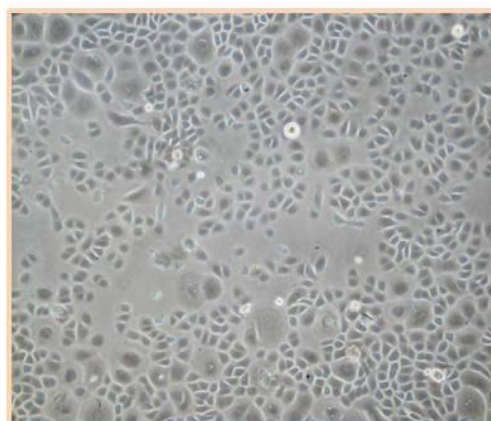
(uhPK). Par opposition, les cellules cultivées dans un milieu riche en  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}] = 1,7 \text{ mM}$ ) sont considérées comme différenciées (dhPK).

Le contrôle de l'état de différenciation se fait sur l'analyse de 2 critères ([figure 19](#)):

**Le critère morphologique** : les cellules différenciées s'aplatissent, forment des jonctions intercellulaires, poussent en îlots aboutissant à un phénomène de stratification.

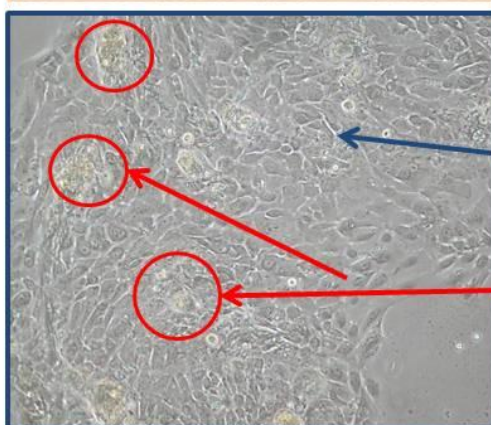
**Le critère biochimique** : les cellules différenciées synthétisent des protéines spécifiques telles que la cytokératine 10, l'involucrine, la transglutaminase 1 ou encore la filaggrine. Ces protéines sont très largement employées dans la littérature pour caractériser la différenciation des kératinocytes.

## LES CULTURES PRIMAIRES DE KERATINOCYTES



### **Kératinocytes Non Différenciés**

Prolifération continue  
Peu de contacts  
Intercellulaires



### **Kératinocytes Différenciés**

Contacts  
intercellulaires  
Stratification

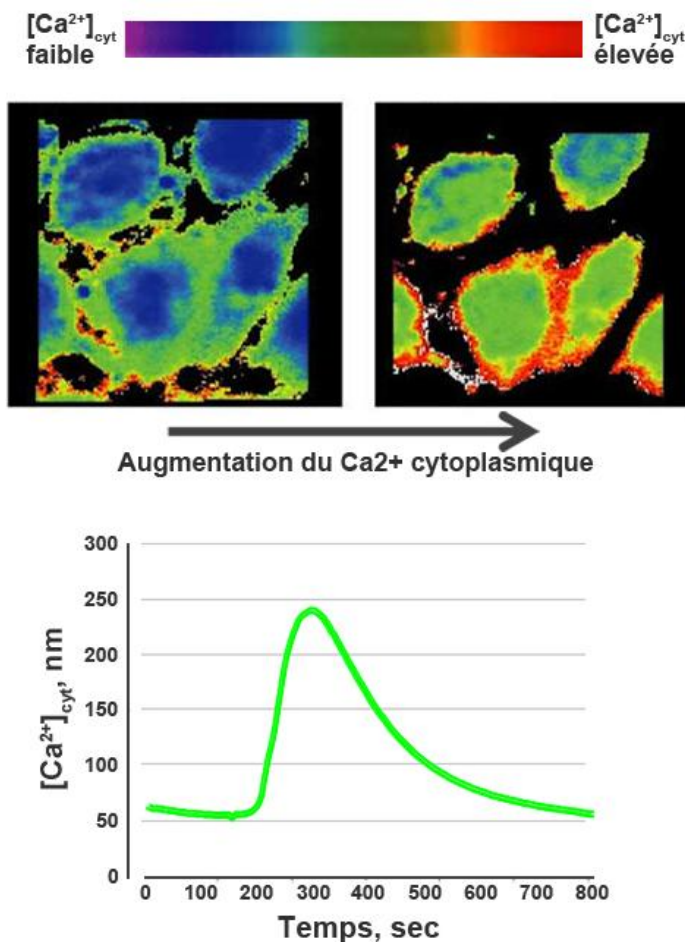
**Figure 19** : Photo au microscope x100 de cellules primaires hPK, non différenciées (uhPK), et différenciées (dhPK).

Notons que notre étude de la différenciation se focalise sur l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$ , de ce fait, nous utilisons l'augmentation de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture pour induire la différenciation qu'on appelle le *Calcium Switch*. Cette méthode nous permet de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la **différenciation précoce** des kératinocytes (passage de la couche basale à la couche épineuse).

## II. Technique d'imagerie calcique

Cette technique nous permet de mesurer des variations de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  au sein des cellules par microscopie par fluorescence traditionnelle. Lors de cette Thèse, nous nous sommes principalement intéressés aux variations de la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique.

### L'IMAGERIE CALCIQUE



**Figure 20 :**

Principe de fonctionnement de l'imagerie calcique. Une échelle en fausse couleur donne la concentration relative en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. L'évolution des modifications de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est enregistrée en fonction du temps.

## II.A. Mesure de la concentration de calcium libre

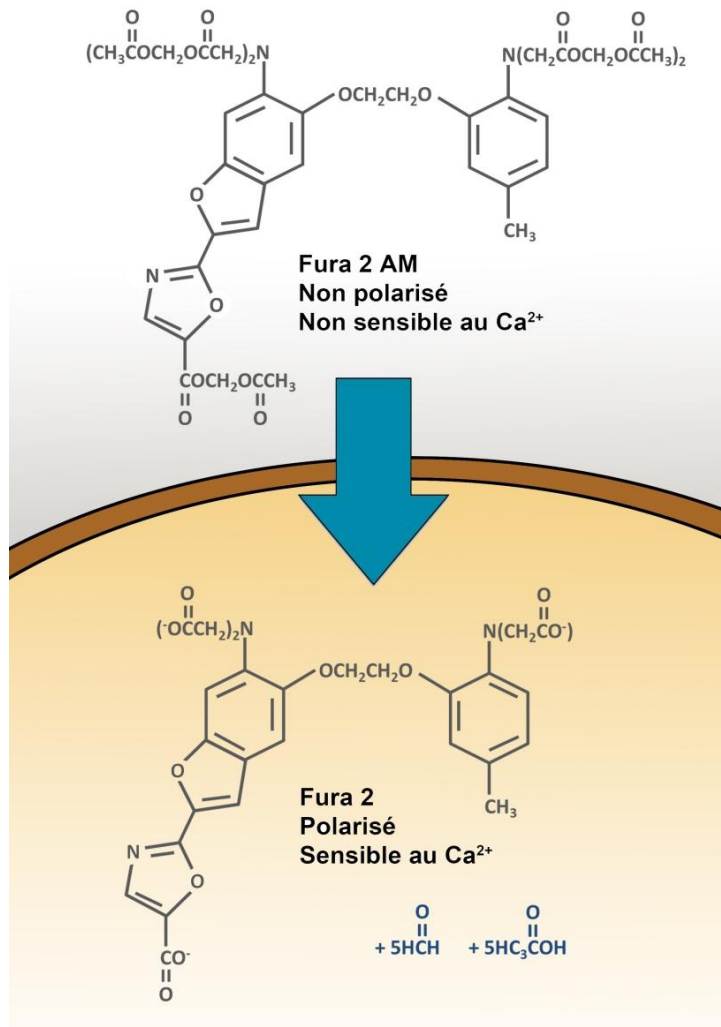
La technique d'imagerie calcique par fluorescence est couramment utilisée pour mesurer les variations de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) (*figure 20*). Cette technique a l'avantage de permettre de mesurer les variations de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  simultanément sur plusieurs dizaines de cellules et ainsi de déterminer si l'application ou le prétraitement des cellules avec une drogue donnée modifie l'homéostasie calcique. Cette technique est assez simple à réaliser et apporte rapidement un résultat brut. Ce dernier nécessite néanmoins un approfondissement par des techniques complémentaires telles que le patch clamp. En effet, l'homéostasie calcique est la conséquence de l'activité de nombreuses protéines comprenant les canaux ioniques transmembranaires, mais aussi, les échangeurs et les pompes. Il est donc fondamental dans notre stratégie d'utiliser la technique de patch clamp en complément afin d'enregistrer spécifiquement le fonctionnement des canaux ioniques. Quoiqu'il en soit, du fait de son accessibilité et de sa rapidité d'exécution, cette technique reste un élément important dans l'étude préliminaire des canaux calciques. La mesure des variations de la concentration cytoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$  a été réalisée à température ambiante.

## II.B. Charge des cellules en Fura-2/AM

La mesure du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique se fait grâce à une sonde calcique appelée Fura-2/AM (acétoxyméthylester). Les cellules sont alors mises en contact avec cette sonde et c'est l'entrée de celle-ci dans les cellules qu'on appelle la charge. Les cellules sont chargées dans le milieu de culture à raison de 2,5  $\mu\text{M}$  de Fura-2/AM pendant 45 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées durant 10 minutes supplémentaires avec du milieu de culture sans sonde afin de rincer le surplus de celle-ci dans le milieu extracellulaire. Les cellules sont finalement rincées avec du milieu HBSS standard (Hank's Balanced Salt Solution) dont la composition est la suivante :

140 NaCl, 5 KCl, 2  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{CaCl}_2$ , 0.3  $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ , 0.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4  $\text{NaHCO}_3$ , 5 glucose, et 10 HEPES. Le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH.

## Le FURA-2/AM



**Figure 21 :**

Représentation schématique de la charge des cellules avec le Fura-2/AM, et des modifications de sa structure moléculaire.

### II.C. Le Fura-2

Le Fura-2 est une sonde calcique dérivée du fluorophore stilbène possédant quatre fonctions carboxyles dont l'arrangement spatial octacoordonné est caractéristique des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA. Il existe deux formes de fura-2 :

- La forme libre, hydrophile, chargée négativement et acide. Sous cette forme, le fura-2 est fluorescent et cette propriété varie en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  libre ( $K_d=225\text{nM}$ ). Néanmoins, la forme libre du Fura-2 est incapable de rentrer dans les cellules et il faut donc le microinjecter à l'aide d'une micropipette de verre.

- La forme estérifiée, perméante et non-chargée, est appelée acétoxyméthylester de fura-2 (Fura-2/AM). Le Fura-2/AM est capable de pénétrer dans les cellules, où le groupement acétoxyméthyl-ester est clivé par les estérases cytoplasmiques. Le clivage de cette fonction par les estérases stabilise la sonde sous sa forme acide dans le cytosol des cellules. La sonde est alors séquestrée dans le cytoplasme et émet de la fluorescence en fonction de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ .  
([figure 21](#))

Le Fura-2 est un fluorophore à double longueur d'onde d'excitation et à longueur d'onde d'émission unique. Le Fura-2 libre a une longueur d'onde d'excitation maximale située à 380 nm alors que la longueur d'onde maximale d'excitation du Fura-2 lié au  $\text{Ca}^{2+}$  est de 340 nm. Quelle que soit la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$ , la longueur d'onde d'émission du Fura-2 est de 510 nm. Ainsi, l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme des cellules se traduit par une diminution de la fluorescence émise à 510 nm suite à une excitation à 380 nm alors que la fluorescence émise à 510 nm suite à excitation à 340 nm augmente.

## II.D. Equipement optique

L'équipement est composé d'un microscope à épifluorescence (Olympus IX 70), d'une lampe au xénon, d'un monochromateur Till Photonics, d'une caméra digitale CCD (Charge Coupled Device) 12 bits (MicroMax 5 MHz, Princeton) et d'un ordinateur dont le logiciel (Métafluor 5.0, Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images. Les différentes longueurs d'ondes émises par la lampe au xénon sont contrôlées par un monochromateur. Les UltraViolets émis sont dirigés par une fibre optique vers la préparation grâce à un miroir dichroïque. Sous stimulation de l'une ou de l'autre des deux longueurs d'onde d'excitation, les cellules chargées avec un fluorophore émettent de la fluorescence. Cette lumière est transmise au travers du miroir dichroïque vers la caméra CCD. La matrice de cette caméra est composée de l'assemblage de photodiodes dont les coordonnées  $x,y$  définissent un point dans le plan de l'image. Chaque photodiode convertit une intensité lumineuse en « niveau de gris » ( $z$ ) par un convertisseur approprié. Un point image est donc



défini par trois valeurs  $x,y,z$  et est appelé pixel (picture element – littéralement, élément image). Ces trois valeurs sont codées en un signal numérique qui est traité par le logiciel d'analyse.

## II.E. Imagerie Calcique par microscopie confocale

L'étude des variations de  $\text{Ca}^{2+}$  entre les différents compartiments calciques cellulaires a nécessité l'emploi d'une deuxième technique de microscopie par fluorescence, il s'agit de la microscopie confocale. Cette technique permet, du fait de sa très haute résolution spatiale, la mesure qualitative du  $\text{Ca}^{2+}$  dans un organite (RE, mitochondrie). Pour la même raison, la microscopie confocale est utilisée afin de réaliser les travaux d'immunofluorescence (localisation subcellulaire d'une protéine par marquage immunologique).

Le système de mesure est un microscope confocal de type Zeiss LSM 510. Celui-ci est composé d'un microscope inversé doté d'objectifs à immersion 40x (O.N=1,3) et 60x (O.N=1,4) associés à une unité contrôlant les lasers (unité confocale Zeiss). La fluorescence émise est ensuite reçue au niveau de photomultiplicateurs qui transforment l'information lumineuse en information numérique. Ces signaux sont alors traités grâce à un ordinateur doté d'un logiciel spécifique (AIM 3.2) qui recrée les images en fausses couleurs avec une résolution allant jusqu'à 4096\*4096 pixels.

Pour ces expériences, nous utilisons une sonde fluorescente différente du Fura-2, **Le Fluo-4/AM**. Il s'agit d'une sonde sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_d=345$  nm) aux caractéristiques proches des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA. Cette sonde ne possède qu'une longueur d'onde d'excitation ( $\lambda=494\text{nm}$ ) et n'émet de la fluorescence que quand elle est liée au  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\lambda=516\text{nm}$ ). Le fluo-4/AM permet d'évaluer les variations qualitatives de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Le système a été calibré en utilisant des solutions de  $\text{Ca}^{2+}$  et de chélateurs calciques comme l'EGTA pour connaître la fluorescence minimale et maximale de la sonde. La concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  est ensuite calculée avec l'équation suivante :

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}} = kd (F - F_{\text{min}}) / (F_{\text{max}} - F)$$

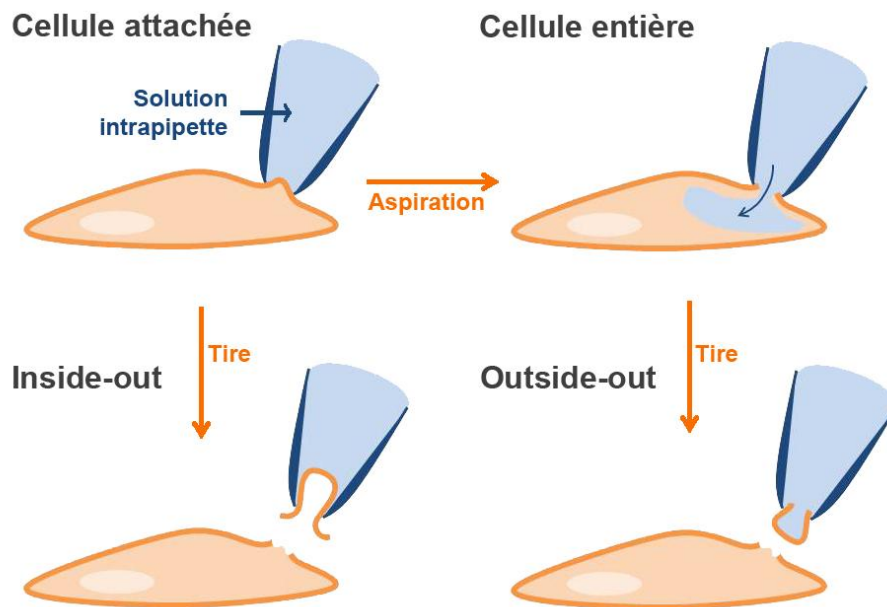
La charge des cellules se fait à température ambiante, dans de l'HBSS contenant 2mM de  $\text{Ca}^{2+}$  avec 2.5 $\mu\text{M}$  de sonde pendant 25 min suivie d'un rinçage de 30 minutes. L'analyse des taux de  $\text{Ca}^{2+}$  est également réalisée à température ambiante.

## III. Electrophysiologie

### III.A. Patch Clamp

Les expériences électrophysiologiques sont réalisées à l'aide de la technique du « patch clamp ». Cette dernière consiste à isoler électriquement un fragment de membrane cellulaire (*Patch* en anglais) en apposant contre la cellule une pipette de verre d'un diamètre de l'ordre du micromètre ( $10^{-6}$  m). Puis, en appliquant une légère dépression dans cette pipette de verre on obtient une résistance de contact entre la pipette et la membrane cellulaire de l'ordre du gigaohm ( $G\Omega$ ,  $10^9$  ohms). Ce protocole permet alors d'imposer un potentiel (*Clamp* en anglais) en mesurant simultanément des fluctuations de courant de l'ordre du picoampère (pA,  $10^{-12}$  A) avec une fréquence très élevée ( $> 1$  kHz).

### LES CONFIGURATIONS DU PATCH-CLAMP



**Figure 22** : Représentation schématique des différentes configurations de la technique de Patch-Clamp pouvant être obtenues

Il existe plusieurs configurations d'étude permettant d'enregistrer soit l'activité d'un seul canal ionique (enregistrements unitaires), à savoir les configurations « cellule attachée », « inside-out » et « outside-out » ; soit de tous les canaux situés dans la membrane plasmique c'est-à-dire la configuration « cellule entière ». ([figure 22](#))

Historiquement, le Patch Clamp désigne les configurations d'enregistrement de canaux individuels (Single-channel Recording), cependant le terme de patch clamp désigne maintenant aussi la configuration cellule entière (Whole Cell Recording) qui permet la mesure de courants macroscopiques.

L'ensemble des expériences de Patch-Clamp de cette Thèse a été réalisé en configuration cellule entière et à température ambiante. Dans la configuration cellule entière (ou *whole cell*), la pipette de patch ( $R \approx 4 \text{ M}\Omega$ ) possédant un diamètre interne de l'ordre de  $1 \mu\text{M}$ , est apposée à la membrane d'une cellule. Une légère aspiration induit alors un contact intime entre la pipette de borosilicate et la membrane plasmique caractérisé par une très haute résistance électrique, qualifiée de « *Giga seal* » ( $R > 10 \text{ Giga}\Omega$ ). Une légère aspiration supplémentaire induit une rupture du fragment membranaire situé immédiatement sous la pipette mettant ainsi en contact la solution intrapipette et le cytoplasme de la cellule étudiée.

Les courants ioniques transmembranaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur EPC9 (HEKA Electronic, Allemagne). Les signaux sont visualisés sur un écran d'ordinateur, stockés directement sur le disque dur de l'ordinateur et analysés grâce au programme Origin 7.0 (Microcal, Northampton, MA).

Nous obtenons ainsi l'enregistrement de l'activité des canaux ioniques membranaires ainsi que leurs caractéristiques biophysiques. La caractéristique principale des courants ioniques est la relation courant (I) / potentiel (V), souvent désignée par le sigle I/V. En effet, cette relation est propre à chaque type de canal ionique et nous permet donc d'identifier avec plus ou moins de précision l'identité de la protéine impliquée dans la genèse du courant.

### **III.B. Solutions utilisées**

Au cours de nos expériences, nous avons focalisé notre attention sur le courant de type SOC. La composition ionique des solutions utilisées pour leur étude est reportée dans les tableaux ci-après :

Solution intrapipette		Solution extracellulaire	
Concentration en mM		Concentration en mM	
Cs methanesulfonate	140	NaCl	120
NaCl	5	Glucose	5
HEPES	10	HEPES	10
BAPTA	5	CaCl <sub>2</sub>	10
EGTA	10	MgCl <sub>2</sub>	2
MgCl <sub>2</sub>	6	pH=7,3 ajusté avec NaOH	
pH=7,3 ajusté avec NaOH			

**Tableau 1** : Compositions ioniques des solutions extracellulaire et intra-pipette utilisées pour l'étude des courants de type SOC en Patch-Clamp, configuration cellules entière.

## IV. Transfection

### IV.A. Les petits ARN interférents (siRNA)

L'ARN-interférence est un mécanisme physiologique de régulation post-transcriptionnelle impliqué dans la défense anti-virale ou dans la régulation du taux des ARN. Ce mécanisme est présent chez tous les eucaryotes et permet de détruire spécifiquement un ARNm. Le principe repose sur l'utilisation de petits ARN double brin d'une longueur de 21 à 23 nucléotides. Ces derniers sont pris en charge par le complexe enzymatique RISC (RNA-Induced Silencing Complex). Ce complexe RISC dissocie les deux brins d'ARN pour ne conserver que le brin anti-sens qui devient par définition le petit ARN interférent (small interfering RNA ou siRNA). Le complexe siRNA-RISC interagit alors avec l'ARN homologue, reconnu par son interaction avec le siRNA. Le complexe RISC clive alors l'ARNm de chaque côté du siRNA entraînant ainsi la destruction de l'ARNm.

Les siRNA utilisés lors de cette Thèse ont été synthétisés par Eurogentec.

## IV.B. Lipofection

Pour transférer les siRNA dans nos cellules, nous avons utilisé deux méthodes, la première, la lipofection a été effectuée avec le « HiPerFect Transfection Reagent » de Qiagen. Cette technique consiste à former un complexe lipidique avec le siRNA (lipoplexe), lui permettant de passer à travers la membrane de la cellule.

Suivant les expériences, lorsque les cellules atteignent 50 à 60% de confluence elles sont transférées transitoirement avec un siRNA dont la concentration varie en fonction de la protéine ciblée (les concentrations sont indiquées dans les articles relatifs). Pour un puits de 35 mm de diamètre (plaque 6 puits), le siRNA est dilué dans 100 µl de milieu sans sérum, auquel nous ajoutons 6 µl de HiPerfect (cf. protocole fourni), le mélange est passé au vortex puis incubé à température ambiante entre 5 et 10 minutes pour permettre la formation des complexes de transfection. Le mélange est ensuite ajouté aux 2 ml de milieu dans le puits. Les cellules sont ensuite laissées au moins 24h dans l'incubateur avant d'effectuer nos différentes expériences.

## IV.C. Nucléofection

La deuxième méthode utilisée pour transférer les siRNAs dans les kératinocytes est la nucléofection. Pour cela, nous avons utilisé le **Nucleofector® Amaxa®** (LonzaBio, Cologne, Allemagne) accompagné du kit spécifique pour la nucléofection des kératinocytes humains. Suivant le protocole, les cellules ayant atteint une confluence de 60 à 80% sont trypsinisées et comptées. Entre 500.000 et 1.000.000 de cellules sont suspendues dans 100µl de la solution de tampon spécifique à la nucléofection de kératinocytes humains, à laquelle on ajoute le siRNA (40 à 100nM). Ce mélange est ensuite transféré dans une cuvette qu'on insère dans le Nucleofector®. Après l'application du



Nucleofector® d'Amaxa® biosystems

programme approprié, on ajoute 500µl de milieu classique supplémenté et on distribue les cellules dans les puits. Les cellules sont ensuite laissées au moins 24h dans l'incubateur avant d'effectuer nos différentes expériences.

## **V. Quantitative real-time PCR**

### **V.A. Extraction des ARNs**

Après un lavage au PBS, une quantité appropriée de solution TRizol® (0,5 à 1 ml) est ajoutée directement sur les cellules pendant 5 minutes à température ambiante. Le mélange est récupéré dans un tube eppendorf et passé au vortex, puis le chloroforme est ajouté et laissé 3 minutes à température ambiante avant de centrifuger les tubes à 12.000 g, 15 minutes à 4°C. On récupère ensuite la phase supérieure à laquelle on ajoute 500µl d'isopropanol afin de précipiter les ARNs, pendant 10 min à température ambiante, le mélange est ensuite centrifugé à 12.000 g, 10 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré, le culot est lavé avec 500µl d'éthanol 70% et l'homogénat est centrifugé à 7500 g, 5 minutes à 4°C. Le culot est laissé à sécher puis 10µl d'H<sub>2</sub>O y est ajouté.

Les ARNs sont ensuite dosés pour chaque échantillon.

### **V.B. Transcription inverse**

Avant d'effectuer la transcription inverse, 2µg d'ARN sont prélevés de chaque échantillon et soumis à un traitement par la DNase I (Désoxyribonucléase I) pendant 1 heure à température ambiante. La réaction est stoppée par l'addition d'EDTA pendant 10 minutes à 65°C. Puis les échantillons sont placés dans la glace puis centrifugés. Le volume final de cette solution sera de 11µl.

La transcription inverse, qui permet d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc) pour chaque échantillon est réalisée comme suit :

- 5,5µl de la solution précédemment préparée, soit 1µg d'ARN, sont ajoutés à :

- 1,2µl d'Hexamère RX6
- 2,9µl d'H<sub>2</sub>O

10 minutes à 70°C

- On y ajoute ensuite :
  - 2µl de Tampon II 10x
  - 2,4µl de Mg<sup>2+</sup>
  - 4µl DNTP
  - 1µl RNase Inhibitor
  - 1µl MULV

10 minutes à température ambiante

30 minutes à 42°C

10 minutes à 95°C

Centrifugation

## V.C. Quantitative real-time PCR

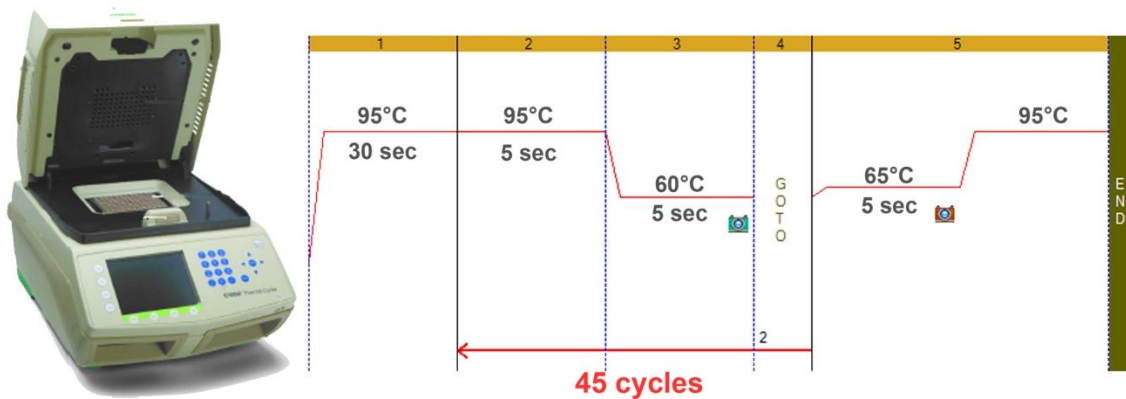
Les ADNc de chaque échantillon vont être soumis à la PCR en temps réel quantitative. Le principe de cette technique consiste à amplifier l'expression d'un gène spécifique, grâce à l'utilisation de couples d'amorces adaptées, et de comparer son taux d'expression à un gène contrôle tel que l'hPRT. L'utilisation d'une sonde fluorescente, le SYBR® Green I, qui s'intercale dans l'ADN lors de chaque cycle d'amplification va permettre de quantifier les taux d'ADNc de départ.

Le mix pour chaque gène se prépare ainsi:

- 1µl de Tampon II 10x
- 1µl de Mg<sup>2+</sup>
- 0,8µl de DNTP
- 0,8µl de l'amorce 3'
- 0,8µl de l'amorce 5'
- 5,2µl d'H<sub>2</sub>O
- 0,06µl de SYBR® Green I
- 0,5µl ADNc

Ce mélange est ensuite déposé dans les puits des plaques 96 puits adaptées au thermocycleur (Biorad CFX 96). En guise de contrôle de l'efficacité de chaque couple d'amorces, une série de dilutions d'un échantillon donné est effectuée. Une fois les échantillons placés dans le thermocycleur, un protocole d'amplification adéquat est sélectionné. ([figure 23](#))

## THERMOCYCLEUR



**Figure 23** : Photographie du thermocycleur utilisé pour la PCR en temps réelle et représentation du protocole utilisé classiquement pour l'amplification des ADNc étudiés.

### V.D. Analyse des résultats

Les quantités relatives d'ADNc dans les différents échantillons ont été estimées en appliquant la technique du SYBR<sup>®</sup> Green I. Celle-ci est basée sur la méthode de calcul des  $\Delta\Delta Ct$ . Le Ct est défini comme le nombre de cycles d'amplification par PCR quantitative du gène étudié, nécessaire pour atteindre un certain seuil de quantité du gène, celui-ci est fixé arbitrairement. La valeur Ct est alors inversement proportionnelle au nombre de copies de la séquence cible présente dans l'échantillon. Pour obtenir une valeur relative du taux d'expression du gène d'intérêt dans un échantillon donné par rapport à un échantillon de référence, la quantité du gène cible est d'abord normalisée par rapport à un gène de référence : une valeur  $\Delta Ct$  est obtenue pour chaque échantillon dont un échantillon défini comme référence (calibreur).



Ensuite, pour chaque échantillon, la valeur du  $\Delta C_t$  est comparée à la valeur du  $\Delta C_t$  obtenue pour l'échantillon calibrateur : une valeur de  $\Delta\Delta C_t$  est ainsi obtenue. Dans chaque échantillon, l'expression relative (RE) du gène cible par rapport à l'échantillon de référence est donnée par la formule  $RE = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

## **VI. Immunodétection**

### **VI.A. Extraction des protéines**

Après un lavage au PBS, le tapis cellulaire est récupéré dans un tampon RIPA (PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>/K, Triton X-100, Déoxycholate de sodium, NP40 et NaCl) complété par un cocktail d'anti-protéases (Sigma, P 8340). L'homogénat est alors soniqué quelques secondes puis incubé sur glace pendant 1 heure. Le lysat est ensuite centrifugé à 1 000\*g pendant 20 minutes à 4°C. Les protéines sont dosées par la méthode BCA.

### **VI.B. Western Blot**

L'électrophorèse est réalisée dans un système Bio-Rad selon la technique SDS-PAGE. La densité du gel de polyacrylamide est déterminée selon la taille des protéines à séparer. A intensité fixée, la migration commence à 80 V, 100 mA/minigel puis dès que le gel de séparation est atteint, la migration se poursuit à 120 V, 100 mA/minigel. A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur un gel de nitrocellulose si elles sont de petite taille et/ou hydrophiles, ou sur un gel de PolyVinylidene Fluoride (PVDF) si elles sont de grande taille et surtout hydrophobes. Le transfert s'effectue à 25 volts et 100 mA / minigel pendant 2h. Après transfert, la membrane est découpée en fonction du nombre d'anticorps utilisés pour l'immunodétection. Les morceaux de membrane sont saturés durant 1h à température ambiante dans un mélange de TNT-lait 5% (15 mM de tampon Tris pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0,05% Tween et 5% de lait en poudre écrémé). Les membranes sont ensuite mises en contact avec les anticorps primaires, à la dilution voulue dans du TNT-lait 2% (les anticorps utilisés sont présentés dans chaque article), soit pendant 1 à 2 heures à température

ambiante soit durant la nuit à 4°C. Après 3 lavages au TNT, les membranes sont mises en présence de l'anticorps secondaire voulu au 1/20 000ème (anti-IGg de lapin, de souris ou autre ; laboratoire Zymed Inc, San Francisco, CA) pendant 1 heure à température ambiante. Après trois lavages au TNT, les protéines sont révélées par chimioluminescence grâce au kit « Supersignal West Pico Chemiluminescent » ou « Supersignal West Dura Chemiluminescent » (Pierce, Rockford Compagny, IL) en suivant les instructions du fournisseur. Les bandes sont finalement exposées sur des films Biomax Light (Kodak, Rochester, NY). L'intensité des signaux est mesurée par densimétrie, puis le rapport de l'intensité de la protéine d'intérêt divisée par l'intensité d'un rapporteur comme l'actine ou la calnexine permet de semi-quantifier l'expression de la protéine d'intérêt.

## VI.C. Technique d'immunofluorescence

L'immunofluorescence indirecte consiste à détecter une protéine spécifique au sein de la cellule par l'intermédiaire de deux anticorps dont le second est couplé à un fluorophore. L'immunofluorescence nécessite tout d'abord de fixer les cellules. Deux techniques différentes de fixation, à savoir le PFA (ParaFormAldéhyde) et l'acétone ont été utilisées pour fixer les cellules. Le choix entre ces deux modes de fixation dépend des anticorps utilisés.

Brièvement, la fixation avec l'acétone consiste à plonger la lamelle dans de l'acétone et à la laisser incuber 10 minutes à -20°C. La lamelle est ensuite rincée plusieurs fois avec du PBS. L'avantage de l'acétone est qu'il perméabilise les cellules en même temps qu'il fixe les molécules.

La fixation au PFA est réalisée en incubant la lamelle 15 min dans du PFA 4% à 4°C. La lamelle est ensuite lavée 3 fois 10 min dans le PBS.

Le protocole d'immunofluorescence consiste à :

- Bloquer et perméabiliser les cellules avec un mélange PBS, gélatine de poisson 1,2%, Tween-20 0,05% et glycine 0,2M.
- Incuber l'anticorps primaire à la concentration désirée dans un mélange de PBS/gélatine de poisson pendant 1 à 2 heures à 37°C.
- Laver 3 fois 10 min avec du PBS/gélatine de poisson.
- Incuber l'anticorps secondaire (anti-IgG lapin ou anti-IgG souris) couplé à un fluorophore à la concentration d'utilisation pendant 1 h à température ambiante.

- Laver 2 fois durant 10 min avec du PBS/gélatine de poisson, puis une dernière fois avec du PBS.
- Monter les lamelles sur des lames avec du Mowiol.
- Conserver les lames à 4°C.

En ce qui concerne le marquage de l'actine, une étape supplémentaire est nécessaire. En effet, l'actine a été mise en évidence par la Phalloïdine-tetramethylrhodamine B isothiocyanate qui se lie spécifiquement aux filaments d'actine et émet une couleur rouge. Pour cela, avant le premier anticorps, les cellules sont incubées avec 1µl/ml de phalloïdine pendant 30 minutes à température ambiante.

Les images des cellules ont été réalisées sur un microscope confocal (Zeiss). Les fluorochromes verts (excitation à 488 nm) sont excités par un laser Argon alors que les fluorochromes rouge (excitation 546 nm) sont excités par un laser Hélium-Néon. La lumière est transmise à l'échantillon par le biais d'une fibre optique puis d'un miroir dichroïque.

Le système de mesure est un microscope confocal de type Zeiss LSM 510. Celui-ci est composé d'un microscope inversé doté d'objectifs à immersion 40x (O.N=1,3) et 60x (O.N=1,4) associés à une unité contrôlant les lasers (unité confocale Zeiss). Les signaux sont traités à l'aide d'un logiciel spécifique (AIM 3.2).

## VI.D. Immunohistochimie.

Les sections de peau humaine paraffinisées ont été obtenues par notre collaboration avec les services d'anatomopathologies du CHR de Lille. La peau a subi une fixation classique par le liquide de Bouin avant d'être inclus dans la paraffine. Le bloc a ensuite été débité en coupes de 2 à 5 µm d'épaisseur et chaque coupe a été placée sur une lame porte-objet.

L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes) implique son élimination préalablement à l'immunomarquage. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % à 30 %. Puis :

- Les coupes sont exposées à l'**eau oxygénée** 10 minutes à température ambiante afin de bloquer les peroxydases endogènes.

- Le démasquage des sites antigéniques est réalisé dans un **tampon citrate** (pH 6, 10mM) chauffé au bain-marie à 96°C pendant 15 minutes. La lame est rincée 3 fois 5 minutes au PBS.
- La coupe est incubée dans un **tampon de saturation** (PBS-gelatine + 0,05 % Triton-x100) pendant 1h à température ambiante.
- **L'anticorps primaire** est incubé à la concentration désirée dans un mélange de PBS/gélatine durant la nuit à 4°C.
- L'échantillon est lavé 3 fois 10 min avec du PBS/gélatine.
- **L'anticorps secondaire** (anti-IgG lapin ou anti-IgG souris) couplé à une peroxydase est incubé à la concentration d'utilisation pendant 2 h à température ambiante.
- On lave 3 fois durant 10 min avec du PBS/gélatine.
- La révélation s'effectue au **DAB** (diaminobenzidine, Sigma), entre 2 et 30 minutes à température ambiante.
- On lave 3 fois durant 10 min avec du PBS.
- Une lamelle est montée sur la lame avec du Mowiol.
- Les lames sont conservées à 4°C.

Les images des coupes ont été réalisées sur un microscope Zeiss Axioskope microscope à lumière transmise et les images analysées avec le programme Leica Image Manager software.

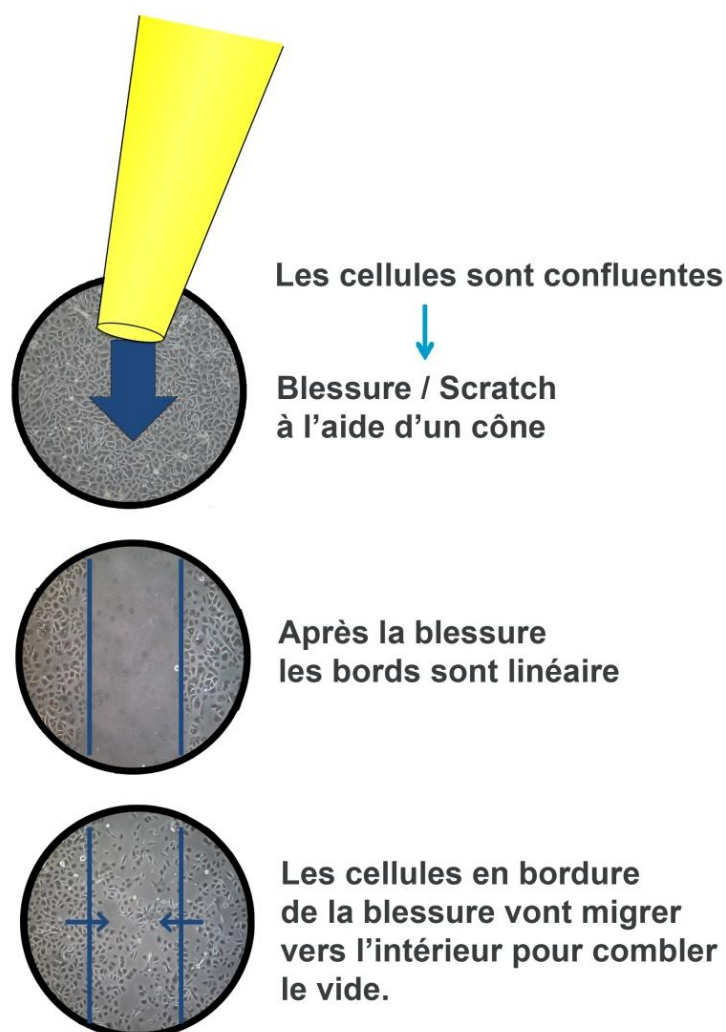
## VII. Test de migration

Lors de cette thèse, plusieurs techniques ont été utilisées afin d'étudier la migration des kératinocytes. Une technique d'observation directe : test de blessure, qui consiste à observer la fermeture progressive d'une « blessure », caractérisée par le grattage (« Scratch ») d'une bande de cellules dans une culture confluente. L'utilisation combinée d'un marqueur spécifique de la membrane plasmique et de la microscopie confocale permet de suivre les déplacements d'une cellule isolée au cours du temps, par cette technique nous mettons en évidence la migration polarisée des kératinocytes. La dernière technique étant celle du Transwell® ou chambre de Boyden, qui permet d'analyser la migration de cellules au travers d'un filtre microporeux.

## VII.A. Test de blessure ou “Wound healing assay”

Des kératinocytes sont maintenus en culture jusqu’à atteindre une monocouche confluente. A l’aide d’un cône pour micropipette, une bande de cellules est ensuite arrachée du support, constituant la « blessure ». Puis, le milieu de culture est changé pour laver les débris cellulaires. Les cellules sont ensuite replacées dans l’incubateur à 37°C dont l’atmosphère est enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules se trouvant sur les bordures de la blessure vont alors commencer à migrer vers l’espace libre pour la refermer, ce qui se rapproche d’un phénomène de cicatrisation ([figure 24](#)). L’évolution du processus de migration est suivie au microscope en prenant des photos à plusieurs endroits le long de la blessure à différents temps, le temps 0 correspondant au moment de la blessure. Dans le cas des cultures primaires de kératinocytes, dans des conditions contrôles, la blessure est complètement refermée au bout de 72 heures. Lors de l’utilisation de siRNAs, la blessure est effectuée 24h après leur transfection. En revanche, les agents pharmacologiques sont appliqués au temps 0.

## TEST DE BLESSURE / WOUND HEALING ASSAY



**Figure 24 :**

Représentation schématique du protocole de blessure des cellules en culture.

### VII.B. Etude de la migration polarisée par marquage de la membrane

Cette technique a pour but de suivre les déplacements d'une ou d'un groupe de cellules à l'aide d'un microscope confocale. Pour cela, les cellules sont cultivées sur des boîtes avec un fond en verre. Le jour de la manipulation, le marquage de la membrane plasmique est réalisé à l'aide d'une sonde spécifique : CellMask™ Orange. C'est une molécule amphiphile, présentant une partie lipophile pour une bonne charge des cellules et une partie hydrophile chargée négativement pour un « ancrage » à la membrane plasmique.

Le protocole consiste à mettre les cellules en contact avec une solution de CellMask™ Orange préparée à une concentration de 5µM dans du milieu K-SFM supplémenté pendant 10 minutes à 37°C. L'excès de sonde est ensuite lavé avec une solution HBSS, 3 fois 5 minutes, puis les images x-y des cellules fluorescentes sont acquises en utilisant un microscope confocale Zeiss LSM 510. La fluorescence est excitée à 543 nm avec un laser HeNe et capturée au-dessus de 585 nm. Après avoir sélectionné une cellule isolée ou un groupe de cellule, une image est prise toutes les 36 secondes pendant 1 heure.

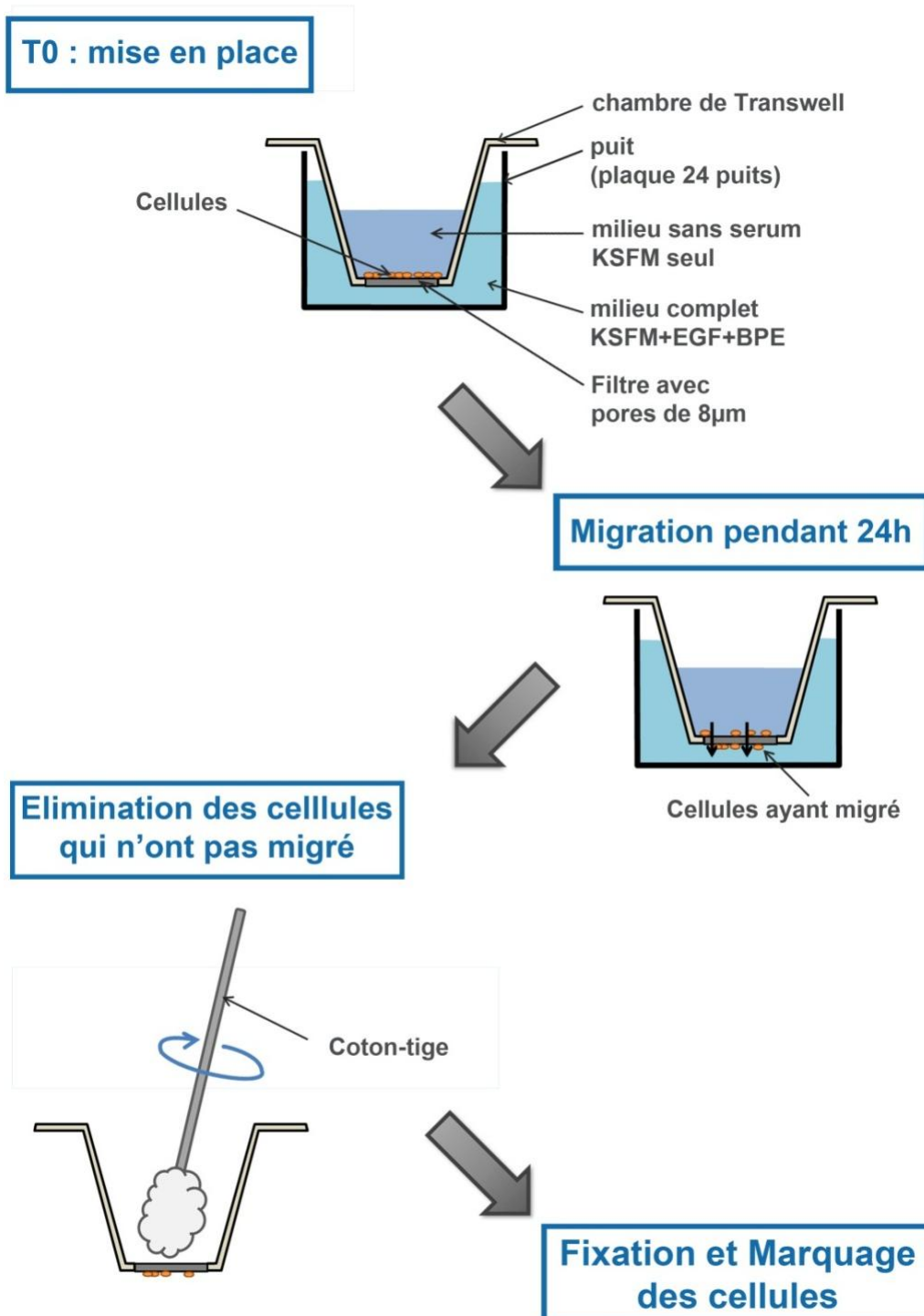
## VII.C. Transwell®

Après trypsinisation et comptage, 20.000 cellules sont déposées directement sur les inserts, qui reposent dans les puits de notre plaque 24 puits. Le fond de chaque insert est composé d'une membrane contenant des pores de 8 µm, ainsi le but de cette expérience sera d'analyser le nombre de cellules ayant traversé ces pores. Pour favoriser la progression des cellules à travers le filtre, le milieu contenu dans l'insert où se trouvent les cellules au départ n'est pas complété, il s'agit d'un milieu K-SFM seul. A l'inverse, le milieu contenu dans le puits, donc de l'autre côté du filtre, est un milieu K-SFM auquel est ajouté 5 ng/ml d'EGF et 50 µg/ml de BPE.

Les cellules vont ensuite migrer pendant 24 heures à 37°C. Puis, après avoir lavé les inserts dans du PBS, les cellules se trouvant sur la face supérieur du filtre vont être gratté à l'aide d'un coton-tige. Les inserts sont ensuite passés dans une solution de méthanol pendant 20 minutes à 4°C pour la fixation des cellules ayant migré, se trouvant donc sur la face inférieure de la membrane. Les inserts sont de-nouveau lavé au PBS, pour ensuite être transféré dans une solution de Hoechst, un intercalant de l'ADN qui permet de marquer les cellules, pendant 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité. ([figure 25](#))

Les filtres de chaque insert sont ensuite découpés, détachés de leur support et placés entre lame et lamelle de verre pour leur observation au microscope. Un microscope a fluorescence munit d'un filtre UV est utilisé pour compter toute les cellules se trouvant sur notre membrane

# TECHNIQUE DE TRANSWELL®



**Figure 25** : Procédure expérimentale de la technique de Transwell®

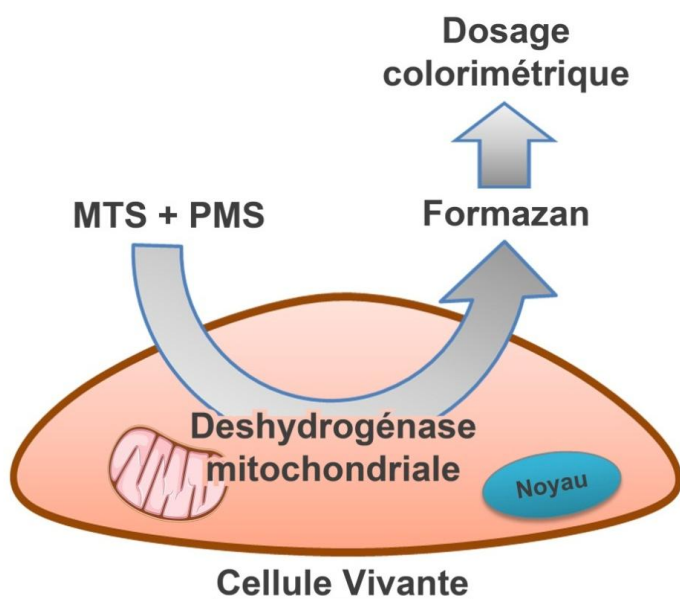


## VIII. Test de viabilité

Le kit de mesure de viabilité utilisé (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega) est une méthode colorimétrique qui détermine le nombre de cellules viables en mesurant une activité enzymatique mitochondriale. Lorsque l'apoptose est stable entre deux conditions, ce kit permet d'estimer la prolifération des cellules.

Le kit est composé du MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Le MTS est réduit par les cellules en formazan, soluble dans le milieu de culture. La conversion du MTS en formazan est réalisée par des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives ([figure 26](#)). La quantité de formazan produite, mesurée par son absorbance à 490 nm, est directement proportionnelle à l'activité des déshydrogénases des cellules vivantes et donc au nombre de cellules viables en culture. L'analyse statistique des résultats de prolifération est effectuée avec le test de Dunnet grâce au logiciel GraphPad Instat™ (GraphPad Software, V2.04), en considérant  $p < 0,01$  comme significatif.

### TEST COLORIMETRIQUE DE VIABILITE CELLULAIRE



**Figure 26 :**

Schéma représentant le principe général du test de viabilité cellulaire MTS.

# RESULTATS

*“The true delight is in the finding out rather than in the knowing.”*

**Isaac Asimov**

Les résultats obtenues au cours de ces quatre années seront présentés sous forme d'articles scientifiques (publiés, soumis à la publication ou en préparation) ou sous forme de résultats préliminaires.

Ils seront exposés en deux chapitres :

**Chapitre I :**

**Rôles d'Orai1 et de STIM1 dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain**

**Chapitre II :**

**Le rôle des canaux SOC et du canal TRPV6 dans les entrées de Ca<sup>2+</sup> lors de l'induction de la différenciation des kératinocytes humains.**

# I. Rôles d'Orai1 et de STIM1 dans l'homéostasie de l'épiderme humain

## Article 1

”Orai1 in skin homeostasis: role in keratinocyte polarized migration”

**Matthieu Vandenberghe**<sup>\*</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>\*</sup>, Maylis Raphaël, Dimitri Gordienko, Thierry Oddos, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

Article en préparation

\* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

La structure de l'épiderme est le résultat de la régulation de l'équilibre entre la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes. Le calcium est un élément majeur dans la régulation de ces trois mécanismes. L'identification de la nature moléculaire des protéines impliquées dans le signal calcique se révèle donc très importante pour la compréhension de ces mécanismes.

Récemment, il a été montré que des souris knock-out pour le gène *orai1* présentaient une peau plus fine, s'accompagnant d'une diminution et d'un allongement des kératinocytes (168). ORAI1 est un canal cationique initialement découvert dans les lymphocytes T. Il participe dans de nombreux types cellulaires à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  appelée SOCE (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry). Ces données suggèrent que le canal Orai1 aurait un rôle dans le développement de l'épiderme.

Le but de cette étude est de déterminer le rôle d'ORAI1 dans l'homéostasie tissulaire de la peau humaine, à savoir, son implication dans les processus de différenciation, de prolifération et de migration des kératinocytes.

## Conclusion

**Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que le canal Orai1 et la protéine STIM1 sont exprimés et fonctionnels dans les kératinocytes humains. Ces partenaires interviennent dans le courant de type SOC enregistré dans les kératinocytes non différenciés.**

**D'autre part, nous mettons en évidence qu'Orai1 est principalement impliqué dans la prolifération et la migration de ces cellules et l'inhibition de son expression peut induire leur différenciation. La suite de cette étude montre qu'Orai1 est impliqué dans la migration des kératinocytes induite par l'EGF et participe à la phosphorylation de FAK. Ainsi le canal Orai1 intervient dans la dynamique des adhésions focales et au déplacement polarisé des kératinocytes.**

## ORAI1 IN SKIN HOMEOSTASIS: ROLE IN KERATINOCYTE POLARIZED MIGRATION

Matthieu Vandenberghe<sup>1\*</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>1\*</sup>, Maylis Raphaël<sup>1</sup>, Dimitri Gordienko<sup>1,2,3</sup>, Thierry Oddos<sup>4</sup>, Roman Skryma<sup>1#</sup> & Natalia Prevarskaya<sup>1#§</sup>

<sup>1</sup> - Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, University of Sciences and Technologies of Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup> - Laboratory of Molecular Pharmacology and Biophysics of Cell Signalling, Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev, Ukraine

<sup>3</sup> - State Key Laboratory of Molecular and Cell Biology, Kiev, Ukraine

<sup>4</sup> - Research and Development Department, Etablissement de Val de Reuil, Campus de Maigremont, 27100 Val de Reuil, France

\* - contributed equally to the paper

# - shared senior authorship

§ - Corresponding author:

Prof. Natalia Prevarskaya

Laboratory of Cell Physiology

INSERM U1003

University of Sciences and Technologies of Lille

59650 Villeneuve d'Ascq

France

Tel : +33 3 20 33 60 18

Fax : + 33 3 20 43 40 66

e-mail : [natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr](mailto:natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr)

web : [www.phycell.univ-lille1.fr](http://www.phycell.univ-lille1.fr)

## **Abstract**

We have identified in human epidermis a recently-discovered protein Orai1 which represents the major molecular component of endogenous store operated calcium entry (SOCE) in various human cells and constitutes the principal source of calcium influx used by the cell. The expression of Orai1 protein is predominantly confined to the basal layer of human epidermis and decreases towards the upper layer, the stratum corneum. The suppression of Orai1 expression *in vitro* inhibits proliferation and migration, and induces differentiation of keratinocytes which is in accordance with the existing Orai1 KO model. Orai1 channel is a principal player of endogenous SOCE in human keratinocytes following the calcium depletion of endoplasmic reticulum induced by EGF and this SOCE is substantially decreased in differentiated human keratinocytes. Proliferation and migration of undifferentiated human keratinocytes stimulated by EGF is significantly mediated by Orai1 via SOCE triggering the phosphorylation of Focal Adhesion Kinase (FAK). Orai1 channel is involved in focal adhesion turnover as well as in polarized motility via the phosphorylation of (pFAK<sup>397</sup>) protein, association of pFAK<sup>397</sup> and paxillin with actin filaments, and activation of calcium-dependent protease calpain. Therefore, Orai1 channel is crucial to the skin homeostasis being an important player in the control of keratinocytes migration, proliferation, and induction of differentiation.

## Introduction

The involvement of calcium-dependent mechanisms in the induction and regulation of keratinocytes proliferation, migration, and differentiation is now well established (1-3). Keratinocytes are arranged in highly organized, specialized layers according to their functions and the programmed life cycle. Proliferating keratinocytes comprise the stratum basale. As a result of proliferation, keratinocytes leave the stratum basale, moving toward the exterior with the onset of differentiation in the stratum spinosum. Differentiation is completed in the stratum granulosum, thereby constituting the enucleated stratum corneum, which plays the major role of permeability barrier. Whereas human keratinocytes are best suited at low calcium (<0.5 mM) to retain proliferative activity, at higher concentrations of calcium suppresses proliferation and leads to the expression of cytokeratins and other markers of differentiation (1-2, 4).

In human skin cell motility and differentiation in the epidermis follow the vertical pathway, giving rise to characteristic columns of migrating cells (5). Basal cell proliferation is appreciably higher and inversely correlated with the calcium gradient and compressed stratum corneum of mature corneocytes reflecting the importance of calcium signalling in differentiation (3). In the case of skin injury, expected disturbances in calcium gradients are consistent with increased lateral or oblique keratinocytes migration leading to a reconstruction of epidermis mass and re-epithelialization of wound sites (6-7). Cellular responses in the wound healing cascade were suggested to be associated with changes in extracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_o$ ), calcium influx into the keratinocytes ( $[Ca^{2+}]_i$ ), and by a redistribution of calcium within the cell (8). Though the central role of calcium in diverse cell processes including cell migration and motility is well established (9), the regulation of  $[Ca^{2+}]_i$  during keratinocytes migration as well as its control by calcium-permeable channels is completely obscure. Despite the recent discovery of some calcium-permeable channels contributing to calcium influx (10) and some of them having the important role in differentiation (11-12), nothing is known so far as to the calcium-permeable channels involved in keratinocyte migration and polarized motility.

During recent years a new molecular candidate for store-operated calcium entry (SOCE) termed Orai1 has been identified and characterized (13-14). Orai1 mediates calcium-release activated currents and SOCE in a large variety of cells and is involved in a wide range of cell functions including endothelial cells proliferation (15), lymphocyte proliferation (16), mast



cells activation (17), as well as skeletal muscle development and a contractile function (18). However, despite suggested pivotal role of Orai1 and SOCE in various biological processes, the involvement of Orai1 in keratinocytes-specific SOCE, as well as its role in keratinocytes physiology has never been studied. Finally, the phenotypic features of the homozygous *Orai1*<sup>-/-</sup> mice showing the sporadic hair loss resembling the cyclical alopecia, thinner epidermis with lower cell density and narrower follicles (19), allow to suggest the important role of Orai1 channel for the skin homeostasis which is the aim of present studies.

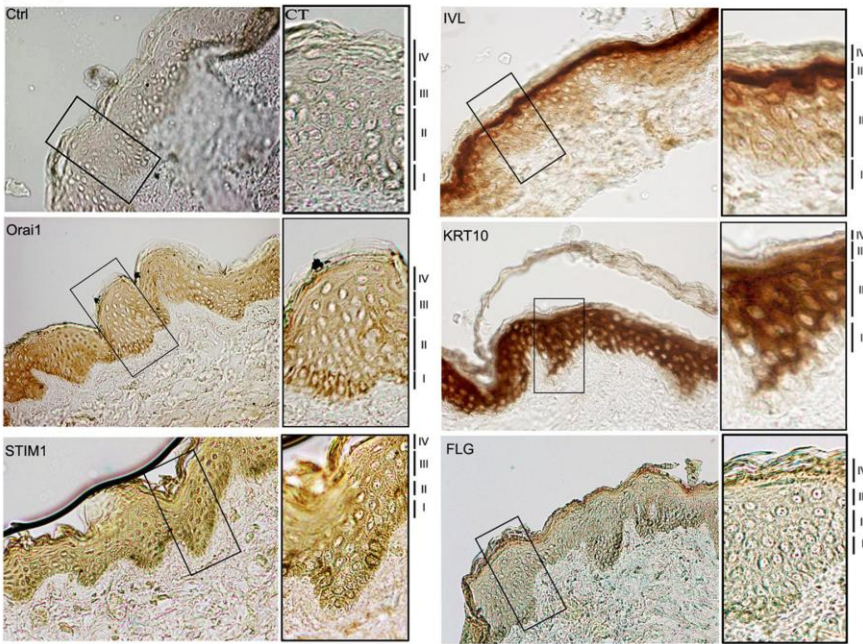
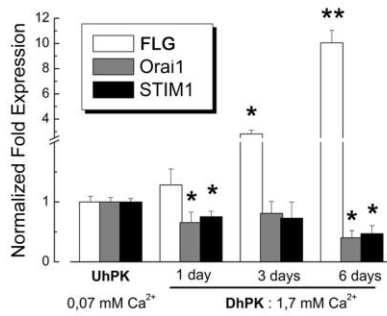
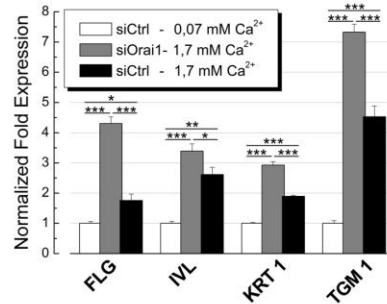
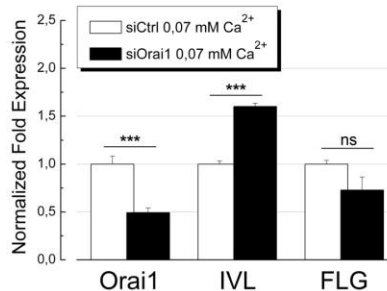
## Results

### *Orai1 protein is mostly expressed in stratum basale and diminishes during differentiation*

We have firstly studied the expression of Orai1 protein in human skin sections (Fig. 1). Immunohistochemical studies showed that the Orai1 protein is mostly expressed in stratum basale of human epidermis with its slight presence in upper layers of the skin (Fig. 1A). The same tendency was observed for the STIM1 protein which was also predominantly expressed in basal layers. In contrast to these, the staining of early differentiation markers as IVL and KRT10 showed its pattern of expression with the increasing gradient towards upper layers as stratum spinosum, granulosum. The late differentiation marker as FLG is mainly expressed in the most superficial layer of the epidermis: stratum corneum (Fig. 1A). Hence, the expression of Orai1 and STIM1 proteins is mostly confined to the basal layer of skin though according to immunohistochemical data their expression is still conserved in the upper layers of epidermis.

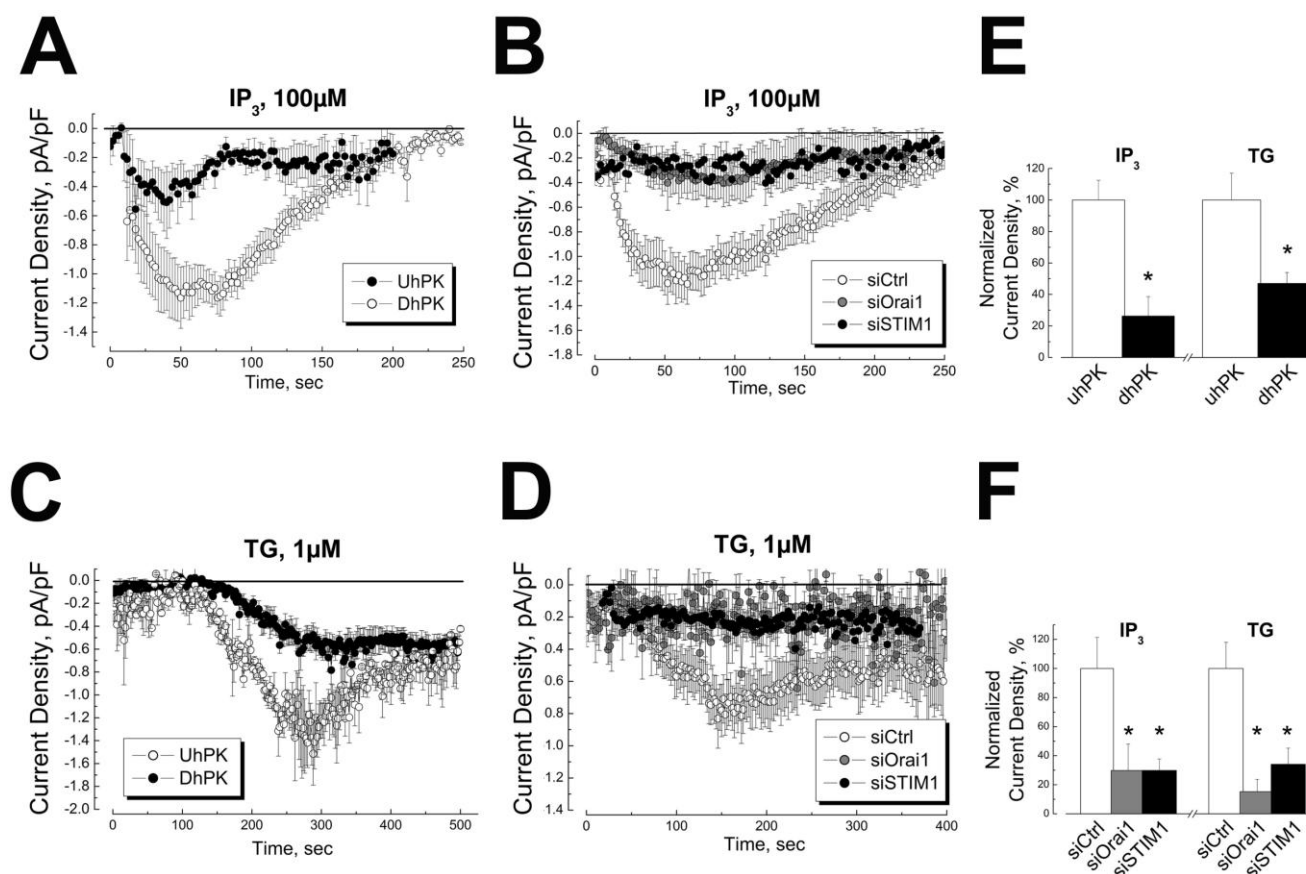
To confirm the immunohistochemical studies, we have studied the expression of Orai1, STIM1, and FLG as a late differentiation marker in human primary keratinocytes (hPK) using real-time quantitative PCR (Fig. 1B). Quantification of the protein transcripts from 3 independent experiments showing the expression levels of Orai1, STIM1, and FLG in hPK kept in 0.07 mM of  $\text{Ca}^{2+}$  (UhPK), or hPK cells treated with 1.7 mM  $\text{Ca}^{2+}$  during 1, 3, or 6 days (DhPK) is indicated in Fig. 1B. The expression data for Orai1, STIM1, and FLG confirmed those of immunohistochemical studies indicating the downregulation of these proteins during the differentiation process in contrast to the FLG which expression increases during differentiation.

To study the role of Orai1 in calcium-induced differentiation of hPK we employed a so called  $\text{Ca}^{2+}$ -switch protocol. The aim was to see whether the knockdown of Orai1 protein may influence the onset of keratinocytes differentiation. Thus, the cells are pre-transfected with the Orai1-specific siRNA tested preliminary as shown in supplementary Fig. 1. In 24 hours 1.7 mM  $\text{Ca}^{2+}$  is added to UhPK to trigger differentiation for additional 24 hours. The control hPK cells kept in 0.07 mM of  $\text{Ca}^{2+}$  and control hPK cells with the induced  $\text{Ca}^{2+}$ -switch were transfected with siCtrl. The pretransfection of hPK cells with siOrai1 has significantly induced the expression of differentiation markers as KRT1, IVL, TGM1, and even FLG which was superior to the extent of  $\text{Ca}^{2+}$ -switch itself (Fig. 1C). These data strongly indicate the important role of Orai1 in the process of keratinocyte differentiation.

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

**Fig. 1,** Expression of Orai1, STIM1, and differentiation markers in human skin. **A,** immunohistochemical studies for the expression of Orai1, STIM1, IVL, KRT10, and FLG in human skin sections. Small black box corresponds to the magnified skin area. Roman numbers correspond to: I – stratum basale; II – stratum spinosum; III – stratum granulosum; IV – stratum corneum. **B,** real time quantitative PCR from 3 independent experiments showing the expression levels of Orai1, STIM1, and FLG in hPK kept in 0.07 mM of Ca<sup>2+</sup> (UhPK), or hPK cells treated with 1.7 mM Ca<sup>2+</sup> during 1, 3, or 6 days (DhPK). Data were normalized as compared to HPRT gene expression. Data represented are Mean ± SEM, \* - P<0.05; \*\* - P<0.01, N=3. **C,** the effects of Orai1 knockdown on the expression of FLG, IVL, KRT1, TGM1 transcripts induced by calcium switch (1.7 mM of Ca<sup>2+</sup>, 24 hours). Data were normalized as compared to HPRT gene expression. Data represented are Mean ± SEM, \* - P<0.05; \*\* - P<0.01; \*\*\* - P<0.001; N=3. **D,** The expression of IVL and FLG in hPK kept in 0.07 mM of Ca<sup>2+</sup> induced by Orai1 knockdown. Data were normalized as compared to HPRT gene expression. Data represented are Mean ± SEM, \*\*\* - P<0.001; N=3.

Since the previous experiment suggested the probable negative role of Orai1 in differentiation we tended to see whether the knockdown of Orai1 protein in the low  $\text{Ca}^{2+}$ -solution (UhPK) is able to trigger differentiation *per se*. The pretransfection of UhPK cells with siOrai1 in 0.07 mM of  $\text{Ca}^{2+}$  has slightly but significantly increased the expression of early differentiation marker IVL while the expression of late differentiation marker FLG rested unchanged confirming the crucial role of calcium in differentiation process.



**Fig. 2,** Store-operated current in human primary keratinocytes. **A** and **C**, representative time courses of I<sub>SOC</sub> development (current density, measured at -100 mV holding potential) in UhPK cells (white circles, kept in 0.07 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) and DhPK cells (black circles, kept in 1.7 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) in response to the dialysis of 100  $\mu\text{M}$  IP<sub>3</sub> (**A**) or 1  $\mu\text{M}$  TG (**C**). **B** and **D**, representative time courses of I<sub>SOC</sub> development (current density, measured at -100 mV holding potential) in UhPK cells (kept in 0.07 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) pretreated with siRNA against Orai1 (grey circles), STIM1 (black circles), compared to siCtrl (white circles) in response to the dialysis of 100  $\mu\text{M}$  IP<sub>3</sub> (**B**) or 1  $\mu\text{M}$  TG (**D**). **E**, quantification of the maximum amplitude of IP<sub>3</sub>- and TG-induced I<sub>SOC</sub> densities in UhPK cells (white column, kept in 0.07 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) and DhPK cells (black column, kept in 1.7 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). Data shown is normalized Mean  $\pm$  SEM, \* - P<0.05; n=32 for each condition. **F**, quantification of the maximum amplitude of IP<sub>3</sub>- and TG-induced I<sub>SOC</sub> densities in UhPK cells (kept in 0.07 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) pretreated with siRNA against Orai1 (grey columns), STIM1 (black columns), compared to siCtrl (white columns). Data

### *Orai1 is a main component of the store-operated current in human keratinocytes*

The entry of calcium through the plasma membrane into the cytoplasm  $[Ca^{2+}]_i$  in response to the decrease in calcium content of endoplasmic reticulum  $[Ca^{2+}]_{ER}$  has been studied (Fig. 2). Depletion of endoplasmic reticulum (ER) stores via activation of IP<sub>3</sub>-receptors or by inhibition of ER SERCA pump with thapsigargin (TG) induced a significant store-operated calcium entry (SOCE) in UhPK as compared to DhPK (Fig. 2A and C, respectively). The normalized quantification of this SOCE is given in Fig. 2E. This entry, induced either by IP<sub>3</sub> or TG, has been successfully blocked by inhibition of Orai1 channel and STIM1 protein using the transfection of UhPK with the respective siRNAs against these proteins (Fig. 2B and D). The quantification histogram of this SOCE inhibition is shown in Fig. 2F. We can conclude that Orai1 channel and STIM1 proteins are main components of SOCE in human keratinocytes and this SOCE is significantly downregulated in DhPK.

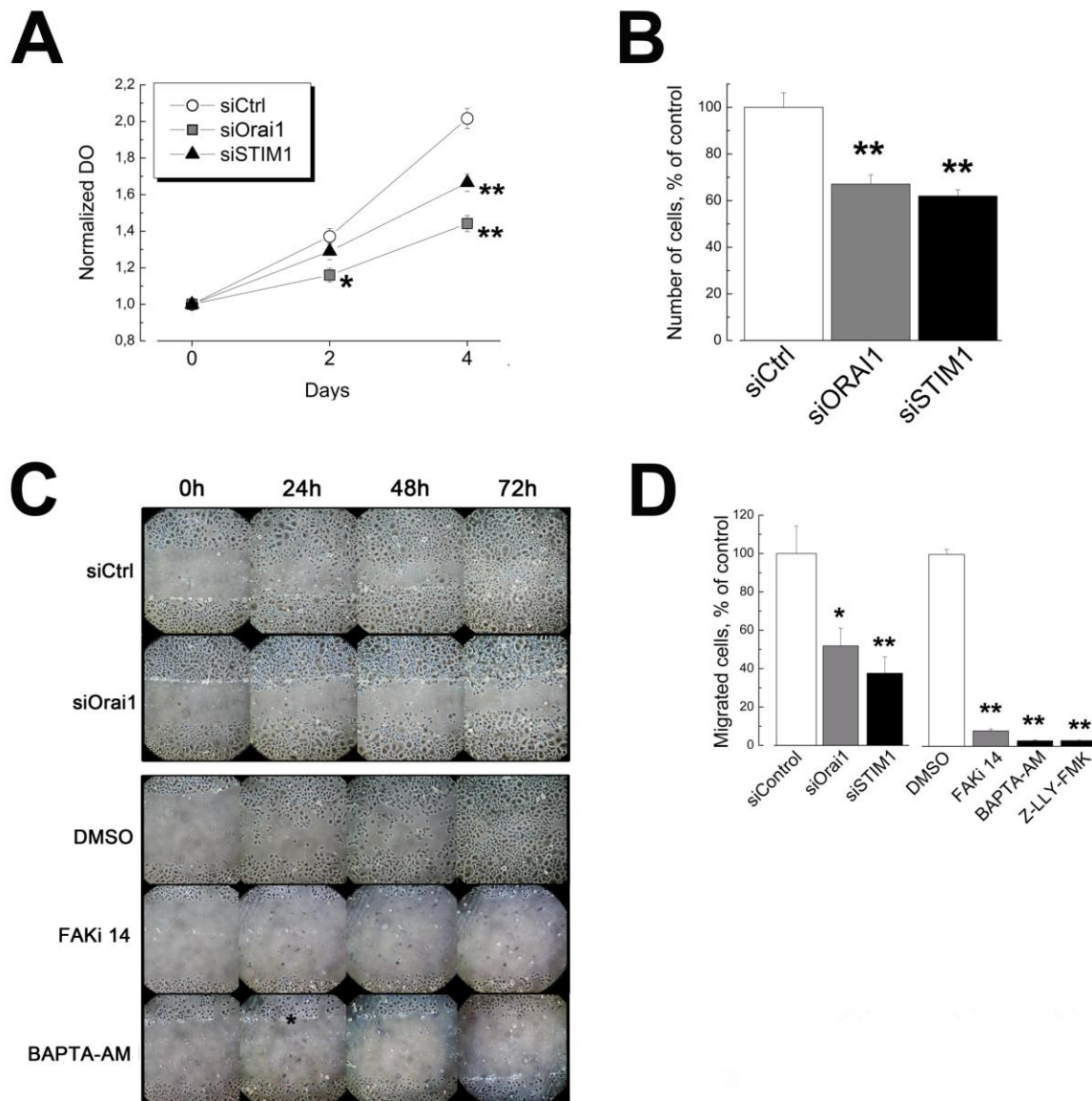
### *Orai1 channel is involved in proliferation and migration of UhPK*

Having discovered the expression and the role of Orai1 channel in SOCE of UhPK corresponding to undifferentiated keratinocytes we have sought to study its role in cell proliferation and migration, the characteristic features of keratinocytes derived from stratum basale. The indirect colorimetric cell viability assay (MTS) showed a strong inhibition of UhPK proliferation by the extinction of both Orai1 and STIM1 proteins (Fig. 3A). These data were confirmed by the direct cell counting following 48 hours of cell transfections with siRNA against Orai1 and STIM1 (Fig. 3B).

The other issue as cell migration was addressed. We have used two methods: wound healing and Transwell™ assays. The downregulation of Orai1 protein by siRNA has decreased UhPK cell ability to migrate and to “heal the wound” (Fig. 3C, upper panel). In the other series of experiments we inhibited the Focal Adhesion Kinase (FAK) with 10 μM of FAKi 14 inhibitor for indicated period of time (Fig. 3C, lower panel). This inhibition has arrested the cell migration. To have an insight whether the intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) may take a role we blocked the  $[Ca^{2+}]_i$  with the cell permeable  $Ca^{2+}$ -chelator BAPTA-AM (50 μM). The effect of chelating  $[Ca^{2+}]_i$  was also prominent and arrested hPK cell migration in the time scale of three days (Fig. 3C, lower panel). Thus, Orai1 as well as  $[Ca^{2+}]_i$  are extremely important for hPK cell migration.

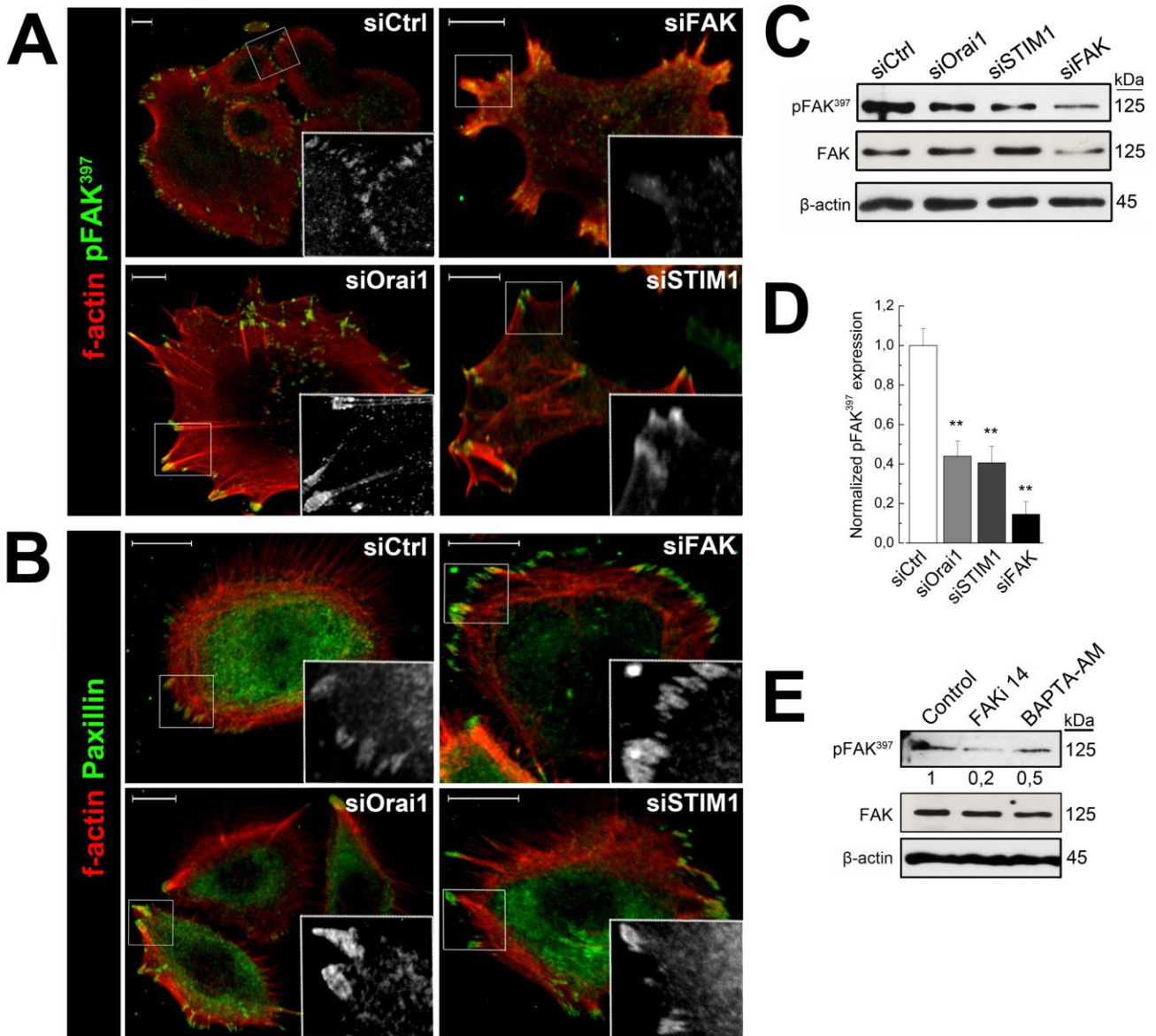
The use of Transwell™ assay allows to distinguish proliferating and migrating cells. This assay showed a significant inhibition of UhPK migration to the lower chamber of Transwell™

system when Orai1, and STIM1 proteins are downregulated (Fig. 3D). The same effects were observed when Orai1 was inhibited by FAKi 14, or  $[Ca^{2+}]_i$  is chelated by BAPTA-AM. In addition, a specific inhibitor of calcium-dependent protease calpain, well-known to cleave FAK, at 10  $\mu$ M has successfully blocked hPK migration confirming its important role in focal adhesion turnover. Thus, Orai1 as well as calcium is strongly involved in UhPK cell migration.



**Fig. 3,** The role of Orai1 and STIM1 in proliferation and migration of human keratinocytes. **A**, a time-course of UhPK cells (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) growth revealed by indirect colorimetric MTS assay reflecting the number of viable cells. Cells were transfected with siRNA against Orai1 (grey squares), STIM1 (black triangles), as compared to siCtrl (white circles). Data represented are Mean  $\pm$  SEM, \* -  $P < 0.05$ ; \*\* -  $P < 0.01$ ,  $N = 3$ . **B**, relative cell number of UhPK (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) cells after 48 hours of transfection with siRNA against Orai1 (grey columns), STIM1 (black columns), compared to siCtrl (white columns). Data represented are Mean  $\pm$  SEM, \*\* -  $P < 0.01$ ,  $N = 3$ . **C**, a representative experiment of three independent experiments of wound-healing assay of UhPK (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) cells transfected for 24 hours with siRNA against Orai1 versus siCtrl (upper panel), and UhPK cells treated with DMSO, 10  $\mu$ M FAKi 14, and 50  $\mu$ M BAPTA-AM for the indicated period of time (lower panel). Pictures were taken every 24 hours during three days. **D**, cells migration assay using Transwell™ chambers of UhPK (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) cells transfected with siRNA against Orai1, STIM1 versus siCtrl as well as FAKi 14, BAPTA-AM, Z-LLY-FMK (10  $\mu$ M) versus DMSO. Cells were allowed to migrate for 24 hours from the time of transfection. Data shown are Mean  $\pm$  SEM, \* -  $P < 0.05$ ; \*\* -  $P < 0.01$ ,  $N = 3$  done in quadruplicates.





**Fig. 4,** Involvement of Orai1 and STIM1 in focal adhesion turnover. Immunostaining of f-actin (red) and pFAK (green, **A**) or paxillin (green, **B**) of UhPK cells (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>). UhPK cells were transfected with siOrai1, siSTIM1, siFAK, and siCtrl for 24 hours prior to fixation. Small white boxes correspond to the magnified area of the image where pFAK (**A**) or paxillin (**B**) are shown in grey scale. White scale bars correspond to 10 μm. **C**, an immunoblotting showing the level of phosphorylation of FAK<sup>397</sup> as compared to overall FAK in UhPK cells treated with siRNA against siOrai1 and siSTIM1. siFAK has been used as a positive control. **D**, a quantification histogram of FAK<sup>397</sup> phosphorylation in UhPK cells (a representative immunoblotting is shown in **C**). Data represented are Mean ± SEM, \*\* - P<0.01, N=3. **E**, the phosphorylation of FAK<sup>397</sup> in UhPK cells treated with FAKi 14 and BAPTA-AM, DMSO was used as a control. N=2.

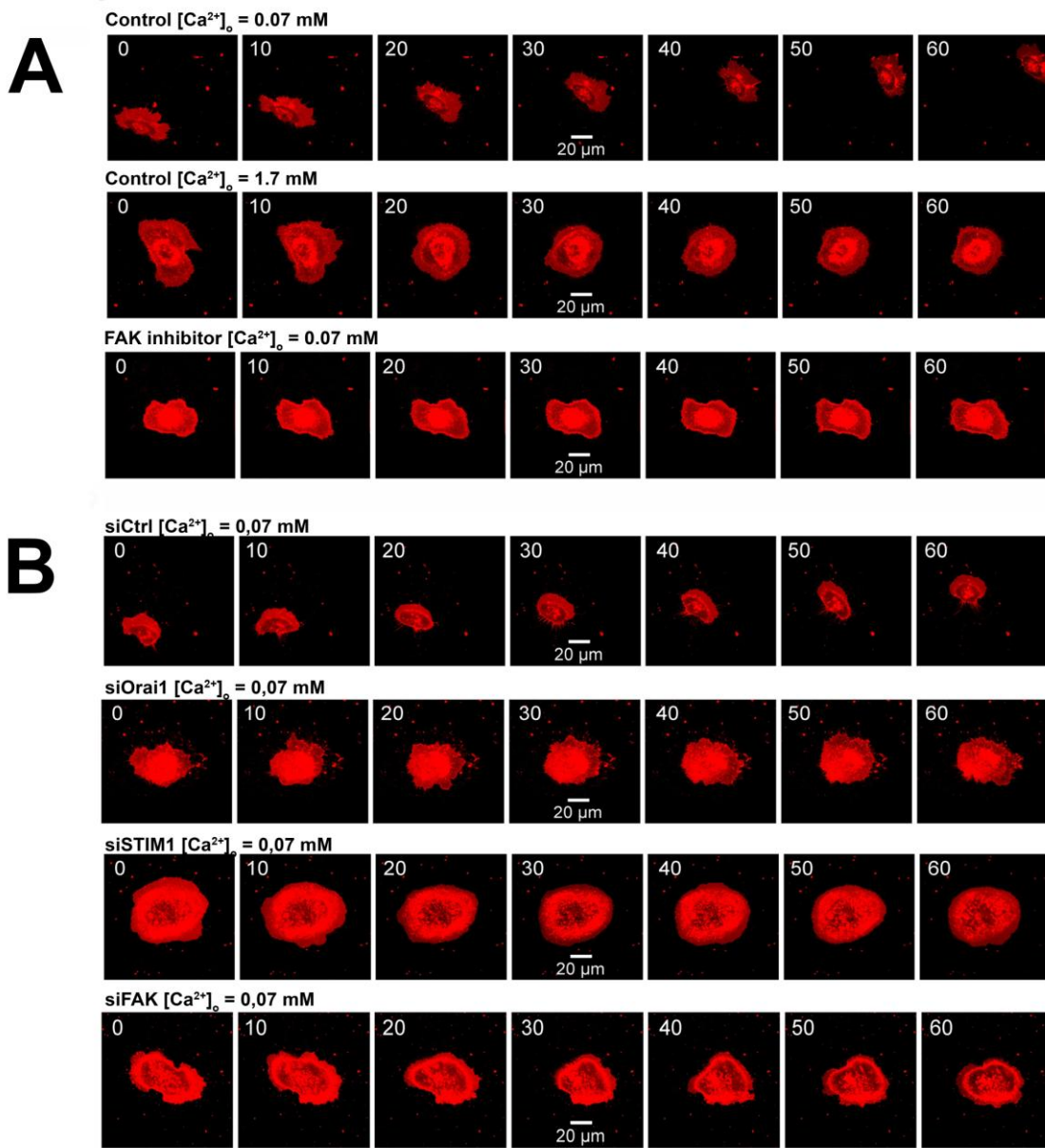


### *Orai1 and STIM1 regulate focal adhesion turnover and UhpK polarized motility*

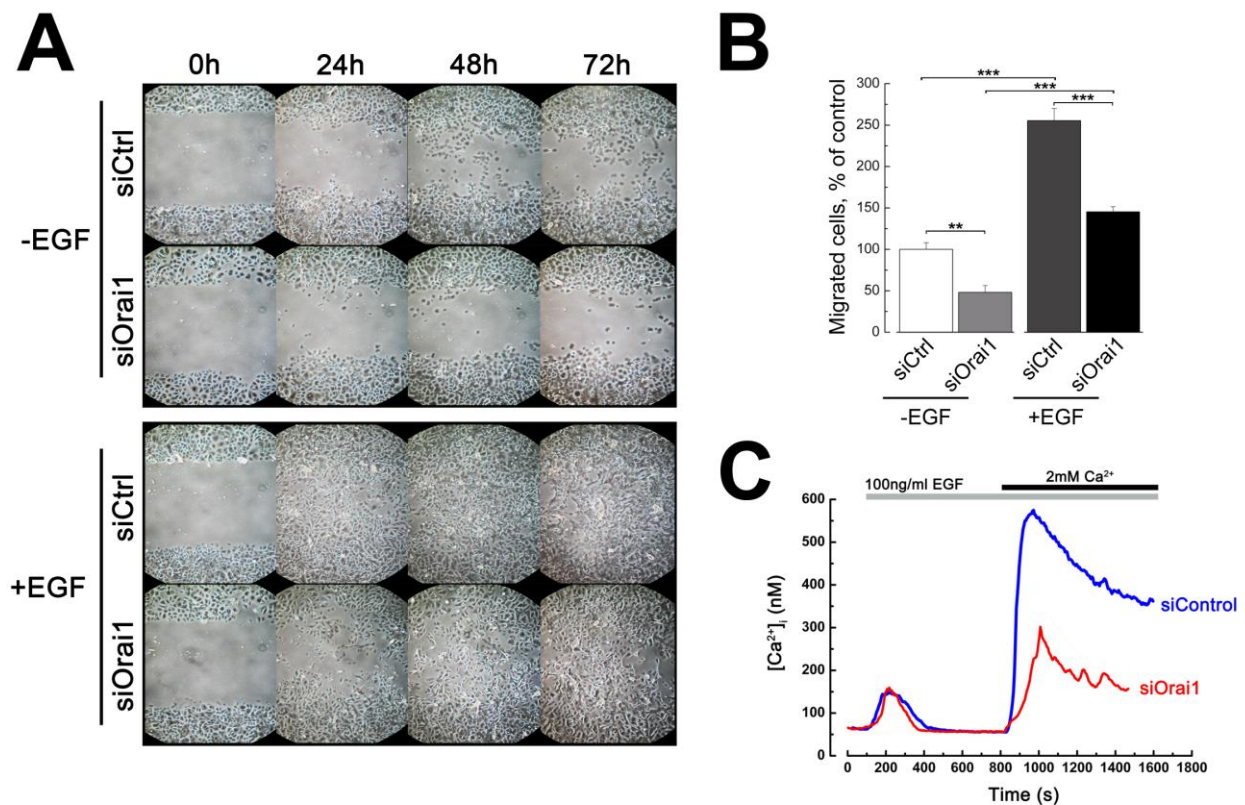
The reorganisation of cell cytoskeleton is necessary to exercise cell movement in space. As a part of this complex process the formation and disassembly of focal adhesion contacts is a prerequisite for the dynamics of this process. The turnover of these focal adhesions has been monitored using confocal microscopy (Fig. 4). Two proteins crucial for the cell movement, a phosphorylated form (at tyrosin residue 397) of the Focal Adhesion Kinase (pFAK) and paxillin were stained together with f-actin, a polymerized form of G-actin. The knockdown of Orai1 and STIM1 proteins provoked the aggregation of pFAK<sup>397</sup> protein, inhibited focal adhesion contacts turnover as well as stimulated stress fibres formation as compared to a total extinction of focal adhesion contacts when FAK protein was inhibited by siRNA (Fig. 4A). The other protein important for focal adhesion contacts formation, paxillin, has also been aggregated while Orai1 and FAK were knocked down together with the constricted cell morphology and stress fibre formation (Fig. 4B). These data demonstrate the important role of Orai1 and STIM1 in focal adhesion turnover crucial for cell migration.

We have further studied the level of FAK phosphorylation while monitoring the quantity of pFAK<sup>397</sup> protein (Fig. 4C). The independent knockdowns of both Orai1 and STIM1 have significantly diminished the quantity of pFAK<sup>397</sup> protein as compared to the total FAK protein (Fig. 4D). The efficiency of transfection was monitored using specific siRNA against FAK. Finally, we have checked whether the inhibition of FAK phosphorylation could have place while inhibiting FAK with its inhibitor 10  $\mu$ M FAKi 14 or by sequestering  $[Ca^{2+}]_i$  with the cell-permeable chelator BAPTA-AM. The level of pFAK<sup>397</sup> protein seemed to be affected by these agents which both decreased the quantity of pFAK<sup>397</sup> protein (Fig. 4E) while the total FAK was unchanged. Therefore, the phosphorylation of FAK is a downstream to Orai1, STIM1, and  $[Ca^{2+}]_i$  event important for focal adhesion turnover.

Since the focal adhesion turnover is necessary for keratinocytes migration we have studied the role of Orai1 and STIM1 in polarized motility of UhpK (Fig. 5). In the control experiments using confocal microscopy and hPK staining with CellMask™ we have shown that DhPK are void of polarized motility and cell migration in general. These effects were mimicked by the use of FAK inhibitor in UhpK (Fig. 5A). The successful knockdown of Orai1, STIM1, and FAK proteins in UhpK has completely arrested cell migration of UhpK implying the important role of these proteins in polarized motility of human keratinocytes (Fig. 5B). The real-time videos are available as supplementary data.



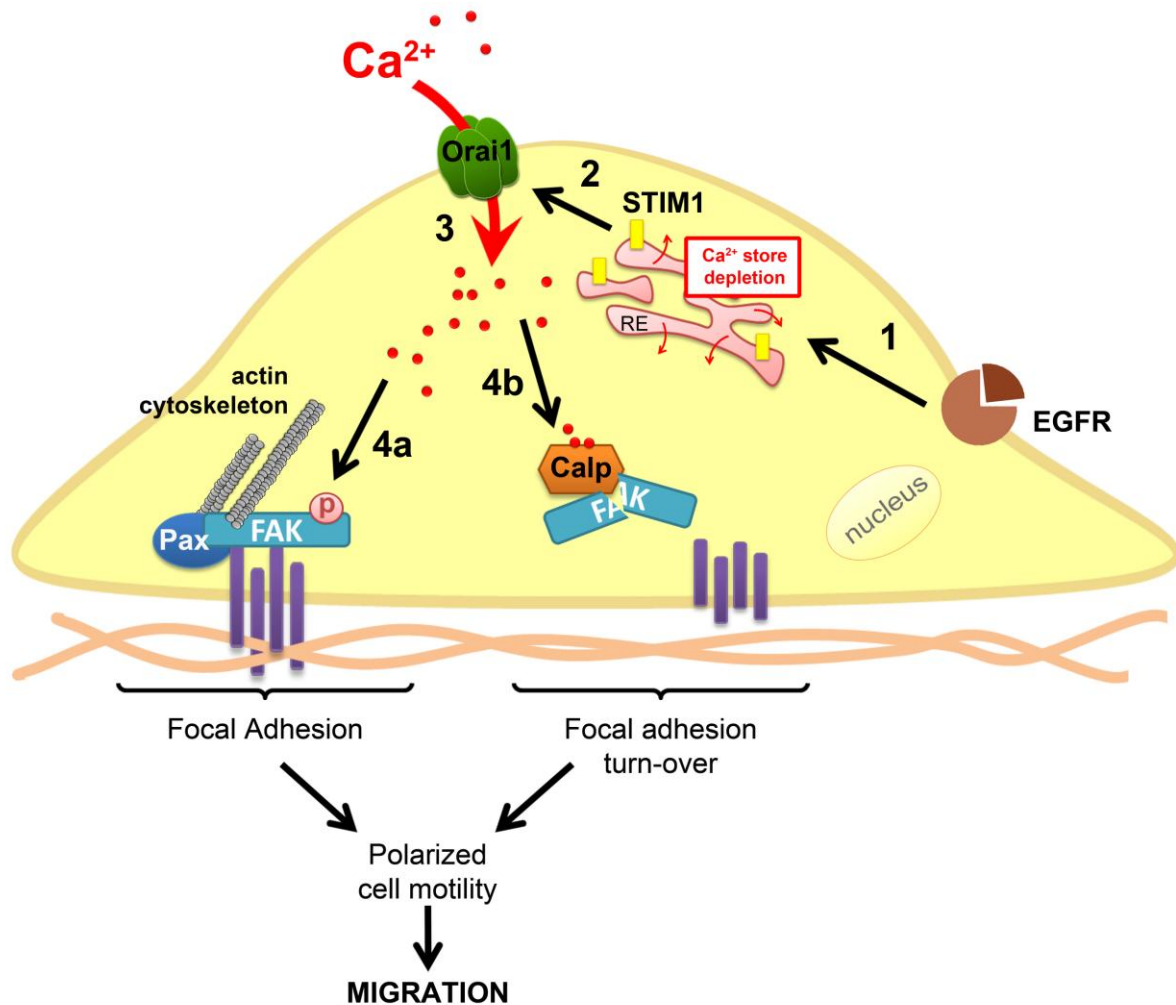
**Fig. 5,** Polarized motility of human keratinocytes affected by Orai1 and STIM1. The motility of hPK cells (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) was monitored during 1 hour using confocal microscopy imaging of the hPK cells stained with CellMask™ for 30 minutes. **A,** polarized motility of UhPK cells (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) and DhPK cells (kept in 1.7 mM  $Ca^{2+}$ ) as compared to UhPK cells pretreated with 10  $\mu$ M FAK inhibitor 14 for 30 minutes. **B,** polarized motility of UhPK cells (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) transfected with siRNA against Orai1, STIM1, and FAK versus siCtrl.



**Fig. 6.** Calcium influx via Orail activates FAK and triggers migration. **A**, a representative experiment of three independent experiments of wound-healing assay of UhPK (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>) cells treated with 100 ng/ml of EGF (+EGF) for the indicated time or without EGF (-EGF), and transfected with either siOrai1 or siCtrl. **B**, cells migration assay using Transwell™ chambers of UhPK (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>) treated with 100 ng/ml of EGF (+EGF) for the indicated time or without EGF (-EGF), and transfected with either siOrai1 or siCtrl. Cells were allowed to migrate for 24 hours. Data shown are Mean ± SEM, \*\* - P<0.01, \*\*\* - P<0.001; N=3 in quadruplicates. **C**, store-operated calcium entry in UhPK cells induced by 100 ng/ml EGF and partially blocked by siOrai1. A representative experiment of five independent experiments, n=30 cells per experiment.

To have an insight into the possible mechanisms leading to migration/polarized motility via Orail channel we have investigated the possible role of endothelial growth factor (EGF) signalling in activation of hPK cell migration. Our data show that EGF stimulates the migration in wound-healing assay while siOrai1 pretreatment of cells inhibits these effects (Fig. 6A). The same protocol has been performed in Transwell™ assay and the same data have been obtained (Fig. 6B), suggesting the pivotal role of EGF in keratinocytes migration and the important contribution of Orail channel in this pathway. In order to prove the role of

Orai1 protein in this signalling, the store-dependent calcium entry was studied. EGF by itself was capable of inducing SOCE since this SOCE induced by EGF was successfully inhibited by 10  $\mu$ M PLC inhibitor U73122 (see supplementary Fig. 1). This capacitive entry was significantly inhibited by siRNA against Orai1 suggesting the direct role of this channel EGF induced SOCE (Fig 6C). In the additional series of experiments we inhibited the expression of FAK with its respective siRNA and we had no difference in SOC current suggesting that FAK signalling is definitely downstream of Orai1 signalling (see supplementary Fig. 1).



**Fig. 7.** The role of Orai1 in keratinocytes polarized motility. The activation of EGFR (1) induces the depletion of calcium in endoplasmic reticulum and stimulates calcium sensor STIM1 (2), which, in turn, trans-activates Orai1 channel and induces store-operated calcium entry (3). This store-operated calcium entry will promote either the phosphorylation (4a) of Focal Adhesion Kinase (pFAK<sup>397</sup>) or its degradation by calpain protease (4b) enhancing focal adhesion turnover and thereby both stimulating polarized cell motility of human keratinocytes.

## Discussion

In the current study we report several major findings: 1) we have identified in human epidermis a recently-discovered protein Orai1 whose expression is predominantly confined to the basal layer of epidermis; 2) we have shown that Orai1 channel is a principal source of endogenous SOCE in human keratinocytes; 3) the suppression of Orai1 expression *in vitro* inhibits proliferation and migration, and induces differentiation of keratinocytes; 4) we have evidenced the involvement of Orai1 channel in keratinocytes polarized motility by enhancing focal adhesion turnover via pFAK<sup>397</sup> phosphorylation, association of pFAK<sup>397</sup> and paxillin with actin filaments, and probable activation of calcium-dependent protease calpain (Fig. 7).

In the present study we have shown that Orai1, as most likely pore-forming entity in the plasma membrane, and STIM1, as a signal transducer from the ER, represent the major molecular components of SOCE in human primary keratinocytes: siRNA-mediated knockout of any of them strongly diminishes  $I_{SOC}$  in keratinocytes. Though the translocation of STIM1 to the keratinocyte plasma membrane following agonist-induced calcium entry was already shown for HaCaT cells (20), the molecular mechanisms and the role of Orai1/STIM1 coupling remain obscure. Since Orai1 expression was found to decrease in differentiated cells following calcium switch, we hypothesized that downregulation of  $I_{SOC}$ , which accompanies transition to differentiated state is associated with the reduction of Orai1 levels. Thus, we have shown the involvement of Orai1, as a principal molecular component of native store-operated channel (SOC), in  $Ca^{2+}$ -homeostasis of hPK cells. Our results allow to conclude that the transition to the differentiated hPK phenotype is associated with the loss/decrease of Orai1 expression.

The principal question concerns the differential role of two calcium entries in keratinocytes: SOCE and massive constitutive entry. A number of calcium-permeable channels have been shown expressed in hPK (10) especially those from Transient Receptor Potential family. From TRPC family: TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, and TRPC6 were shown expressed and functional in hPK and all of them involved in SOCE (10-11, 21). Interestingly, though the short-term transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  is mostly attributed to be pro-proliferative, for two of them TRPC1 and TRPC4, which are considered as SOCs, the role in differentiation was shown (11). Among all of them, the member of vanilloid family of TRP channels, TRPV6, has been shown to be expressed and to positively correlate with the calcium gradient and differentiation in the skin providing a massive calcium entry into keratinocytes necessary to induce differentiation (12, 22). It remains intriguing, how these two types of entries may co-

exist and if they are interrelated since the decrease in SOCE and Orai1 expression is accompanied by the increase in constitutive calcium entry and TRPV6 expression following the gradient of calcium and differentiation.

EGF is an important growth factor that elicits cellular signaling through an EGF receptor and affects cell migration in many types of cells (23). When EGF binds to EGFR, the receptor dimerizes and is autophosphorylated, which subsequently leads to the downstream activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK), and phosphatidyl 3-kinase (PI 3-kinase), and phospholipase C pathways (24-25). In our studies we employed EGF as a natural regulator for the processes studied and we have shown that EGF signaling in keratinocytes concerning SOCE passes through Orai1 channel.

We have demonstrated the important role of Orai1 channel in UHPK proliferation. Indeed, the role of Orai1 channel and SOCE have been already shown for endothelial cells (15), lymphocytes (16), airway smooth muscle (26), and others. The increase in Orai1 and STIM1 expression, and therefore SOCE in general is prerequisite to stimulate proliferation, since the use of specific SOC inhibitors like SKF-96365, NiCl<sub>2</sub>, or BTP-2 abrogated the observed effects as well as the selective knockdown of Orai1 and STIM1 (26). The increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> followed by a SOCE was shown to be translated into activation of the proliferation-associated calcineurin-transcription factor NFAT pathway (16, 27). The further studies will be needed to correlate the molecular mechanisms of Orai1-promoted proliferation and the calcium gradient in the skin.

In normal epidermis keratinocytes migrate upward from the basal layer as they undergo terminal differentiation, yet they also have the capacity for lateral movement during wound healing. It was shown that keratinocytes in low-calcium medium were laterally more motile than keratinocytes in normal medium (28). During calcium-induced stratification hPK moved upward from the basal layer by gliding over their neighbors and forming contacts with other suprabasal cells (3). Of central importance mostly for keratinocytes is the ability to balance proliferation and differentiation, control adhesion to an underlying substratum, and when necessary, remodel this substratum and migrate in a directed fashion. These functions are particularly central to the mitotically active epidermal cells hPK, which must continually undergo proliferation, detachment, and differentiation in the course of homeostasis, and upon injury, proliferate and migrate toward and repair the wound.

We have evidenced the involvement of Orai1 channel in keratinocytes polarized motility and migration. Indeed, the coordinated and dynamic regulation of adhesions is central for cell migration in both normal and pathological processes (29). Cell migration is initiated by forming protrusions, which are stabilized by integrin-mediated adhesions that establish structural and signaling linkages between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. A prominent component involved in this regulation is focal adhesion kinase (FAK) (30). FAK promotes cell migration by its capacity to orchestrate signals between integrin and growth factor receptors (30). Downstream of integrin or growth factor stimulation, FAK is phosphorylated at Tyr-397, which is an important binding site for Src family kinases (31). It has been numerously reported that the control of FAK phosphorylation and cell morphology is a key factor involved in the formation of focal contacts that regulates cell attachment and detachment required for cell migration (32). In the present work we have shown for the first time that the depletion by EGF of ER and activation of Orai1 channel and consequently SOCE may lead to phosphorylation of FAK at Tyr-397 and to stimulate keratinocyte migration. Moreover, our studies as well as previous studies have demonstrated a critical role for FAK as a regulator of adhesion dynamics (33-34), and its role in cell motility and keratinocyte migration via activation of Orai1 channel and triggering SOCE. Nevertheless, the mechanisms by which FAK regulates the assembly-disassembly of focal adhesions remain to be elucidated.

Some reports demonstrated that phosphorylation of FAK became increased in EGF-stimulated cell spreading and migration (35). Others have shown that EGFR-mediated signaling induced the dephosphorylation of FAK in cell motility (36). Thus, most investigators have examined either FAK phosphorylation or dephosphorylation stimulated by EGFR-mediated signaling during cell migration and wound healing. It was reported that EGFR-induced signaling pathways are necessary for cell migration (37). Thus, EGF is antagonistically involved in both FAK phosphorylation and dephosphorylation with different mechanisms in a cell (38) and there is still a limited understanding of the mechanism linking a cell attachment–detachment process and EGF stimulation.

Evidence has emerged supporting the role of the calpain family of intracellular calcium-dependent proteases in regulating cell migration (39-40). Calpains have been proposed to regulate migration, at least in part, through their ability to modulate the dynamics of adhesions (41). Numerous calpain targets have been identified, some of which are proteins that are present in focal adhesions, including talin, paxillin, and FAK (42). It has been

proposed that calpain cleavage may play a role in terminating FAK signaling by attenuating its kinase activity (43). The different signaling seems likely to be possible from the same ligand as EGF since it has been shown that in undifferentiated keratinocytes, interferone-inducible protein-9 activates  $\mu$ -calpain downstream of a PLC- $\beta$ 3-mediated calcium flux, while EGF utilizes the same ERK to M-calpain cascade that it triggers to converge at the disassembly of adhesion plaques (44). In our studies we have confirmed that the selective inhibition of calpain leads to complete arrest of UHPK migration suggesting the crucial role of this pathway in focal adhesion turnover and cell motility triggered by Orai1 activation upstream of FAK. Thus, it is likely that proteolysis of these substrates contributes to the regulation of adhesion dynamics and cell migration.

Finally, as it depicted in the scheme (Fig. 7) we can summarize our findings as the activation of EGFR (1) induces the depletion of calcium in endoplasmic reticulum and stimulates calcium sensor STIM1 (2), which, in turn, transactivates Orai1 channel and induces store-operated calcium entry (3). This store-operated calcium entry will promote either the phosphorylation (4a) of Focal Adhesion Kinase (pFAK<sup>397</sup>) or its degradation by calpain protease (4b) enhancing focal adhesion turnover and thereby both stimulating polarized cell motility of human keratinocytes.



## Materials and Methods

### *Cell Culture and human skin sections*

Human Primary Keratinocytes (hPK) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5%CO<sub>2</sub> in a keratinocytes serum-free medium (K-SFM) supplemented with 5 µg/ml of recombinant epidermal growth factor (EGF) and 50 µg/ml of bovine pituitary extract (BPE), containing 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>. 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 prior to confluency. Throughout the text the terms UhPK and DhPK are used. They imply that hPK kept in 0.07 mM of Ca<sup>2+</sup> are called undifferentiated (UhPK) since their phenotype corresponds to undifferentiated proliferating cells from stratum basale, or hPK cells treated with 1.7 mM Ca<sup>2+</sup> for at least 3 days which provokes irreversible differentiation process and keratinocytes have to be considered as differentiated (DhPK).

### *siRNA cell transfection*

All siRNAs were synthesized by Eurogentec France SASU (Angers, France) and indicated as in Table 1. Cells were transfected with 60 nM of siRNA using 6 µl of Hyperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. The efficiency of cell transfections with the siRNAs for each particular target has been validated using real-time quantitative PCR.

**Table 1. siRNAs used in the study**

No	Name (Accession No)	Sequence
1.	hOrai1 (NM_032790)	5'-UGAGCAACGUGCACAAUCU(dTdT)-3'
2.	hSTIM1 (NM_003156)	5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC(dTdT)-3'
3.	hFAK (NM_153831.3)	5'- GAACCUCGCAGUCAUUUAU(dTdT)-3'
4.	siCT (Luciferase, AB_490793)	5'-CUUACGCCUGAGUACUUCGA(dTdT)-3'

### *Immunohistochemistry*

Paraffinized human skin sections were obtained following breast reduction surgery after the patient consent and the approval of ethical committee. Paraffin-embedded skin sections were

subjected to conventional deparaffinization followed by antigen retrieval using citrate buffer at 95°C in water bath. After saturation in the solution containing 1% BSA and 0,05% Triton X100 in PBS-gelatin, the skin sections were incubated with the specific rabbit polyclonal anti-ORAI1 antibody (ProScience, Poway, CA, USA; 1/200), mouse monoclonal anti-STIM1 (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA; 1/200) mouse monoclonal anti-KRT 10 (Chemicon International, Temecula, CA, USA, 1/500), anti-Involucrin (Sigma-Aldrich ; 1/500), anti-Filaggrin (Abcam, Cambridge, UK; 1/500) overnight at 4°C. Goat polyclonal anti-rabbit and anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibodies (Chemicon International; 1/200) were used. After revelation with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich), images were analysed using Zeiss Axioskope microscope (Carl Zeiss, Zaventem, Belgium) and Leica Image Manager software (Leica Geosystems AG Heinrich, Heerbrugg, Switzerland).

#### *Immunocytochemistry*

Cells grown on glass coverslips were washed once with PBS and fixed in 3.5% paraformaldehyde in PBS. PBS-glycine (30 mM) + BSA (50µl/ml) was used as saturation buffer, and the permeabilization was obtained using 0.1% Triton X-100. The cells were washed again in PBS and subjected to f-actin staining by the Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Fluka-Sigma-Aldrich) for 30 min at RT (1/1000). Then, conventional immunostaining procedure was used for the detection of FAs proteins: mouse anti-paxillin (Abcam, Cambridge, UK; 1/200), rabbit polyclonal anti-phospho-FAK (pTyr397) (Abcam; 1/400). Alexa Fluor 546 or 488 goat anti-rabbit or anti-mouse IgGs (Molecular Probes ; 1/4000) were used as secondary antibodies. Fluorescence was analyzed on a Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200 M with a x63 1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature.

#### *Quantitative real-time PCR.*

The quantitative real-time PCR of Orai1, STIM1, FLG and HPRT mRNA transcript was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, Angers, France) on the Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequences of primers are indicated in Table 2. The HPRT gene was used as an endogenous control to normalize variations in the RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results, the comparative threshold cycle method  $\Delta\Delta C_t$  and CFX Manager Software v2.0.

**Table 2 Primers used for the real-time quantitative PCR**

No	Name (Accession No)	Forward (5'-...-3')	Backward (5'-...-3')	Expected product size (bp)
1.	STIM1 (NM_003156)	TGTGGAGCTGCCTCAGTATG	CTTCAGCACAGTCCCTGTCA	112
2.	Orai1 (NM_032790)	ATGGTGGCAATGGTGGAG	CTGATCATGAGCGCAAACAG	115
3.	KRT1 (NM_006121)	GCTCCCATTTTGTTCAGT	GTCTCGAGAAAGGGAGCAA	110
4.	TGM1 (NM_000359)	TCACTGTTTCATTGCCTCA	CCCTCACCAATGTCGTCTTC	117
5.	IVL (NM_005547)	ACTGAGGGCAGGGGAGAG	TCTGCCTCAGCCTTACTGTG	121
6.	FLG (NM_002016)	TTTCGTGTTTGTCTGCTTGC	CTGGACACTCAGGTTCCCAT	103
7.	HPRT (NM_000194)	GGCGTCGTGATTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	134

*Western blotting*

hPK cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing 10mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 10mM MgCl, 1mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. The lysates were centrifuged at 15 000 g and 4°C for 20 min, mixed with a sample buffer containing 125mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5% b-mercaptoethanol, 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue, and boiled for 5 min at 95°C. The total protein samples were subjected to 8–10% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane by semi-dry western blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The membrane was blocked in a 5% milk TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.4, 140mM NaCl, and 0.05% Tween 20) for 1h, and then probed using a specific rabbit polyclonal anti-FAK (Abcam, Cambridge, UK; 1/400) and anti-phospho-FAK (pTyr397) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA ; 1/1000), anti-Orai1 antibody (ProScience, Poway, CA, USA; 1/200), anti-mouse monoclonal anti-STIM1 antibody (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA; 1/250), anti-bactin (Lab Vision Co., Fremont, CA, USA; 1/1000) antibodies. The bands on the membrane were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnologies Inc., Fremont, CA,

USA). A densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad laboratories).

#### *Electrophysiology and solutions*

Macroscopic currents were recorded from NHEK cells in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht/Pfalz, Germany), as previously described. The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM): 120 NaCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4 (adjusted with TEA-OH), osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-mannitol. The patch pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA (1.2-bis (2-aminophenoxy) ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid), and 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.4 with CsOH and osmolarity 295 mOsm/kg adjusted with D-mannitol). The necessary supplements in the desired concentrations were added to the experimental solutions directly from the appropriate stock solutions, dissolved in water, ethanol or dimethylsulfoxide. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The experiments were carried out at room temperature.

#### *Cell proliferation assays*

hPK cells were harvested and plated at the initial density of 3000 cells per well in 96-well plates (Poly-Labo). Cells were transfected and the number of viable cells was determined every 24 hours using the CellTiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay (Promega Corp.). Cell count was also used to determine the proliferation rate of hPK 48h after transfection with siRNA using a Malassez counting chamber. Cells were trypsinised from 6-well plates and cells from each well were counted 8 times.

#### *Migration assay*

Cells were seeded onto the top of Transwell® cell culture inserts with 8.0-µm pore size (Falcon, France) at the density of 20,000 per well (24-well format) in non-complemented K-SFM. Cells were stimulated to migrate across the filters by complemented K-SFM as a chemoattractant in the assay chambers beneath the inserts. After 24 h of incubation at 37°C, non-migratory cells were removed from the top of the filter by scraping, whereas cells that had migrated through the filter pores to the lower side of the inserts, then were fixed in methanol and stained with Hoechst (5 mg/L in PBS). Cells on the lower side of the inserts were counted using a Leica DMIRB. Data are expressed as means of four wells ± SEM.

### *Wound healing assay*

hPK cells were seeded and allowed to reach subconfluency, and then cells were transfected with the siRNAs. After 24h, a 1000  $\mu$ L pipette tip was used to scrape across the dish and the resulting wound was washed with PBS. Bright field images were captured along the wound using a Nikon TS100 microscope (x100) and then the series of pictures were taken at 24h, 48h and 72h after wounding. The images were then analyzed using Adobe Photoshop CS5.

### *Cell motility*

hPK were transfected with the corresponding siRNA for 24h or treated with the FAKi 14 (Tocris Bioscience, Bristol, UK; 10  $\mu$ M) for 30 min. Cell membrane was stained for 30 min with CellMask™ and cells movements were observed by taking images every 36 sec using a Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200 M.

### *Calcium Imaging*

hPK cells were plated onto glass coverslips and loaded with 4  $\mu$ M Fura-2 AM in the growth medium at room temperature for 45 min. Recordings were performed in Hanks' buffered salt solution containing (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose, and 10 HEPES, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The coverslips were then placed in a perfusion chamber on the microscope stage. Fluorescence images of the cells were recorded with a video image analysis system (Quanticell). Fura-2 fluorescence at an emission wavelength of 510 nm was recorded by exciting the probe alternately at 340 and 380 nm. The signal ratio at 340/380 nm was converted into  $[Ca^{2+}]_i$  levels using an *in vitro* calibration.

### *Data analysis*

For each type of experiment the data were accumulated from at least three measurements. Electrophysiological data were analyzed offline using HEKA (HEKA Electronic, Germany) and Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA) software. Results were expressed as Mean  $\pm$  S.E.M., where appropriate. N equals to the number of series of experiments, n equals to the number of cell used in the study. ANOVA was used for statistical comparison of the differences and P<0.05 was considered significant. In the graphs, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences with P<0.05 and P<0.01, respectively.

## **Acknowledgement**

We would like to thank the Department of Research & Development of Johnson&Johnson France for the PhD funding of Matthieu Vandenberghe as well as for the scientific collaboration with our laboratory.

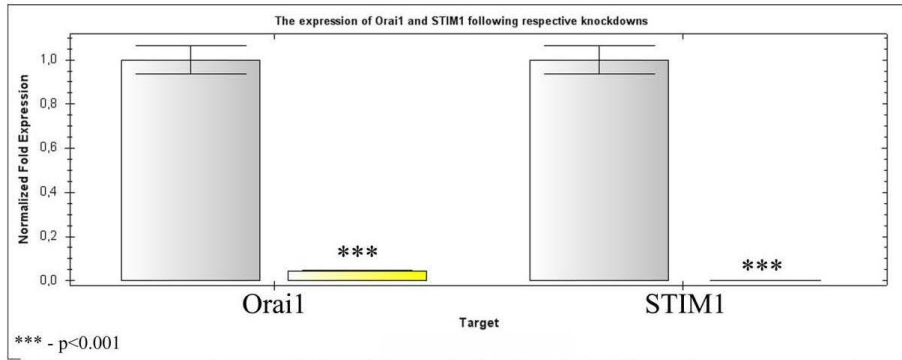
## References

1. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, & Hincenbergs M (1990) Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. (Translated from eng) *J Cell Physiol* 143(2):294-302 (in eng).
2. Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, & Roop DR (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. (Translated from eng) *J Cell Biol* 109(3):1207-1217 (in eng).
3. Heenen M, De Graef C, & Galand P (1992) Kinetics of the calcium induced stratification of human keratinocytes in vitro. (Translated from eng) *Cell Prolif* 25(3):233-240 (in eng).
4. Su MJ, Bikle DD, Mancianti ML, & Pillai S (1994) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium. (Translated from eng) *J Biol Chem* 269(20):14723-14729 (in eng).
5. Mackenzie JC (1969) Ordered structure of the stratum corneum of mammalian skin. (Translated from eng) *Nature* 222(5196):881-882 (in eng).
6. Jensen PK & Bolund L (1988) Low Ca<sup>2+</sup> stripping of differentiating cell layers in human epidermal cultures: an in vitro model of epidermal regeneration. (Translated from eng) *Exp Cell Res* 175(1):63-73 (in eng).
7. Lansdown AB, Sampson B, & Rowe A (1999) Sequential changes in trace metal, metallothionein and calmodulin concentrations in healing skin wounds. (Translated from eng) *J Anat* 195 ( Pt 3):375-386 (in eng).
8. Trump BF, *et al.* (1984) Cell calcium, cell injury and cell death. (Translated from eng) *Environ Health Perspect* 57:281-287 (in eng).
9. Berridge MJ, Lipp P, & Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signalling. (Translated from eng) *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):11-21 (in eng).
10. Tu CL, Chang W, & Bikle DD (2005) Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. (Translated from eng) *J Invest Dermatol* 124(1):187-197 (in eng).
11. Beck B, *et al.* (2008) TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. (Translated from eng) *Cell Calcium* 43(5):492-505 (in eng).
12. Lehen'kyi V, *et al.* (2007) TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. (Translated from eng) *J Biol Chem* 282(31):22582-22591 (in eng).
13. Feske S, *et al.* (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. (Translated from eng) *Nature* 441(7090):179-185 (in eng).
14. Prakriya M, *et al.* (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. (Translated from eng) *Nature* 443(7108):230-233 (in eng).
15. Abdullaev IF, *et al.* (2008) Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. (Translated from eng) *Circ Res* 103(11):1289-1299 (in eng).
16. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, & Rao A (2007) Signalling to transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. (Translated from eng) *Cell Calcium* 42(2):145-156 (in eng).

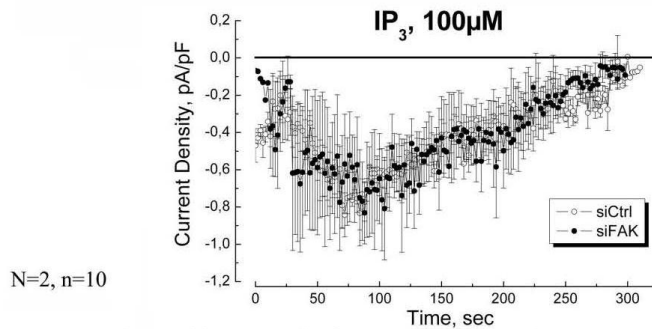
17. Ng SW, di Capite J, Singaravelu K, & Parekh AB (2008) Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. (Translated from eng) *J Biol Chem* 283(46):31348-31355 (in eng).
18. Stiber J, *et al.* (2008) STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. (Translated from eng) *Nat Cell Biol* 10(6):688-697 (in eng).
19. Gwack Y, *et al.* (2008) Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 28(17):5209-5222 (in eng).
20. Ross K, Whitaker M, & Reynolds NJ (2007) Agonist-induced calcium entry correlates with STIM1 translocation. (Translated from eng) *J Cell Physiol* 211(3):569-576 (in eng).
21. Beck B, *et al.* (2006) TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. (Translated from eng) *J Invest Dermatol* 126(9):1982-1993 (in eng).
22. Lehen'kyi V, *et al.* (2011) Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation. (Translated from eng) *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25 Suppl 1:12-18 (in eng).
23. Singh AB & Harris RC (2005) Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. (Translated from eng) *Cell Signal* 17(10):1183-1193 (in eng).
24. Sharma GD, Ottino P, Bazan NG, & Bazan HE (2005) Epidermal and hepatocyte growth factors, but not keratinocyte growth factor, modulate protein kinase Calpha translocation to the plasma membrane through 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid synthesis. (Translated from eng) *J Biol Chem* 280(9):7917-7924 (in eng).
25. Wong WS (2005) Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma. (Translated from eng) *Curr Opin Pharmacol* 5(3):264-271 (in eng).
26. Zou JJ, Gao YD, Geng S, & Yang J (2011) Role of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca(2) entry in airway smooth muscle cell proliferation. (Translated from eng) *J Appl Physiol* 110(5):1256-1263 (in eng).
27. Bobe R, *et al.* (2011) SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells. (Translated from eng) *J Mol Cell Cardiol* 50(4):621-633 (in eng).
28. Magee AI, Lytton NA, & Watt FM (1987) Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. (Translated from eng) *Exp Cell Res* 172(1):43-53 (in eng).
29. Ridley AJ, *et al.* (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. (Translated from eng) *Science* 302(5651):1704-1709 (in eng).
30. Sieg DJ, Hauck CR, & Schlaepfer DD (1999) Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. (Translated from eng) *J Cell Sci* 112 ( Pt 16):2677-2691 (in eng).
31. Schaller MD & Parsons JT (1994) Focal adhesion kinase and associated proteins. (Translated from eng) *Curr Opin Cell Biol* 6(5):705-710 (in eng).
32. van de Water B, Nagelkerke JF, & Stevens JL (1999) Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. (Translated from eng) *J Biol Chem* 274(19):13328-13337 (in eng).
33. Webb DJ, *et al.* (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. (Translated from eng) *Nat Cell Biol* 6(2):154-161 (in eng).



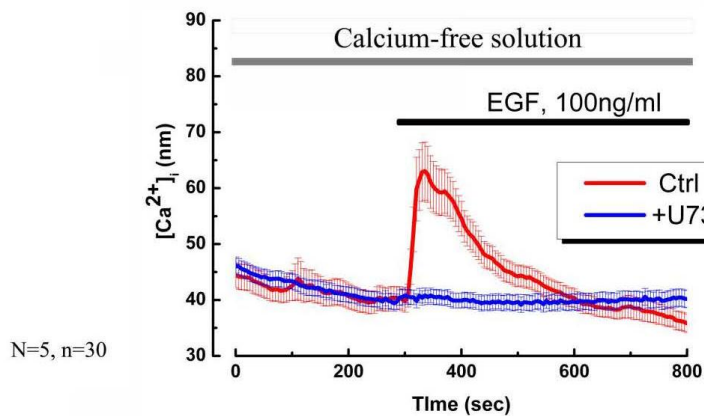
34. Schober M, *et al.* (2007) Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. (Translated from eng) *J Cell Biol* 176(5):667-680 (in eng).
35. Pichard V, *et al.* (2001) Adhesion, actin cytoskeleton organisation and the spreading of colon adenocarcinoma cells induced by EGF are mediated by alpha2beta1 integrin low clustering through focal adhesion kinase. (Translated from eng) *Histochem Cell Biol* 116(4):337-348 (in eng).
36. Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, & Hunter T (2001) Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 21(12):4016-4031 (in eng).
37. Moissoglu K & Schwartz MA (2006) Integrin signalling in directed cell migration. (Translated from eng) *Biol Cell* 98(9):547-555 (in eng).
38. Kim SH (2008) Antagonistic effect of EGF on FAK phosphorylation/dephosphorylation in a cell. (Translated from eng) *Cell Biochem Funct* 26(5):539-547 (in eng).
39. Huttenlocher A, *et al.* (1997) Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. (Translated from eng) *J Biol Chem* 272(52):32719-32722 (in eng).
40. Franco SJ & Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. (Translated from eng) *J Cell Sci* 118(Pt 17):3829-3838 (in eng).
41. Bhatt A, Kaverina I, Otey C, & Huttenlocher A (2002) Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. (Translated from eng) *J Cell Sci* 115(Pt 17):3415-3425 (in eng).
42. Franco S, Perrin B, & Huttenlocher A (2004) Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. (Translated from eng) *Exp Cell Res* 299(1):179-187 (in eng).
43. Cooray P, *et al.* (1996) Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. (Translated from eng) *Biochem J* 318 ( Pt 1):41-47 (in eng).
44. Satish L, Blair HC, Glading A, & Wells A (2005) Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. (Translated from eng) *Mol Cell Biol* 25(5):1922-1941 (in eng).



The expression of Orai1 and STIM1 following respective knockdowns



The effects of siFAK on SOC currents in UhpK



PLC contributes to EGF-induced ER store depletion

## Supplementary Figure

## Résultats préliminaires

### “Dissection of the calcium switch influx: implication of TRPC1, TRPV6 and Orai1”

**Matthieu Vandenberghe**<sup>\*</sup>, Dimitri V. Gordienko<sup>\*</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi, Thierry Oddos, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

\* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

#### ***Introduction***

L'épiderme humain est un tissu pluristratifié constituant la première barrière de notre organisme contre les agressions extérieures. La formation de ce tissu en plusieurs couches est le résultat d'une spécialisation des cellules épidermiques, les kératinocytes. Cette spécialisation est contrôlée par l'activation d'un processus de différenciation des cellules de la couche la plus profonde de l'épiderme : la couche basale. Le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la différenciation des kératinocytes humains est connu de longue date (48). Des études *in vivo* ont montré l'existence d'un gradient de concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  au sein même de l'épiderme (60), tandis que d'autres, *in vitro*, utilisent l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu de culture (***calcium switch***) pour induire la différenciation des kératinocytes. Néanmoins, les mécanismes relatifs à cette différenciation sont encore mal connus.

Nous savons que lors de la différenciation des kératinocytes il y a une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol, elle-même divisée en deux phases : une augmentation transitoire suivie d'un plateau maintenu dans le temps. Ces deux phases correspondraient en fait, dans un premier temps, à la vidange du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire et, dans un deuxième temps, à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux SOC (Store-Operated Channel) membranaires. Ces canaux sont activés suite à la diminution de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE. Ils sont depuis de nombreuses années étudiés dans un grand nombre de types

cellulaires car ils représentent la principale source de  $\text{Ca}^{2+}$  des cellules non-excitables. Beaucoup de travaux ont ensuite eu pour but d'identifier la nature moléculaire des canaux ioniques impliqués dans le courant SOC.

Parmi de nombreux candidats, certains canaux de la super-famille des canaux cationiques TRP (Transient Receptor Potential) ont suscité un intérêt particulier. L'un d'eux, le canal **TRPC1** (TRP Canonique, membre 1) a été le premier à avoir été identifié comme un canal SOC dans plusieurs types cellulaires. L'activation de ce canal suite à la vidange en  $\text{Ca}^{2+}$  du RE s'effectue par interaction directe avec le senseur calcique réticulaire **STIM1** (**ST**romal **I**nteracting **M**olecule 1) (159). Depuis la découverte de l'implication de TRPC1 dans le courant SOC, d'autres canaux ont également été reliés à cette voie d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$ , c'est le cas d'**Orai1**. Orai1 est un canal découvert dans les lymphocytes T dans lesquels il participe à un courant calcique activé par la vidange des stocks réticulaires (CRAC) (169). Il est, lui aussi, activé par la protéine STIM1 par des interactions directes et tend à être considéré comme le canal majoritaire du courant de type SOC (170, 171).

De récents travaux ont montré que le canal TRPC1 est non seulement exprimé dans les kératinocytes humains, mais qu'il participait également au courant de type SOC dans ces cellules (153). D'autres études ont ensuite découvert que l'inhibition de l'expression des canaux TRPC1 prévient l'apparition des marqueurs de différenciation tels que l'involucrine (IVL) ou la cytokératine 10 (CK10) suite au *calcium switch*. Il semblerait donc que ces canaux soient à l'origine de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la différenciation des kératinocytes (155). D'autre part, des travaux effectués sur la souris KO pour le gène codant Orai1 montrent une altération du développement de leur épiderme caractérisée par une peau plus fine et une diminution du nombre et une modification de la forme des kératinocytes (168). Ceci met en évidence le rôle potentiel d'Orai1 dans l'homéostasie calcique de l'épiderme. Cependant, Orai1 et STIM1 n'ont, pour l'instant, fait l'objet d'aucune étude dans l'épiderme humain.

Un autre canal de la famille des TRP a également fait son apparition dans l'étude de la différenciation des kératinocytes induite par le *calcium switch*, ce canal est **TRPV6** (TRP Vanilloïde, membre 6). Ce canal est plus largement étudié pour son rôle dans la réabsorption du  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de l'intestin et du rein, il est aussi le canal ayant la plus haute sélectivité au  $\text{Ca}^{2+}$  parmi les TRP (149). Certaines études ont montré qu'il participait à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  de type SOC, cependant, son activation n'est pas dépendante de la vidange des stocks réticulaires

(152). Le canal TRPV6 est en fait constitutivement ouvert lorsqu'il est présent à la membrane plasmique.

Au niveau de la peau humaine, ce n'est que récemment que son expression y a été découverte. De la même façon que pour TRPC1, TRPV6 est lui aussi nécessaire à l'induction de la différenciation des kératinocytes *in vitro* (84). L'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  médiée par les canaux TRPC1, seule, ne serait donc pas suffisante pour induire la différenciation, et il en serait de même pour le canal TRPV6. Par conséquent, chacun de ces canaux aurait un rôle distinct et nécessaire dans ce processus.

**Le but de cette étude est donc d'étudier le rôle des canaux TRPC1, TRPV6 et Orai1 ainsi que de la protéine STIM1 dans les événements calciques intracellulaires intervenant suite à la stimulation de la différenciation des kératinocytes humains par le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire.**

## ***Résultats***

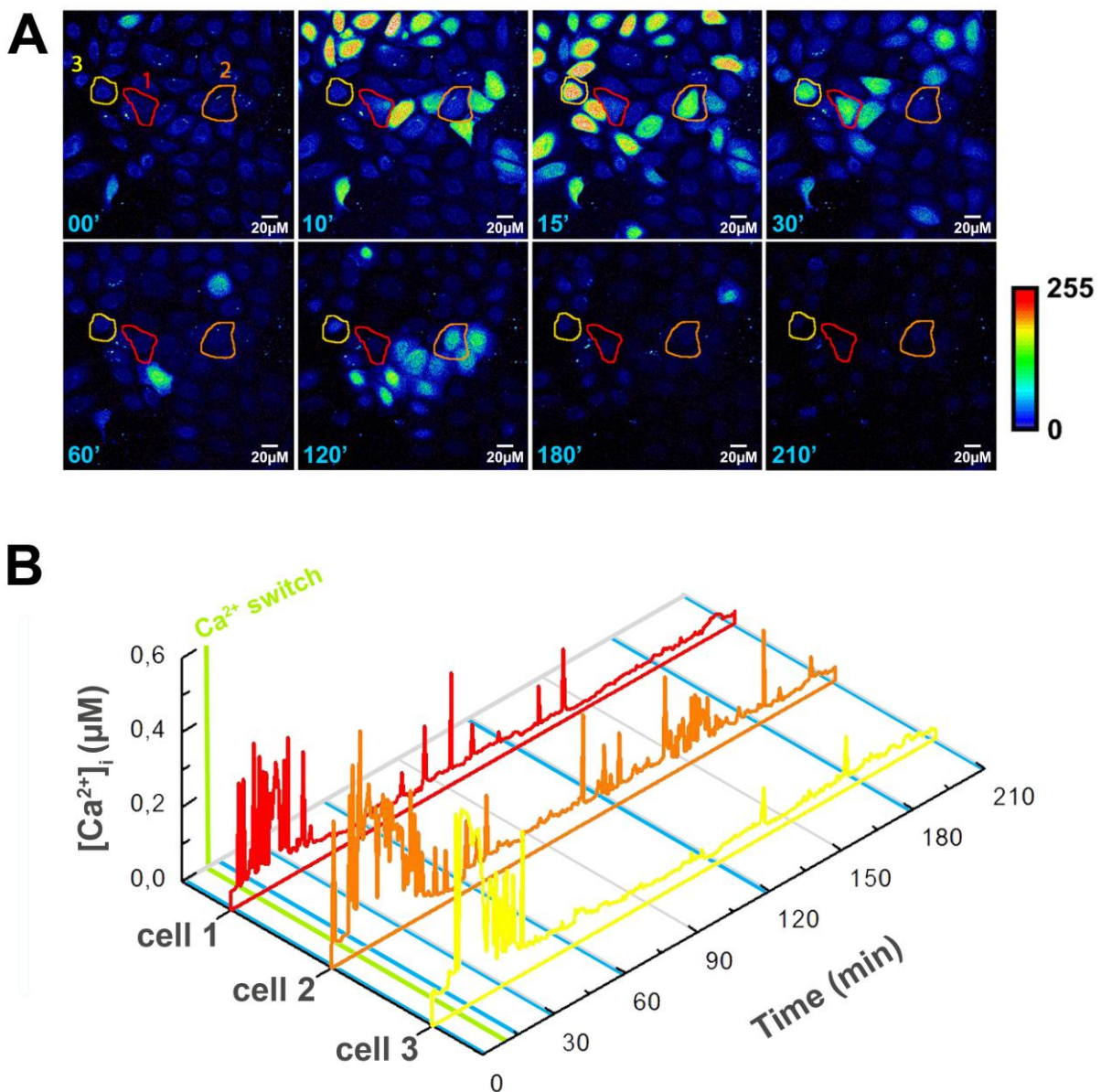
Nous avons, dans un premier temps, étudié les variations de la concentration en calcium cytosolique ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ) suite au *calcium switch*. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'imagerie calcique par microscopie confocale et chargé des kératinocytes issus de cultures primaires (hPK) avec la sonde fluorescente Fluo-4.

Une fois les cellules chargées, elles sont gardées dans un milieu non-différenciateur (HBSS 0mM  $Ca^{2+}$ ) durant les 10 premières minutes d'enregistrement. Au bout de 10 minutes, ces cellules sont exposées à une concentration extracellulaire en  $Ca^{2+}$  de 1,7 mM, suffisante pour induire leur différenciation, correspondant au *calcium switch*. Les variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  sont ensuite observées durant 210 minutes ([figure 1](#)).

Les résultats obtenus nous montrent que, suite au *calcium switch*, il y a une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  plus ou moins importante suivant les cellules. Cette augmentation rapide du calcium cytosolique est maintenue, en moyenne, pendant une vingtaine de secondes, pour ensuite revenir à un état proche de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  observée au début de l'enregistrement. Toutefois, au cours de l'enregistrement, nous observons des oscillations rapides de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dans la plupart des cellules.

Suite à la stimulation des kératinocytes par le *calcium switch*, il y a donc une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  pouvant être attribuée soit à une entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule, soit à une sortie de  $Ca^{2+}$  des compartiments intracellulaires vers le cytosol. Les oscillations observées durant les 3 heures suivant le *calcium switch* peuvent elles aussi correspondre à des entrées de  $Ca^{2+}$  ou des échanges intracellulaires.

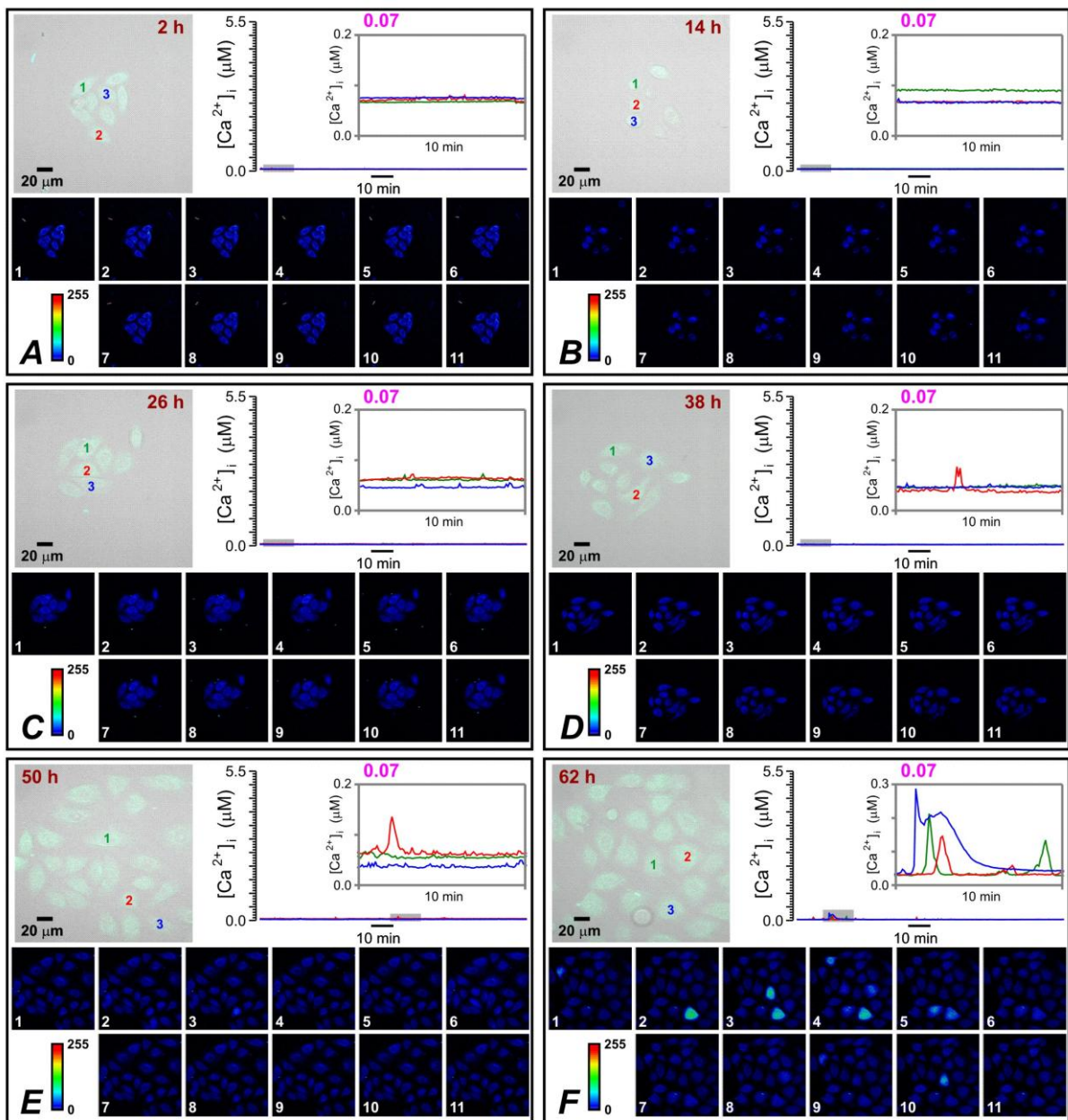
**Figure 1** : Variations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique dans des kératinocytes non-différenciés suite à la perfusion d'une solution HBSS d'une concentration de 1,7 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la chambre d'enregistrement après 10 minutes, l'enregistrement est ensuite poursuivi pendant 210 minutes. **A**. Les images représentant l'intensité de fluorescence en fausse couleur à différents moments de l'enregistrement, les cellules utilisées pour représenter l'évolution de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en fonction du temps sont encadrées et numérotées sur ces images. **B**. Evolution de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en fonction du temps de 3 cellules représentatives, la valeur de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est calculée après calibration. L'application de la solution avec une concentration élevée en  $\text{Ca}^{2+}$  est indiquée en vert par « Ca2+ switch ». Les traits bleus correspondent aux photos représentées en A.





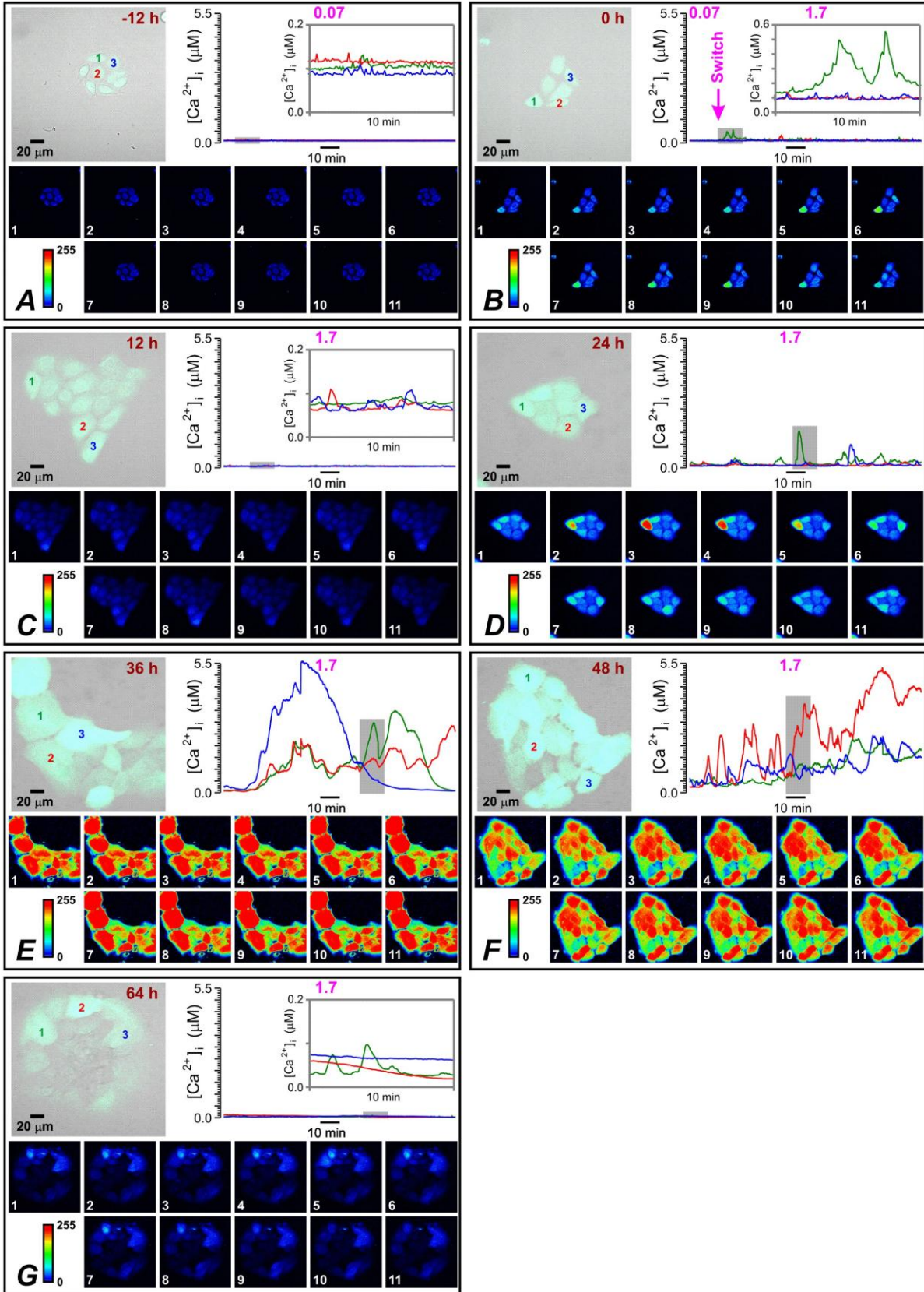
**Figure 2** : Les variations de  $[Ca^{2+}]_i$  en fonction du temps ont été enregistré pendant 1 heures toutes les 12 heures. Pour chaque enregistrement de 1 heure la partie surlignée en grise est agrandit dans l'encadré, les images en fausse couleur représentent l'intensité de fluorescence correspondante. **A.** La condition contrôle correspond à des kératinocytes gardés dans un milieu d'une faible concentration de  $Ca^{2+}$  (0,07 mM). **B.** Variations de  $[Ca^{2+}]_i$  12 heures avant, au moment de l'application d'une solution contenant 1,7 mM de  $Ca^{2+}$ , le «  $Ca^{2+}$  switch », puis toutes les 12 heures jusqu'à 64 heures après.

### A. Control Condition





## B. Calcium Switch



Nous avons ensuite comparé les variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dans des kératinocytes soumis au *calcium switch* par rapport à celles observées dans des kératinocytes gardés dans un milieu « control » contenant 0,07 mM  $Ca^{2+}$ . Les mesures de  $Ca^{2+}$  cytosolique sont effectuées à des intervalles de temps de 12 heures, jusqu'à atteindre 62 heures après le *calcium switch*, et durent 2 heures. Expérimentalement, les kératinocytes sont considérés comme différenciés 24 heures après leur exposition à une concentration élevée de  $Ca^{2+}$ ; dès lors, ils montrent des modifications morphologiques et expriment des marqueurs spécifiques de l'état de différenciation. Cette expérience nous permet donc d'observer les mouvements de  $Ca^{2+}$  à des moments clef du processus de différenciation des kératinocytes.

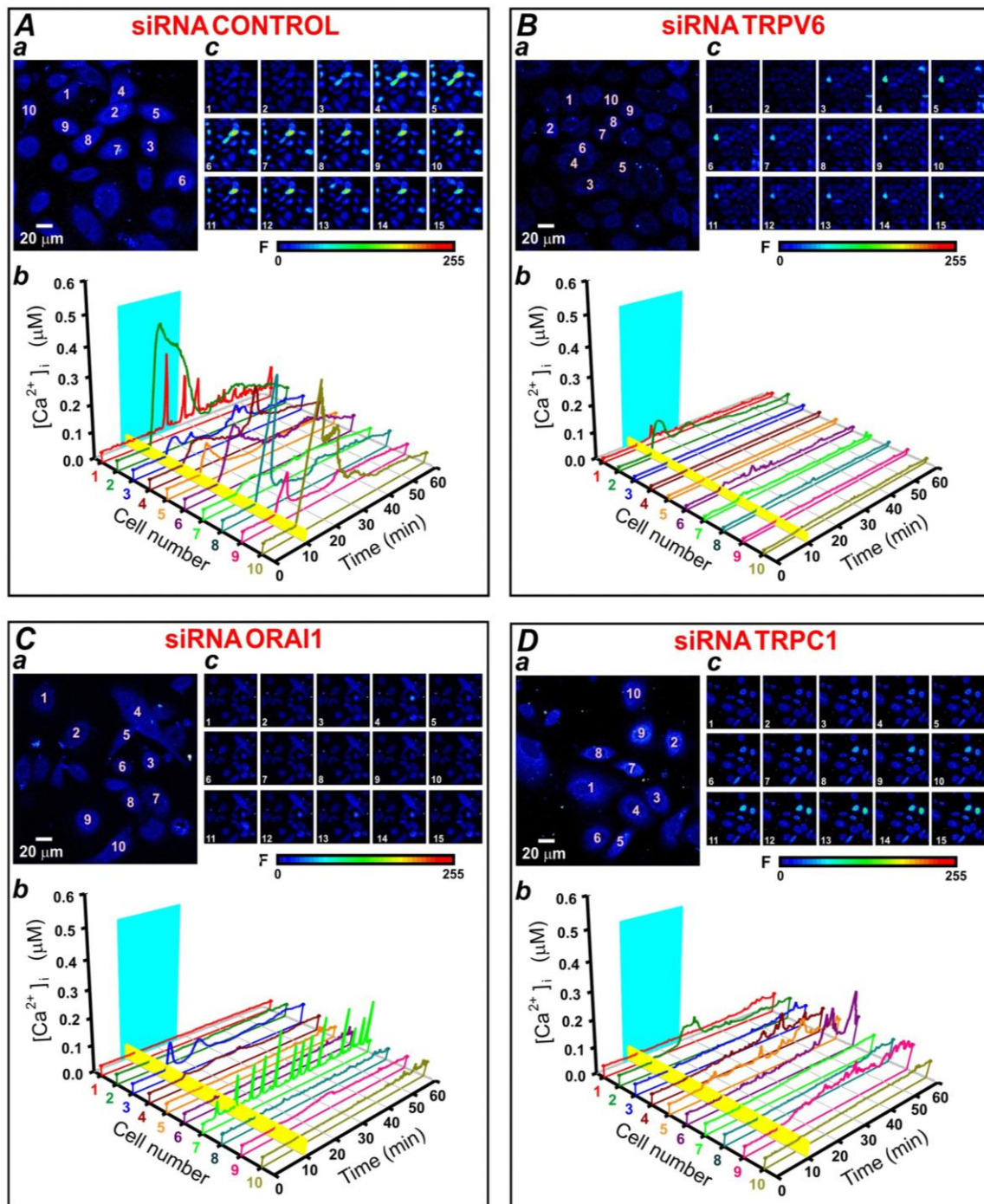
Ainsi, dans les conditions contrôles, où les kératinocytes sont non-différenciés, nous observons peu de variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . A 38, 50 et 62 heures, les augmentations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  sont de faibles amplitudes et plutôt rapides ([figure 2a](#)).

Pour les cellules soumises au *calcium switch*, l'application d'une solution HBSS contenant 1,7 mM de  $Ca^{2+}$ , suffisante pour induire la différenciation des kératinocytes, induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  transitoire. A 12 heures après le *calcium switch*, nous observons de faibles oscillations de  $Ca^{2+}$ , c'est au bout de 24 heures que des pics de plus fortes amplitudes commencent à apparaître. A 36 et 48 heures, les augmentations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  sont beaucoup plus élevées et durent dans le temps. Par contre, les mesures effectuées à 64 heures montrent peu d'oscillations de  $Ca^{2+}$  ([figure 2b](#)).

Ces différentes observations montrent donc qu'il existe plusieurs phases dans les variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , une première survenant à l'application du  $Ca^{2+}$  extracellulaire puis une seconde après 24 heures de traitement. Au vue des différences d'amplitudes et de durée des augmentations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , il semblerait que différents acteurs calciques soient impliqués.

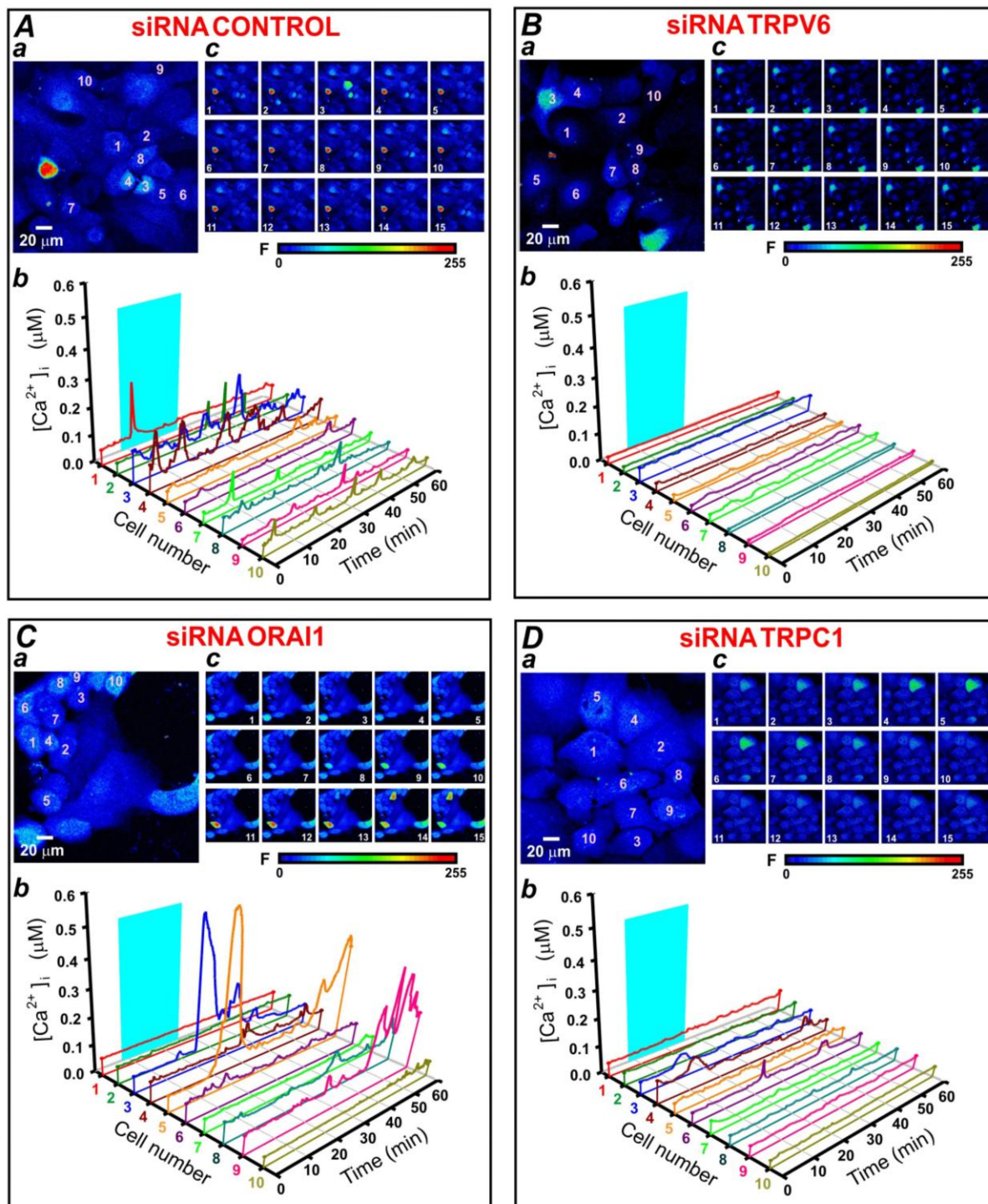
**Figure 3** : Des kératinocytes non-différenciés (0,07 mM  $[Ca^{2+}]_{ext}$ ) sont traités avec différents siRNA dirigés contre la luciférase (siControl), TRPV6, Orai1 et TRPC1. Pour chaque enregistrement d'une 1 heure sont représentés la variation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en fonction du temps et les images de l'intensité de fluorescence pour la période encadrée en bleu. **A**. Après 24 heures, les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  sont mesurées lors de l'application du  $Ca^{2+}$  switch, représenté par la ligne jaune, pendant 1 heure pour chaque siRNA. Les mêmes enregistrements sont effectués 24 (**B**), 48 (**C**) et 72 heures (**D**) après le  $Ca^{2+}$  switch.

### A. $Ca^{2+}$ Switch

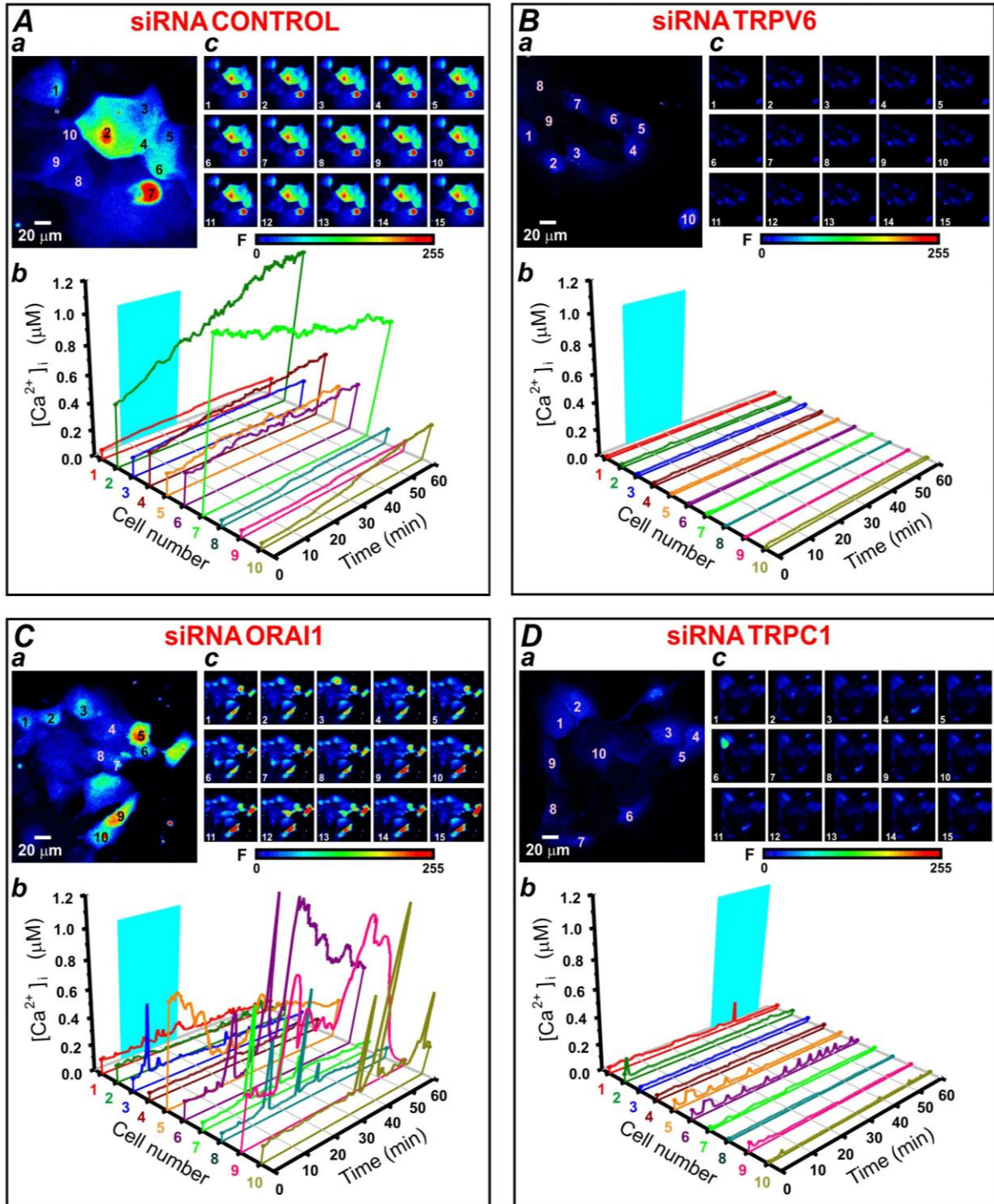




## B. 24 hours after Ca<sup>2+</sup> Switch

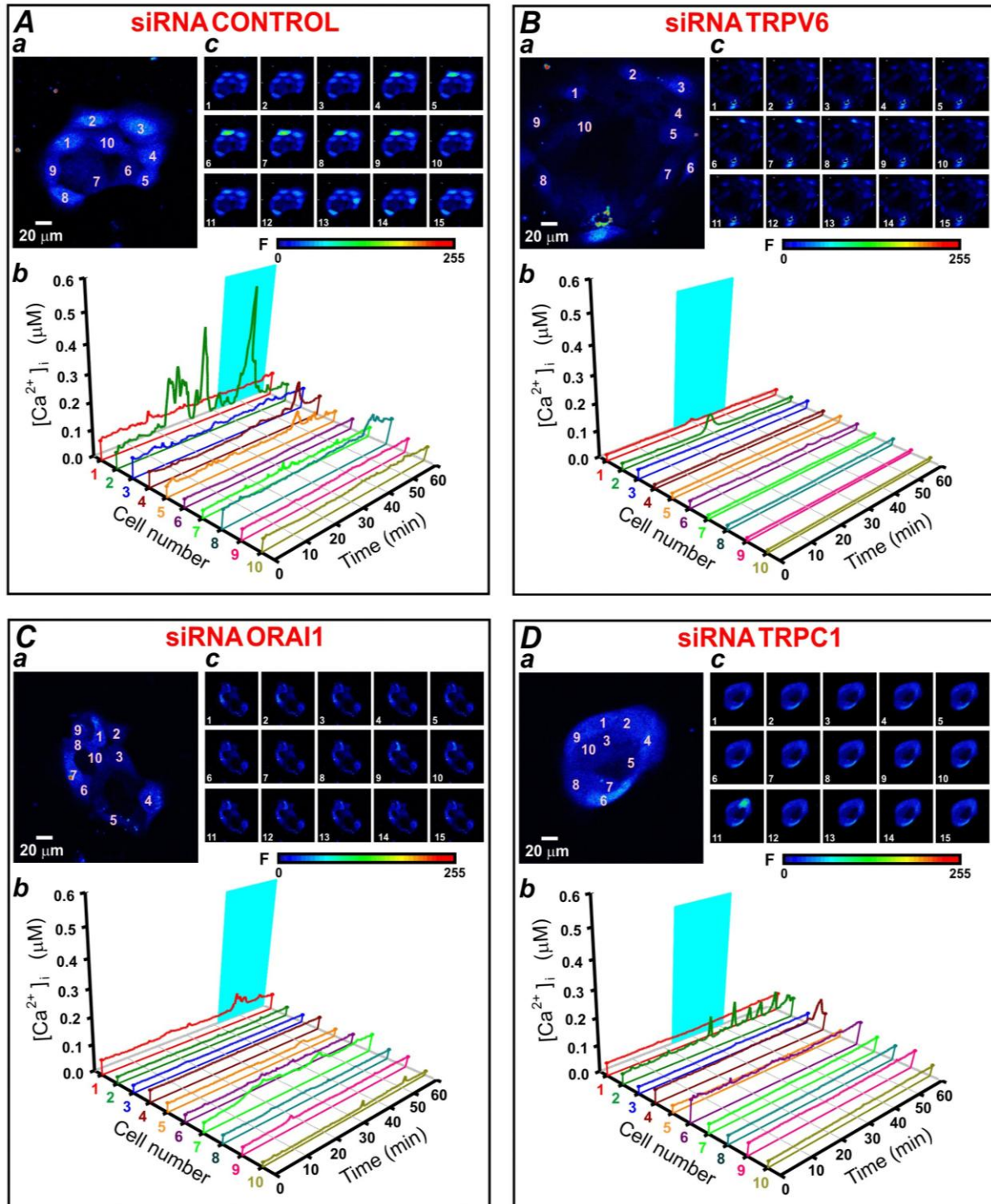


### C. 48 hours after Ca<sup>2+</sup> Switch





### D. 72 hours after Ca<sup>2+</sup> Switch



Enfin, en utilisant des techniques de siRNA pour éteindre sélectivement l'expression de certains canaux calciques, nous avons étudié les rôles respectifs des canaux TRPV6, Orai1 et TRPC1 dans les variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  observées suite au *calcium switch*.

La [figure 3a](#) nous montre les variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dans l'heure qui suit le *calcium switch*. Nous observons alors que l'inhibition de l'expression du canal TRPV6 va empêcher l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dans la majorité des cellules par rapport à la condition contrôle. Il semblerait donc que le canal TRPV6 joue un rôle dans l'entrée de  $Ca^{2+}$  suite au *calcium switch*. En ce qui concerne Orai1 et TRPC1, nous observons également des différences par rapport aux conditions contrôles. En effet, l'inhibition de l'expression de ces canaux calciques va également diminuer la réponse de ces cellules au *calcium switch*.

24 heures après le *calcium switch*, nous observons des oscillations rapides de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  dans la condition contrôle, tandis que les cellules traitées avec un siRNA contre TRPV6 montrent des variations de  $Ca^{2+}$  quasiment nulles. De mêmes, les siRNA dirigés contre TRPC1 diminuent fortement le nombre de cellules montrant des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ . A l'inverse, l'absence d'expression d'Orai1 semble n'avoir aucun effet, si ce n'est d'augmenter l'amplitude des oscillations calciques ([figure 3b](#)). A 48 heures, nous observons des conséquences identiques des siRNA sur les oscillations calciques ([figure 3c](#)).

Enfin, à 72 heures après l'application du  $Ca^{2+}$ , de faibles variations de  $Ca^{2+}$  sont observées dans la condition contrôle et dans la condition siTRPC1, alors que plus aucune modification de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  n'est observée dans les conditions siTRPV6 et siOrai1 ([figure 3d](#)).

Ces résultats montrent que le canal TRPV6 est impliqué dans les entrées de  $Ca^{2+}$  observées tout de suite après le *calcium switch* ainsi que dans les oscillations calciques survenant dans les heures qui suivent. Ces résultats confirment donc le rôle majeur du canal TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes. TRPC1 semble également intervenir dans ces différentes phases de variations de la  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  mais de façon plus modérée. Le canal Orai1, quant à lui, semble intervenir dans la première phase du *calcium switch*, il interviendrait donc dans les influx calciques induits par l'augmentation du  $Ca^{2+}$  extracellulaire.

## Conclusion

Ces résultats préliminaires permettent de mettre en évidence l'implication différente de 3 canaux membranaires dans l'homéostasie calcique liée à l'induction de la différenciation par le *calcium switch*. Le canal TRPV6 semble jouer un rôle prépondérant dans les événements calciques précoces et tardifs induits par le *calcium switch*. Le canal TRPC1 participerait également à ces variations de la  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ , tandis que le canal Orai1 ne serait impliqué que dans les influx calciques précoces.



A mon arrivée au laboratoire, l'équipe travaillant sur l'étude des canaux calciques dans l'épiderme humain entretenait une collaboration avec les laboratoires Pierre Fabre. L'importance de l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mécanismes du développement de l'épiderme suscitant de plus en plus d'intérêts, certaines études se sont intéressées à son rôle potentiel dans le traitement de pathologies dermatologiques telles que le psoriasis ou les dermatites.

C'est dans ces conditions que je me suis intéressé à l'implication de l'Eau Thermale d'Avène dans la différenciation des kératinocytes humains et au rôle du canal calcique TRPV6.

## Article 2

### “Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation”

**Matthieu Vandenberghe**<sup>\*</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>\*</sup>, Françoise Belaubre, Severine Julié, Nathalie Castex-Rizzi, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

[J Eur Acad Dermatol Venereol](#). 2011 Feb;25 Suppl 1:12-8

\* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

Il est bien établi que la différenciation des kératinocytes nécessite une entrée soutenue de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme et donc l'activation de canaux calciques membranaires. Cependant, la nature de ces protéines est restée longtemps inconnue. Le canal TRPV6 initialement appelé CaT1 (Calcium Transporter type 1) a été caractérisé dans les cellules épithéliales intestinales où il joue le rôle de transporteur responsable de l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  (172). Depuis, de nombreux travaux ont rapporté l'expression de cette protéine très fortement perméante au  $\text{Ca}^{2+}$  dans plusieurs organes, comprenant une grande partie du tractus digestif (œsophage, estomac, duodénum, jéjunum, iléon et colon), le pancréas, le placenta, la prostate et les glandes salivaires, ainsi que le foie, le rein et le testicule, dans une moindre proportion.

L'étude de TRPV6 a principalement mis en évidence son implication dans l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  que ce soit par l'intestin ou le rein. Ce n'est que récemment que son expression fut découverte dans la peau humaine (84). Il est connu que dans les kératinocytes non-différenciés, l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire induit une augmentation de la concentration calcique cytosolique. Cette étude a montré que le canal TRPV6 participe à l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique observée. De plus, l'expression du canal TRPV6 varie au cours de la différenciation. TRPV6 est faiblement exprimé dans les cellules non-différenciées et son expression est augmentée dans les cellules différenciées précoces. En inhibant la synthèse de cette protéine par des siRNA, ces travaux ont également montré que l'absence de TRPV6 bloque l'induction de la différenciation par le *calcium switch*.

D'autre part, nous savons que de nombreuses pathologies dermatologiques, telles que le psoriasis ou la dermatite atopique, sont la conséquence d'un dérèglement de la différenciation et/ou de la prolifération des kératinocytes de l'épiderme (173).

L'Eau Thermale d'Avène (ETA) est une eau contenant peu de minéraux. Les propriétés anti-inflammatoires de l'ETA sont mises à profit dans le traitement de la dermatite atopique, de différents types d'eczémas et du psoriasis ; son action cicatrisante est utilisée avec succès dans les suites opératoires de chirurgie plastique (174-176). De nombreuses études ont eu pour but d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de ces actions bénéfiques pour la peau. Il a notamment été démontré que l'ETA agissait sur les cellules immunitaires en réduisant la dégranulation des basophiles ainsi que sur la production de cytokines Th1 et Th2.

Le but de cette étude est de mettre en évidence l'action de l'ETA sur la différenciation des cellules de l'épiderme en utilisant des cultures primaires de kératinocytes. Nous voulons également savoir si l'ETA agit sur l'expression et/ou la fonctionnalité du canal TRPV6 connu pour intervenir dans la différenciation de ces cellules.

## **Conclusion**

**En conclusion, nous avons démontré que le traitement des kératinocytes en culture avec de l'ETA induit leur différenciation. Les modifications de la morphologie des cellules et de l'expression des marqueurs de différenciation nous indiquent que**

**l'ETA accélérerait la différenciation des kératinocytes par rapport à un milieu classique avec une concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  de 1,3 mM, suffisante pour induire la différenciation. En effet, le taux d'expression des marqueurs de différenciation est beaucoup plus élevé pour les cellules traitées par l'ETA que par le milieu pro-différenciateur classique.**

**Nous avons également démontré que l'effet de l'ETA passait par une augmentation de l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule portée par le canal TRPV6. Bien que les taux d'expression des ARNm du canal TRPV6 ne soit pas significativement différents par rapport au milieu pro-différenciateur classique, l'ETA augmente le nombre de canaux présents à la membrane plasmique, ce qui explique son effet sur l'augmentation des influx calciques.**

**Enfin, ces résultats démontrent que le canal TRPV6 participe à l'action de l'Eau Thermale d'Avène sur l'accélération de la différenciation contribuant à la formation de la barrière cutanée. Ceci expliquerait donc les effets bénéfiques de l'Eau Thermale d'Avène sur le traitement des pathologies, comme le psoriasis ou la dermatite atopique, qui montrent une altération de la fonction barrière de l'épiderme.**

## **Discussion**

Ces travaux montrent ont permis d'observer une augmentation de l'influx constitutif de  $\text{Ca}^{2+}$  bien qu'il n'y ait pas d'augmentation de l'expression du canal. L'équipe de *Bindels et collaborateurs* a montré que le canal TRPV6 pouvait être stocké dans des vésicules lipidiques sous-membranaires et transloqué à la membrane plasmique en réponse à un stimulus (177). En effet, les cellules traitées avec de l'ETA montrent une augmentation du nombre des canaux TRPV6 présents à la membrane plasmique. Sachant que ce canal possède la plus grande sélectivité au  $\text{Ca}^{2+}$  parmi les canaux TRP, le fait d'augmenter le nombre de canaux à la membrane plasmique va avoir pour conséquence d'augmenter considérablement l'amplitude de l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Ceci expliquerait donc l'augmentation de l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  et la surexpression des marqueurs de différenciation qui s'ensuit. Les voies par lesquelles l'ETA pourrait activer la translocation de ces vésicules ne sont pas connues pour le moment, cependant, il a été montré que l'ETA pouvait augmenter la fluidité de la membrane plasmique (178).

La collaboration du laboratoire avec les laboratoires *Pierre Fabre* s'est terminée à la suite de la publication de travaux sur l'implication du canal TRPV6 dans les effets pro-différenciateurs de l'ETA. Cependant, plusieurs suites à ce travail avaient été envisagées. Entre autres, il aurait été intéressant de savoir si d'autres canaux pouvaient également être surexprimés ou activés par l'ETA, notamment les canaux SOC. En effet, suivant l'hypothèse concernant la translocation du canal TRPV6 activé par le courant SOC, il aurait été intéressant de mesurer les taux d'expression des canaux TRPC1, TRPC4 et Orai1 après le traitement des kératinocytes avec l'ETA pour savoir s'ils auraient été surexprimés. Puis, si cela était le cas, confirmer l'implication de ces canaux dans la translocation des vésicules contenant TRPV6 en utilisant des stratégies siRNA.

Mes recherches ont montré que l'effet de l'ETA n'était pas relié directement aux concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{Mg}^{2+}$ . En effet, en utilisant un milieu reconstitué contenant les mêmes concentrations ioniques en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{Mg}^{2+}$  que l'ETA, les effets observés sur l'état de différenciation des kératinocytes ne sont pas identiques. L'ETA aurait donc, en dehors de sa composition en  $\text{Ca}^{2+}$  et en  $\text{Mg}^{2+}$ , des propriétés permettant l'accélération de la différenciation des kératinocytes en augmentant la translocation de TRPV6 à la membrane. L'identification du ou des agents responsables de cette propriété pourrait être d'un grand intérêt.

## ORIGINAL ARTICLE

**Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation**V Lehen'kyi,<sup>†,1</sup> M Vandenberghe,<sup>†,1</sup> F Belaubre,<sup>‡</sup> S Jullié,<sup>‡</sup> N Castex-Rizzi,<sup>‡</sup> R Skryma,<sup>†</sup> N Prevarskaya<sup>†,\*</sup><sup>†</sup>Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Université de Lille-1 (USTL), Villeneuve d'Ascq, France<sup>‡</sup>Pierre Fabre Dermo-cosmétique, Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire, Toulouse, France

\*Correspondence: Prof. N Prevarskaya. E-mail: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr

**Abstract****Background** Numerous studies have demonstrated the beneficial effect of Avène Thermal Spring Water (TSW) in dermatological diseases but the molecular mechanisms remain unknown. The objective of the present study was to evaluate the effect of Avène TSW on the morphological and molecular features related to the more advanced status of differentiation of human keratinocytes.**Material and Methods** Normal human keratinocytes (NHK) were differentiated in medium powder reconstituted with Avène TSW and assessed by RT-PCR and immunohistochemistry. Calcium entry was measured by a Fura-2 AM probe. TRPV6 channel were detected by immunohistochemistry, RT-PCR and western blot.**Results** Treatment of NHK with Avène TSW led to an enhanced constitutive calcium entry that resulted in the increased expression of involucrin and cytokeratins 1 and 10. This enhanced constitutive calcium entry in Avène TSW-treated keratinocytes was mediated by the TRPV6 calcium channel. Moreover, Avène TSW-mediated calcium entry was due to the increase in TRPV6 expression as well as the channel abundance at the cell membrane.**Conclusions** An other mechanism of action of Avène TSW is described. Avène TSW treatment induced an enhanced constitutive calcium entry mediated by TRPV6 channel leading to the acceleration of human keratinocytes differentiation.

Received: 20 September 2010; Accepted: 5 November 2010

**Keywords**

Avène Thermal Spring Water, calcium, differentiation, keratinocytes, TRPV6

**Conflicts of interest**

FB, SJ and NCR are employees of Pierre Fabre Dermo-Cosmétique. The sponsor has provided funding to support the work of this paper.

**Introduction**

A number of auto- and paracrine factors drive keratinocyte differentiation. Among them, calcium plays the crucial role in this process.<sup>1</sup> Cytosolic Ca<sup>2+</sup> signalling is well known to control a wide array of cell functions, ranging from short-term responses, such as contraction and secretion, to longer term regulation such as cell growth and proliferation.<sup>2</sup> Moreover, the presence of a calcium gradient has been demonstrated in the epidermis with the lowest concentrations in the basal layer and the highest in the granulosum layer, where critical proteins for barrier function are produced.<sup>3,4</sup> Elevation of extracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations triggers an acute and then a sustained increase in intracellular Ca<sup>2+</sup>, and subsequently initiates expression of early differentiation markers

genes.<sup>4,5</sup> Thus, calcium-permeable channels are potential candidates participating in the increased influx of calcium into keratinocytes.<sup>6,7</sup> We have recently demonstrated that different transient receptor potential (TRP) channels participate to the terminal differentiation of keratinocytes.<sup>8,9</sup> Impaired keratinocyte differentiation and proliferation are key elements in the pathophysiology of several important dermatological diseases, including atopic dermatitis and psoriasis.<sup>10,11</sup>

Avène Thermal Spring Water (TSW) is a water with a low-mineral content. Its beneficial effects have already been noted in the prevention and treatment of atopic dermatitis,<sup>12</sup> the reduction of cutaneous inflammation<sup>13</sup> and the prevention of radiation dermatitis.<sup>14</sup> Numerous studies have attempted to assess the molecular mechanisms responsible for its beneficial action. Some effects of Avène TSW on immune cells have already been shown as it

<sup>1</sup>contributed equally to this work

reduces basophile degranulation,<sup>15</sup> and histamine and prostaglandin D2 release from mast cells.<sup>16,17</sup> Avène TSW also acts on Th1 and Th2 cytokines production,<sup>18</sup> which is related to its anti-allergic and anti-inflammatory properties.

The aim of the present study was to focus on the action of Avène TSW on normal skin physiology with special insight into calcium signalling and keratinocyte differentiation.

## Methods

### Cell culture and media

Normal Human Keratinocytes (NHK) were purchased from Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in three different experimental conditions: (i) The standard MCDB medium powder (Sigma) was reconstituted with deionized water containing 0.6 mM magnesium and 0.03 mM calcium. The epidermal keratinocytes kept in this medium were referred to as undifferentiated NHK (ud-NHK) as according to the conventional protocol, NHK cells in this medium are not able to differentiate.<sup>19</sup> (ii) Another medium was prepared by reconstitution of MCDB powder with Avène TSW the composition of which is shown in the Table 1. (iii) The third medium was prepared by reconstitution of MCDB powder with deionized water containing 1.23 mM magnesium and 1.3 mM calcium. Cells kept in this medium were referred to as differentiated NHK (d-NHK) as they developed a differentiated phenotype. Given the importance of natural calcium gradient in the skin for maintaining regulated growth and differentiation of the epidermis *in vivo*,<sup>19</sup>

**Table 1** Composition of Avène TSW (pH = 7.5)

Compound	mg/L
Calcium	51.3
Magnesium	26.7
Sodium	4.8
Potassium	0.5
Bicarbonates	271.5
Sulphate	24.9
Chloride	5.5
Nitrate	1.3
Silicate	10.6

Avène TSW.

**Table 2** Primers and siRNA

Target	F1	B1
TRPV6	5'-GCCTTCTATATCATCTTCC-3'	5'-GGTGATGCTGTACATGAAGG-3'
KRT1	ATTTCGTGAGCTGAATCGTGTGATC	CTTGCCATCCTTGAGGGCATT
KRT10	TGATGTGAATGTGAAATGAATGC	GTAGTCAGTTCCCTTGCTCTTTCA
18S	CAGCTTCCGGGAAACCAAGTC	AATTAAGCCGACAGGCTCCACTC
siTRPV6	5'-CCUGCUGCAGCAGAAAGGG(dTdT)-3'	

TRPV6, transient receptor potential vanilloid; KRT1, cytokeratin 1; KRT10, cytokeratin 10

the calcium content in all three media was monitored as was their osmolarity (327, 325, 326 mOsm, respectively).

Human embryonic kidney cells stably expressing the Transient Receptor Potential Vanilloid type 6 (TRPV6) channel were kept in complete DMEM medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 100 µg/mL kanamycin.

### siRNA cell transfection

Human keratinocytes were transfected overnight with 75 nM of siRNA-TRPV6 per well of a six-well plate using 'Gene porter 2' (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA, USA) in a final volume of 1 mL. Ready-to-use siRNA-TRPV6 (processing option: A4) was synthesized by Dharmacon Research Inc (Lafayette, CO, USA) (see Table 2). Functional non-coding siRNA#1 (Dharmacon Research Inc.) was used as a control.

### Calcium imaging

Cells were plated onto glass coverslips and were loaded with 4-µM Fura-2 AM at room temperature for 45 min in the growth medium. Recordings were performed in Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose and 10 HEPES buffer adjusted to pH 7.4 with NaOH. CaCl<sub>2</sub> 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, Sunderland, UK).

### Quantitative Polymerase Chain reaction

The PCR primers used to amplify TRPV6 cDNAs as well as the primers for cytokeratin 1 (KRT1), and cytokeratin 10 (KRT10) genes are specified in the Table 2. Quantitative real-time was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, Angers, France) on the Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. A  $\Delta\Delta C(t)$  method was used to quantify the number of transcripts.

### Cell-surface protein biotinylation

Cell dishes were put on ice and the medium was replaced by an ice-cold Phosphate Buffered Saline with 0.1% Bovine serum albumin (PBSB) solution containing 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>,

pH = 8, washed once, and incubated with PBSB solution containing 2 mM biotin (Pierce, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin) for 30 min at 4 °C. Cells were then washed once with PBSB solution, and lysed with ice-cold lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40 and protease inhibitor cocktail from Sigma. Biotinylated proteins were precipitated using neutravidin-agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA), eluted with SDS-poly-acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer and subjected to SDS-PAGE.

#### SDS-PAGE and Western-blotting

Semi-confluent keratinocytes were lysed, total proteins were extracted and subjected to SDS-PAGE and Western-blotting as described previously.<sup>8</sup>

#### Confocal imaging

Cells were fixed and stained using anti-TRPV6 antibody (Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel, 1/200) and mouse monoclonal anti-Involucrin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1/500) as described previously.<sup>8</sup>

#### Immunohistochemistry

Paraffin-embedded skin sections were subjected to conventional deparaffinization followed by antigen retrieval using citrate buffer at 95 °C in water bath. After saturation in the solution containing 1% NGS, 1% BSA and 0.05% Triton X100 in PBS, the skin sections were incubated with the specific rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody (Alomone Labs Ltd., 1/200), mouse monoclonal anti-KRT 10 (Chemicon International, Temecula, CA, USA, 1/500), anti-Involucrin (Sigma-Aldrich, 1/500) overnight at 4 °C. Goat polyclonal anti-rabbit and anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibodies (Chemicon International, 1/200) were used for final incubation. After revelation with diaminobenzidine (Sigma), images were analysed using Zeiss Axioskope microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany) and Leica Image Manager software (Leica Geosystems AG Heinrich, Heerbrugg, Switzerland).

#### Statistics

Data were expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analyses were carried out using Student's unpaired t-tests (two-tailed).  $P < 0.05$  indicates statistical significance.

#### Results

##### Avène TSW effect on keratinocyte differentiation

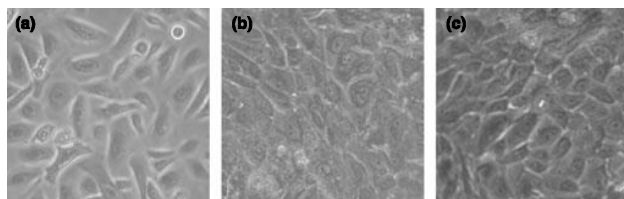
Keratinocytes were cultured in the three different media reconstituted either in deionized water (ud-NHK), or in Avène TSW (Avène TSW-NHK), or in deionized water complemented with calcium and magnesium (d-NHK). These two latter media contained the same amount of calcium and magnesium. Analysis of cell morphology showed that after 3 days of incubation, ud-NHK conserved a proliferative phenotype, whereas d-NHK and Avène TSW-NHK increased in size and became flattened, suggesting a differentiated phenotype (Fig. 1). They stratified and assembled in multilayer sheets. Avène TSW-NHK cells seemed more granular, flatter and bigger in comparison with d-NHK (Fig. 1b and 1c).

To confirm that Avène TSW-NHK were more differentiated than d-NHK, real-time PCR experiments were carried out to assess the expression of some early differentiation markers such as KRT 1 and 10 (Fig. 2). After 3 days of incubation, the expression of both cytokeratins was significantly increased in Avène TSW-treated cells with a higher up-regulation compared with d-NHK cells (Fig. 2).

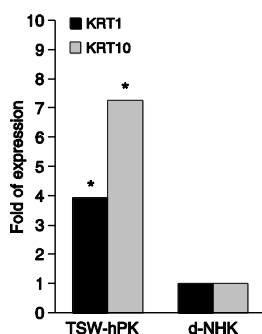
Analysis of involucrin (IVL) expression by confocal microscopy showed that Avène TSW-treated cells express more IVL than d-NHK (Fig. 3). Thus, in addition to light microscopy, we could demonstrate a more advanced phenotype of Avène TSW-NHK characterized by increased expression of IVL as compared with d-NHK.

##### Study of constitutive calcium entry

As calcium is a key element in the process of keratinocyte differentiation, we studied the constitutive calcium entry in the three culture conditions. The protocol of consecutive changes in the calcium level was applied (Fig. 4). In undifferentiated cells, the constitutive calcium entry was low, whereas it was significantly



**Figure 1** Keratinocyte culture in three different media. Light microscopy photographs of keratinocytes cultured in media reconstituted with distilled water (ud-NHK) (a) or Avène Thermal Spring Water (Avène TSW-NHK) (b) or water supplemented with calcium and magnesium (d-NHK) (c).

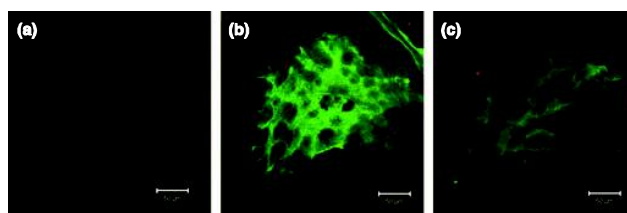


**Figure 2** Cytokeratin 1 and 10 (KRT1 and KRT10) mRNA expression. Avène TSW NHK and d-NHK were cultured during 3 days. Analysis of KRT1 and KRT10 expressions were performed by real-time RT-PCR. Diagram shows the fold induction of KRT1 and KRT10 expressions between the two culture cells. KRT1 and KRT10 were respectively four- and sevenfold over-expressed in Avène TSW culture cells. Asterisks show significant difference from d-NHK (\* $P < 0.05$ )

increased in Avène TSW-NHK and d-NHK cells, following 3 days of treatment. Normalized calcium values showed that calcium entry in d-NHK represented only 55% of Avène TSW-NHK signal (Fig. 4).

#### Role of TRPV6

We have previously demonstrated that TRPV6 channel, a highly selective receptor to calcium, plays a crucial role in keratinocyte differentiation.<sup>9</sup> To assess TRPV6 mRNA and protein expression, quantitative real-time PCR experiments and western-blot were performed in cells cultured in the three culture conditions. A significant increase in TRPV6 expression was observed either in Avène TSW-NHK or d-NHK with no significant difference between the two culture conditions (Fig. 5). However, the expression of the TRPV6 channel at the plasma membrane, revealed by cell surface protein biotinylation, was significantly higher in Avène TSW-NHK (Fig. 5b).



**Figure 3** Involucrin protein expression. Confocal imaging of involucrin (green) and TRPV6 (red) in human primary keratinocytes treated with non-differentiated medium, ud-NHK (a), Avène TSW-NHK (b), and differentiated medium, d-NHK (c).

To confirm a potential role of TRPV6 in Avène TSW-NHK constitutive calcium entry, we used a siRNA strategy. siRNA against TRPV6 selectively inhibited the TRPV6-induced enhanced calcium entry in keratinocytes (Fig. 6a,b). The same results were obtained using HEK-TRPV6 cells, stably transfected by a TRPV6 expression vector (Fig. 6c,d). All these data suggest that the increase in TRPV6 expression at the plasma membrane accounts for the enhanced calcium entry into h-PK cells with the consequent acceleration of the differentiation.

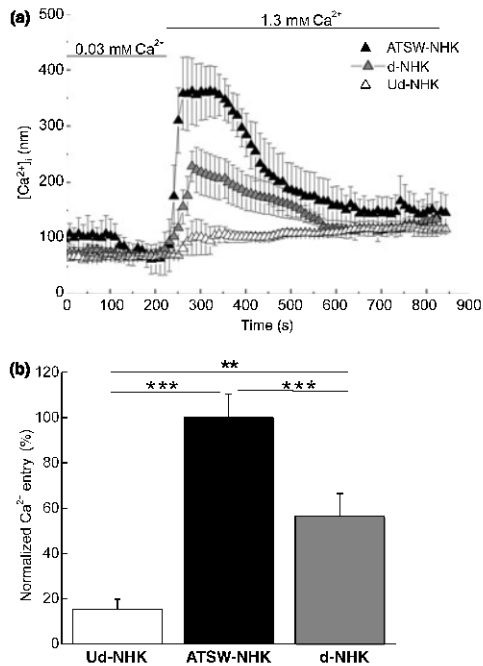
Detection of TRPV6 expression by immunohistochemistry in human skin explants revealed a gradient of TRPV6 expression that was well correlated with the different markers of differentiation, IVL and KRT10 proteins (Fig. 7). Altogether, these results suggest the involvement of the TRPV6 channel on keratinocyte differentiation within the skin.

#### Discussion

Calcium plays a crucial role in the regulation of keratinocyte differentiation especially for the terminal stages like cell stratification and cornification.<sup>20,21</sup> This mechanism has already been shown to be crucial for keratinocyte differentiation process. It may be mediated by highly calcium selective receptor such as the TRPV6 channel.<sup>8</sup> Our aim in the present study was to evaluate the effect of Avène TSW on keratinocyte differentiation. Here, we report three major findings: (i) Avène TSW accelerated the differentiation process of NHK, increased the expression of differentiation markers, and the formation of the upper layer; (ii) the molecular mechanism responsible for Avène TSW effects on NHK was the enhanced constitutive calcium entry; and (iii) this entry was mediated by overexpression of the TRPV6 channel localized at the plasma membrane.

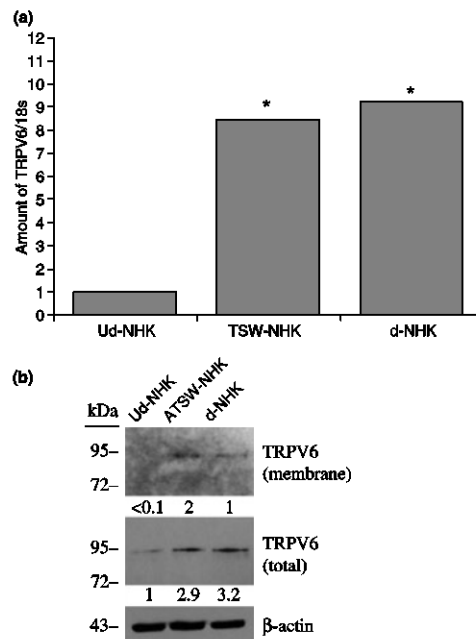
Among the cationic channels that have been suggested to participate in calcium-induced differentiation of keratinocytes,<sup>9,22,23</sup> only the TRPV6 channel is characterized by a constitutive activity leading to continuous intake of calcium into the cell.<sup>8</sup> To know if this effect was due to the calcium concentration of Avène TSW, a medium containing the same calcium concentration was used to culture NHK cells. The results of real-time PCR and western blotting have confirmed the expression and up-regulation of TRPV6





**Figure 4** Constitutive Calcium entry analysis. Ud-NHK, Avène TSW NHK and d-NHK were cultured during 3 days. Constitutive calcium entry analysis was evaluated as detailed in the 'Methods' section using Fura-2 AM. Fluorescence images of the cells were recorded with a video image analysis system (Quanticell). (a) Representative  $[Ca^{2+}]_i$  traces in response to acute changes in  $[Ca^{2+}]_o$  from 0.03 mM to 1.3 mM. (b) Histogram representing means  $\pm$  SEM of three independent experiments. ( $^*P < 0.05$ ).

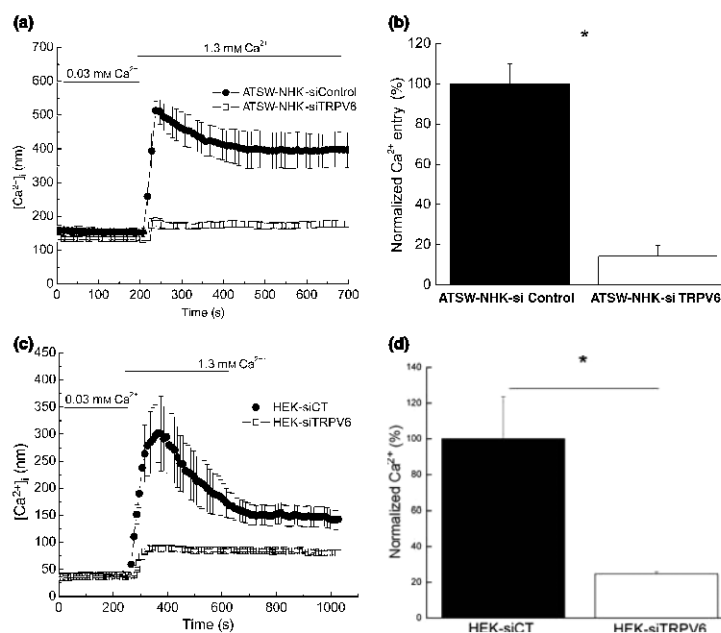
channel in Avène TSW-NHK as well as d-NHK. However, no statistical significance in mRNA as well as total TRPV6 protein expression between Avène TSW-NHK and d-NHK was observed. Bindels and co-workers showed that TRPV6 may be stocked in lipid vesicles under the plasma membrane and translocated to the plasma in response to stimuli.<sup>24</sup> Indeed, in the conditions of Avène TSW-NHK, the level of TRPV6 expression was higher at the cell surface. This might explain why at the same level of mRNA and protein expression, the increase in TRPV6 trafficking to the cell membrane would enhance a constitutive calcium entry into these Avène TSW-treated cells with the consequences described above. Given the biophysical properties and calcium selectivity of the TRPV6 channel, even a slight difference at the plasma membrane would result in profound downstream events.<sup>25</sup> It is likely that the effects of Avène TSW on membrane fluidity<sup>26</sup> might explain the increased expression of TRPV6 at the plasma membrane.



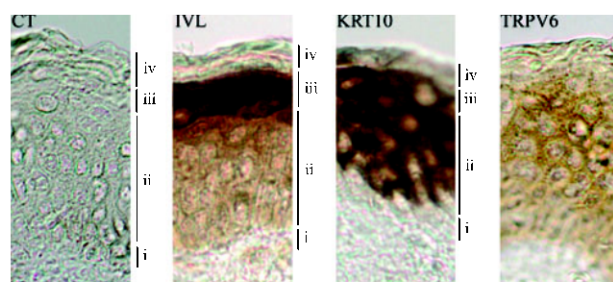
**Figure 5** TRPV6 mRNA and protein expression. Ud-NHK, Avène TSW NHK and d-NHK were cultured during 3 days (a) Analysis of TRPV6 expression were performed by real-time RT-PCR. Diagram shows that TRPV6 was overexpressed in Avène TSW-NHK and d-NHK culture cells. Asterisks show significant difference from Ud-NHK ( $^*P < 0.05$ ). (b) Analysis of TRPV6 protein expression was evaluated by Western Blot. The immunoblotting shows the total and the membrane protein expression of TRPV6. Values represent the quantification compared with  $\beta$ -actin using Bio-Rad software.

Moreover, we used the specific TRPV6 siRNA, which remarkably diminished the TRPV6-induced calcium entry into NHK. To prove that this calcium signature belongs particularly to TRPV6, we used our TRPV6-HEK-293 stable clones. In this cellular overexpression system, TRPV6 activity was shown to be constitutive and calcium dependent.<sup>27</sup> Our set of siRNAs against TRPV6 successfully blocked a constitutive entry from these cells, confirming our data.

It seems that Avène TSW-treated NHK resemble keratinocytes from the stratum granulosum, as they are much flatter and bigger as compared to the phenotype of d-NHK which was likely to correspond to keratinocytes from the stratum spinosum. We have also performed an immunohistochemistry of the human skin sections revealing the expression pattern of TRPV6 as well as IVL and cytokeratin 10 in epidermis. The expression of TRPV6 is very



**Figure 6** Involvement of TRPV6 in constitutive calcium entry following Avène TSW treatment. Constitutive calcium entry analysis was evaluated as detailed in the 'Methods' section using Fura-2 AM. Fluorescence images of the cells were recorded with a video image analysis system (Quanticell). (a) Representative  $[Ca^{2+}]_i$  traces in response to acute changes in  $[Ca^{2+}]_o$  from 0.03 mM to 1.3 mM in NHK-Avène TSW treated or not with siRNA against TRPV6 channel. (b) Histogram representing means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ( $*P < 0.05$ ). (c) Representative  $[Ca^{2+}]_i$  traces in response to acute changes in  $[Ca^{2+}]_o$  from 0.03 mM to 1.3 mM in TRPV6-HEK293 stable clones treated or not with siRNA-TRPV6. (d) Histogram representing means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. ( $*P < 0.05$ ).



**Figure 7** Immunohistochemistry of involucrin (IVL), cytokeratin 10 (KRT10) and TRPV6 in skin. The structure of epidermis is shown: (i) basal layer; (ii) stratum spinosum; (iii) stratum granulosum; (iv) stratum corneum.

likely to correlate with the expression of differentiation markers such as IVL and cytokeratin 10. In a recent study, Hediger and co-workers showed that the skin of TRPV6 KO mice had fewer, thinner layers of stratum corneum, decreased total calcium content and loss of the normal calcium gradient.<sup>28</sup>

Thus, we have demonstrated that TRPV6 channel is likely a target responsible for the Avène TSW effects on human skin thereby accelerating differentiation and contributing to barrier formation. This could explain the beneficial effect of Avène TSW on pathologies, such as psoriasis or atopic dermatitis that show a defect in the skin barrier.

## References

- Su MJ, Bikle DD, Mancianti ML, Pillai S. 1,25-dihydroxyvitamin d3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *J Biol Chem* 1994;269:14723–14729.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 11–21.
- Yuspa SH, Kilkenny AE, Steinert PM, Roop DR. Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations *in vitro*. *J Cell Biol* 1989; 109: 1207–1217.
- Bikle DD, Ratnam A, Mauro T, Harris J, Pillai S. Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation Potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 1996; 97: 1085–1093.
- Sharpe GR, Gillespie JI, Greenwell JR. An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* 1989; 254: 25–28.
- Mauro TM, Pappone PA, Isseroff RR. Extracellular calcium affects the membrane currents of cultured human keratinocytes. *J Cell Physiol* 1990; 143: 13–20.
- Mauro TM, Isseroff RR, Lasarow R, Pappone PA. Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *J Membr Biol* 1993; 132: 201–209.
- Lehen'kyi V, Beck B, Polakowska R et al. TRPV6 is a  $Ca^{2+}$  entry channel essential for  $Ca^{2+}$ -induced differentiation of human keratinocytes. *J Biol Chem* 2007; 282: 22582–22591.
- Beck B, Lehen'kyi V, Roudbaraki M et al. Trpc channels determine human keratinocyte differentiation: New insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium* 2008; 43: 492–505.
- Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature* 2007; 445: 866–873.
- Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 2008; 17: 1063–1072.
- Pigatto P. [the efficacy of avène thermal spring water in light to moderate atopic dermatitis]. *Ann Dermatol Venerol* 2005;132:6S16–16S18.
- Goldman MP, Merial-Kieny C, Nocera T, Mery S. Comparative benefit of two thermal spring waters after photodynamic therapy procedure. *J Cosmet Dermatol* 2007; 6: 31–35.
- Ribet V, Salas S, Leveq JM et al. [interest of a sterilised anti-burning gel in radiation dermatitis: Results of a comparative study]. *Ann Dermatol Venerol* 2008;Spec No 1:5–10.
- Sainte-Laudy J. Standardization of basophil degranulation for pharmacological studies. *J Immunol Methods* 1987; 98: 279–282.
- Joly F, Galoppin L, Bordat P, Cousse H, Neuzil E. Calcium and bicarbonate ions mediate the inhibition of mast cell histamine release by avène spa water. *Fundam Clin Pharmacol* 2000; 14: 611–613.
- Joly F, Charveron M, Aries MF et al. Effect of avène spring water on the activation of rat mast cell by substance p or antigen. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1998; 11: 111–116.
- Portales P, Aries MF, Licu D et al. Immunomodulation induced by avène spring water on th1- and th2-dependent cytokine production in healthy subjects and atopic dermatitis patients. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2001; 14: 234–242.
- Yuspa SH, Hennings H, Tucker RW, Jaken S, Kilkenny AE, Roop DR. Signal transduction for proliferation and differentiation in keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 548: 191–196.
- Bikle DD, Ng D, Tu CL, Oda Y, Xie Z. Calcium- and vitamin D-regulated keratinocyte differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 177: 161–171.
- Tu CL, Oda Y, Komuves L, Bikle DD. The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium* 2004; 35: 265–273.
- Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Izutsu KT. Trpc channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J Dermatol Sci* 2005; 40: 21–28.
- Nguyen VH, Markwardt F. A large conductance  $[Ca^{2+}]_i$ -independent  $K^{+}$  channel expressed in haca2 keratinocytes. *Exp Dermatol* 2002; 11: 319–326.
- Van de Graaf SF, Hoenderop JG, Gkika D et al. Functional expression of the epithelial  $Ca^{2+}$  channels (trpv5 and trpv6) requires association of the  $sl100a10$ -annexin 2 complex. *EMBO J* 2003; 22: 1478–1487.
- Bodding M, Wissenbach U, Flockerzi V. The recombinant human trpv6 channel functions as  $Ca^{2+}$  sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 36656–36664.
- Cezanne L, Gaboriau F, Charveron M, Morliere P, Tocanne JF, Dubertret L. Effects of the avène spring water on the dynamics of lipids in the membranes of cultured fibroblasts. *Skin Pharmacol* 1993; 6: 231–240.
- Bodding M, Flockerzi V.  $Ca^{2+}$  dependence of the  $Ca^{2+}$ -selective trpv6 channel. *J Biol Chem* 2004; 279: 36546–36552.
- Bianco SD, Peng JB, Takanaga H et al. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the trpv6 calcium channel gene. *J Bone Miner Res* 2007; 22: 274–285.

# DISCUSSION

*« La réalité c'est ce qui continue d'exister lorsqu'on cesse d'y croire »*

**Philip K. Dick**

L'un des points les plus importants de la physiopathologie de l'épiderme concerne les mécanismes régissant la balance entre la prolifération des kératinocytes et leur différenciation conduisant à leur mort et leur évacuation à la surface de la peau. De cet équilibre dépend, en effet, la structure de l'épiderme et donc ses fonctions. Or, ces dernières années, l'émergence de l'étude des canaux calciques transmembranaires a ouvert de nouvelles perspectives dans l'investigation des mécanismes contrôlant cet équilibre dans la peau. L'objectif de cette thèse était donc d'apporter de nouveaux éléments relatifs à l'implication des canaux calciques dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme.

Plus concrètement, notre stratégie a principalement été d'étudier l'implication de différents canaux calciques, exprimés dans les kératinocytes, dans les mécanismes de différenciation, de migration et de prolifération des kératinocytes humains.

Ceci a permis de mettre en évidence l'implication de plusieurs canaux calciques dans des processus physiologiques liés au développement de l'épiderme.

## **I. Implication du canal Orai1 et de STIM1 dans la prolifération et la migration des kératinocytes humains**

### **I.A. Expression d'Orai1 et de STIM1 dans l'épiderme humain**

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un élément majeur dans le développement normal de l'épiderme humain, il participe au maintien de la balance entre la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes. Il est donc important d'identifier la nature moléculaire des acteurs impliqués dans les flux de  $\text{Ca}^{2+}$  intervenant dans ces mécanismes cellulaires. De récents travaux ont montré que des souris dont l'expression du gène codant pour le canal Orai1 a été réprimée par KO présentent des altérations du développement de l'épiderme (168). C'est ainsi que je me suis intéressé au rôle du canal Orai1 dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme.

Mes travaux ont, pour la première fois, montré que le canal Orai1 est exprimé dans les kératinocytes de l'épiderme humain. Il est majoritairement exprimé dans les cellules de la couche basale de l'épiderme, c'est-à-dire dans les kératinocytes non-différenciés. Son profil d'expression est donc inversé par rapport au gradient de concentration du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces résultats

suggèrent que le canal Orai1 soit impliqué dans des processus physiologiques prenant place dans les couches profondes de l'épiderme. Orai1 pourrait alors participer à la prolifération et/ou la migration des kératinocytes. D'autre part, la diminution d'expression du canal Orai1 dans les kératinocytes différenciés pourrait être une conséquence de l'augmentation de la concentration extracellulaire en  $Ca^{2+}$ , ou au contraire, la diminution de son expression participerait à la différenciation des kératinocytes en permettant l'expression d'autres protéines induisant une entrée de  $Ca^{2+}$  plus importante comme le canal TRPV6.

Dans la littérature, le canal Orai1 est décrit comme un canal participant au courant SOC de nombreux types cellulaires (170, 171). Ce courant permet une entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule suite à la vidange des stocks calciques réticulaires. Il représente la première source de  $Ca^{2+}$  des cellules non-excitables. La diminution de la concentration en  $Ca^{2+}$  dans le RE va activer la redistribution des protéines STIM1 vers des régions du RE proches de la membrane plasmique pour former des puncta et activer ensuite les canaux SOC membranaires, tels qu'Orai1 (170, 179). Mes résultats montrent que STIM1 est également exprimé dans les kératinocytes et qu'il partage le même profil d'expression que le canal Orai1. De plus, ces deux protéines participent au courant SOC observé dans les kératinocytes, dont l'amplitude diminue lors de la différenciation.

Cependant, ces résultats vont à l'encontre de précédents travaux montrant une augmentation de l'amplitude du courant SOC dans des kératinocytes différenciés (155). Toutefois, ceux-ci avaient été effectués sur la lignée HaCaT, et non sur des cellules primaires, ce qui pourrait expliquer ces différences. D'autre part, il n'est pas à exclure que d'autres canaux soient aussi impliqués dans le courant SOC des kératinocytes. En effet, certaines études montrent que dans plusieurs types cellulaires, et notamment dans la lignée HaCaT, les canaux TRPC1 et TRPC4 y participent également (155, 180).

Finalement, il semblerait que le courant calcique SOC porté par le canal Orai1 et la protéine STIM1 soit préférentiellement impliqué dans des processus cellulaires propres aux kératinocytes non différenciés tels que la prolifération et la migration.

## **I.B. Orai1 et STIM1 dans la prolifération des kératinocytes humains**

D'après les résultats précédents je me suis intéressé à l'implication du canal Orai1 dans la prolifération des kératinocytes humains. Plusieurs travaux effectués sur des types cellulaires différents ont déjà montré l'implication du courant SOC et d'Orai1 dans le mécanisme de prolifération (170, 171, 181). Dans des conditions physiologiques, l'activation des canaux membranaires de type SOC est la conséquence de la vidange calcique du RE induite par la fixation de l'IP<sub>3</sub> sur son récepteur. Or, de nombreuses voies de signalisation de la prolifération cellulaire passent par l'activation de récepteurs membranaires et de tyrosines kinases, tels que l'EGFR et les récepteurs purinergiques, ayant pour conséquence la synthèse d'IP<sub>3</sub> par des PLC (64, 182, 183).

Ainsi, en utilisant des techniques d'évaluation de la prolifération cellulaire, les résultats obtenus ont montré que l'inhibition de l'expression d'Orai1 ainsi que de STIM1 altère la prolifération des kératinocytes humains de façon significative. Ces résultats montrent donc, pour la première fois, le rôle important du canal Orai1 et de la protéine STIM1 dans la prolifération des kératinocytes humains et par conséquent dans le développement de l'épiderme en général. L'interaction de ces protéines est à l'origine d'une entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule appelée SOCE. Il est donc envisageable que cet influx calcique soit responsable de l'activation d'une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la stimulation de la prolifération des kératinocytes.

En effet, de nombreux travaux ont déjà pu mettre en évidence un lien étroit entre l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par le canal Orai1 et la prolifération des cellules de plusieurs tissus (184). D'un autre côté, certaines études montrent que le Ca<sup>2+</sup> cytosolique, par son interaction avec la calmoduline, peut moduler l'activité de kinases et/ou de phosphatases, telles que les CaMK (Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependant protein Kinase) et la calcineurine, participant au mécanisme de prolifération (185, 186). La calmoduline est exprimée dans les kératinocytes et son implication dans la prolifération passe par l'activation de la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et du facteur de transcription c-Myc (95). Il serait donc possible que l'entrée de Ca<sup>2+</sup> par Orai1/STIM1 participe à l'activation de cette voie de signalisation. La calcineurine est, quant à elle, décrite dans plusieurs cellules comme une phosphatase responsable de la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) induisant sa translocation dans le noyau et la prolifération cellulaire (187).

Cependant, bien que la calcineurine soit également exprimée dans les kératinocytes et participe à l'activation du NFAT, elle serait plutôt impliquée dans l'induction de la différenciation de ces cellules.

## **I.C. Orai1 et STIM1 dans la migration des kératinocytes humains**

Les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme sont soumis à une migration ascendante lors de leur différenciation, permettant la stratification et la formation de la barrière de l'épiderme. La migration des kératinocytes joue un rôle d'autant plus important lors de la cicatrisation, pendant la phase de réépithélialisation (voir Introduction II.F). Durant la cicatrisation, on observe notamment une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire au niveau de la blessure, une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les kératinocytes et les fibroblastes du derme ainsi qu'une redistribution du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (115). En parcourant la littérature on peut s'apercevoir que le  $\text{Ca}^{2+}$  est un élément central dans la migration d'un grand nombre de types cellulaires (188-190), incluant les kératinocytes. Peu de travaux ont été effectués sur l'implication potentielle des canaux calciques membranaires dans ce mécanisme, ce n'est que très récemment que certaines équipes ont démontré que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par le canal Orai1 activée par STIM1 été impliquée dans la migration de cellules tumorales mammaires et de cellules musculaires lisses (191, 192).

Mes travaux de thèse ont finalement montré que l'expression d'Orai1 et STIM1 était essentielle pour la migration des kératinocytes humains, et particulièrement dans la dynamique d'assemblage/désassemblage des adhésions focales (FA). L'une des principales protéines impliquée dans cette dynamique est la protéine kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) qui, lorsqu'elle est phosphorylée, s'associe avec d'autres protéines telles que des intégrines, la paxilline et la vinculine pour induire la réorganisation du cytosquelette et la formation de points d'ancrage appelés adhésions focales (193). C'est en fait la formation de ces points d'ancrage à l'avant de la cellule et le désassemblage de ceux se trouvant à l'arrière qui permet à la cellule d'avoir un déplacement dit polarisé (194). Les résultats obtenus montrent que l'absence d'expression d'Orai1 et de STIM1 provoque l'apparition de plus larges FA localisées en périphérie des cellules et la diminution de la forme phosphorylée de FAK. De plus, l'utilisation d'un chélateur calcique cytoplasmique, le BAPTA-AM, montre que le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire est nécessaire à la phosphorylation de FAK et la migration des



kératinocytes. Aucune donnée de la littérature ne fait référence à la possibilité d'une activation directe de la protéine FAK par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, de nombreux travaux ont montré que l'EGF est un facteur de croissance impliqué dans la migration des kératinocytes humains dont l'action peut être liée à l'activité de FAK. L'EGF provoque également une augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol. Mes travaux ont permis de mettre en évidence que l'EGF induit la vidange calcique du RE, par l'intermédiaire de la PLC, qui active une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par le canal Orai1. L'EGF pourrait ainsi représenter l'un des activateurs physiologiques de l'influx calcique porté par Orai1 et STIM1 participant à la migration des kératinocytes humains.

Il est intéressant de savoir que l'EGF peut activer la migration des kératinocytes via la phosphorylation ou la déphosphorylation de FAK. L'action de l'EGF va dépendre de l'état de phosphorylation de cette protéine kinase. Il va stimuler sa phosphorylation lorsqu'il y aura peu de FAK phosphorylée, et inversement. Les mécanismes induisant la phosphorylation de FAK par l'EGF sont dépendants de l'adhésion des kératinocytes à leur support par l'intermédiaire des intégrines (195). Il pourrait donc exister une interaction des récepteurs à l'EGF avec les intégrines membranaires stimulant la phosphorylation de FAK. Mes travaux montrent qu'Orai1 et STIM1 participent à la phosphorylation de FAK. Or, il est connu que le  $\text{Ca}^{2+}$  peut induire l'activation de PKC (protein Kinase C) et que certaines PKC participent à la phosphorylation de FAK. Cependant, il reste à mettre en relation l'activité des canaux Orai1 et de la protéine STIM1 avec l'activation de la PKC dans les kératinocytes humains. La PKC peut également être activée par le DAG (DiAcyl Glycerol) synthétisé par la PLC $\beta$  suite à l'activation de l'EGFR.

D'autre part, l'EGF peut activer la déphosphorylation de FAK par la stimulation des calpaïnes, des protéases cytosoliques sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  (106). Bien que ces protéases soit sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , la nature moléculaire des acteurs de la signalisation calcique permettant leur activation ne sont pas encore connus. Toutefois, mes résultats ont mis en évidence la participation de l'EGF dans les influx calciques portés par Orai1 et STIM1, il serait donc envisageable que cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  permette l'activation des calpaïnes et la déphosphorylation de FAK. Si ces hypothèses se vérifiaient, les entrées de  $\text{Ca}^{2+}$  par le canal Orai1, pourraient alors participer à la fois à la phosphorylation de FAK et la formation des FA et à la déphosphorylation de FAK permettant le « turnover » des FA. Ceci permettrait de positionner le canal Orai1 au centre d'un mécanisme régulant la dynamique des FA et la migration des kératinocytes humains.

Par ailleurs, d'autres travaux ont montré que les intégrines pouvaient aussi activer ou potentialiser l'activité de canaux membranaires (196, 197). Il serait donc intéressant de savoir si les intégrines peuvent également interagir avec le canal Orai1 et participer à l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par ce canal.

## **II. Rôle des canaux perméables au calcium dans la différenciation des kératinocytes humains**

### **II.A. Rôle du courant SOC dans la différenciation des kératinocytes humains**

L'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les processus de différenciation est maintenant bien établie. Il a été démontré que, suite à l'induction de la différenciation par le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (*calcium switch*), la synthèse d' $\text{IP}_3$  augmente pendant plusieurs minutes, conduisant à la vidange calcique réticulaire et à l'activation de l'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux SOC (69, 70). L'influx calcique par les canaux SOC constitue par ailleurs la source de  $\text{Ca}^{2+}$  principale des cellules non-excitables telles que les kératinocytes. Plusieurs études ont ensuite montré que les influx calciques étaient nécessaires à la différenciation des kératinocytes. De nombreux travaux ont ainsi eu pour but d'identifier la nature moléculaire des canaux SOC dans tous les tissus. La plupart s'accordaient à dire que les canaux SOC appartenaient à la superfamille des canaux TRP. C'est ainsi que 2 canaux de la sous-famille des TRPC, TRPC1 et TRPC4, ont été associés aux influx calciques de type SOC dans de nombreux types cellulaires, et plus récemment, dans les kératinocytes humains. Ces travaux ont également mis en évidence que les canaux TRPC1 et TRPC4 sont nécessaires à l'induction de la différenciation par le *calcium switch* (155). Ces canaux seraient donc alors, en partie, à l'origine de l'influx calcique SOC activé suite à la vidange calcique réticulaire observée lors de la différenciation des kératinocytes.

Cependant, l'identification récente d'un nouveau canal membranaire, lui aussi activé par la vidange du RE, a remis en question l'implication seule des canaux TRP dans l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  de type SOC. Ce canal, appelé Orai1, fut découvert dans les lymphocytes T où il participe à leur activation (161). Il fut ensuite étudié dans de nombreux types cellulaires, et est

maintenant considéré comme l'un des composants majoritaires du courant de type SOC. Sachant que l'entrée calcique SOCE est impliquée dans l'induction de la différenciation des kératinocytes et que le canal Orai1 semble en être un des acteurs principaux. Orai1 pourrait donc également être impliqué dans la différenciation.

Bien que nous ayons pu démontrer pour la première fois l'expression du canal Orai1 dans les kératinocytes, son rôle ne semble pas être directement lié à l'induction de la différenciation. En effet, mes travaux montrent que l'inhibition de l'expression du canal Orai1 déclenche l'augmentation du taux d'expression de marqueurs de différenciation tels que l'involucrine et la filaggrine. Ce canal est exprimé majoritairement dans les cellules basales de l'épiderme, correspondant aux cellules non-différenciées, contrairement aux canaux TRPC1, TRPC4 et TRPV6 qui, eux, sont surexprimés dans les kératinocytes différenciés. Orai1 étant impliqué dans la prolifération et la migration des kératinocytes, et comme il est connu que l'inhibition de la migration ou de la prolifération des kératinocytes induit leur différenciation, il serait envisageable que la diminution de l'expression d'Orai1 soit un élément déclencheur de la différenciation. L'expression du canal Orai1 pourrait aussi représenter un frein à la différenciation des kératinocytes.

Aussi, mes travaux montrent que le canal Orai1 est impliqué dans le courant SOC des kératinocytes humains et que l'amplitude de ce courant est diminuée dans les cellules différenciées. La protéine réticulaire sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  STIM1 est elle aussi exprimée dans les kératinocytes et participe fortement au courant SOC des kératinocytes non différenciés. Le courant calcique SOC serait donc alors impliqué à la fois dans la migration, la prolifération et la différenciation des kératinocytes. Par conséquent, suivant la nature moléculaire des acteurs participant au courant SOC et les voies de signalisations et d'activations mises en jeu, cette entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  va déclencher des processus physiologiques bien distincts. Ainsi, les signaux pro-prolifératifs et pro-migratoires activeraient un courant SOC faisant intervenir les canaux Orai1, tandis que la différenciation serait déclenchée par un courant SOC porté par le canal TRPC1 par exemple.

Il faut également prendre en considération que l'état de différenciation des kératinocytes est associé à l'expression de marqueurs de différenciation spécifiques qui, dans nos expériences, est analysée 24 heures après leur stimulation par le  $\text{Ca}^{2+}$ . De ce fait, ces résultats ne renseignent pas sur les événements survenant dans les minutes ou les heures suivant l'application du  $\text{Ca}^{2+}$ . Le canal Orai1 pourrait alors intervenir dans une phase précoce d'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  induisant la surexpression ou l'augmentation de l'activité d'autres canaux,

comme TRPV6 ou TRPC1, qui prendraient le relais et seraient impliqués dans des entrées plus importantes de  $\text{Ca}^{2+}$  déclenchant la différenciation des kératinocytes.

Ces observations soulignent la richesse de la nature moléculaire du courant calcique de type SOC et démontrent l'importance de l'identification des protéines impliquées. Ainsi, une même voie d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  peut engager une variété de processus biologiques différents suivant les canaux membranaires mis en jeu. Ceci confirme l'importance de la caractérisation de la signature calcique, codée en fonction de la durée, de l'amplitude et du lieu des variations de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique.

## **II.B. Rôle de TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes humains**

De précédents travaux au laboratoire ont montré que le canal TRPV6 est exprimé dans les kératinocytes et qu'il est nécessaire à leur différenciation. Contrairement à Orail, ce canal est plus exprimé dans les kératinocytes différenciés. Lorsqu'il est présent à la membrane plasmique des cellules il est considéré comme constitutivement ouvert, c'est-à-dire qu'en présence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire il permet, sans activateur, une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ces mêmes travaux ont donc montré que l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par le canal TRPV6 est à l'origine de l'induction de la différenciation par le *calcium switch* (84).

Par ailleurs, mes travaux sur l'ETA (Eau Thermale d'Avène) confirment l'importance du canal TRPV6 dans le processus de différenciation et montrent que la stimulation de la translocation du canal à la membrane plasmique permet une entrée plus importante de  $\text{Ca}^{2+}$  accélérant ainsi la différenciation. Aussi, il a déjà été démontré que le  $\text{Ca}^{2+}$  pouvait induire la translocation de vésicules cytosolique à la membrane plasmique. Par conséquent, l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire observée lors de l'induction de la différenciation pourrait intervenir dans l'activation de la translocation de vésicules sous-membranaires contenant des canaux TRPV6, ainsi ce mécanisme permettrait d'augmenter le nombre de canaux présents à la membrane et par conséquent l'amplitude de l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## II.C. Rôle des canaux SOC et du canal TRPV6 dans l'entrée de calcium induisant la différenciation des kératinocytes

D'après la littérature, le *calcium switch*, l'augmentation de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  induisant la différenciation, provoque une augmentation rapide de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique pouvant être divisée en deux phases :

- 1- Une première phase, **transitoire**, qui correspondrait à la vidange des stocks calciques réticulaires induite par l' $\text{IP}_3$ , lui-même synthétisé suite à l'activation d'un récepteur membranaire et d'une PLC.
- 2- La deuxième phase, **soutenue dans le temps**, correspondrait à une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par des canaux membranaires activés par la vidange du RE, les canaux SOC.

Ainsi, certaines études ont eu pour but d'identifier la nature moléculaire des protéines mises en jeu dans ces processus. Il fut alors proposé que l'activation du «  $\text{Ca}^{2+}$ -Receptor » (CaR) se trouvant sur la membrane plasmique soit à l'origine de la vidange du RE (68). D'autres travaux ont ensuite étudié l'implication de plusieurs canaux de la famille des TRP connus dans de nombreux types cellulaires pour leur participation dans le courant SOC.

### Rôle de TRPC1 lors du *calcium switch*

Parmi les différents TRP étudiés, TRPC1 a suscité beaucoup d'intérêt. Il a été démontré que ce canal est exprimé dans les kératinocytes et qu'il y est fonctionnel, c'est-à-dire qu'il participe au courant calcique de type SOC. L'expression de TRPC1 varie au cours de la différenciation, il est faiblement exprimé dans les kératinocytes non-différenciés, tandis que son expression augmente dans les cellules différenciées. Il fut alors suggéré qu'il pouvait avoir un rôle dans la différenciation. En effet, il a été démontré que l'expression de ce canal était indispensable pour l'induction de la différenciation par le *calcium switch*, et qu'il serait donc à l'origine des entrées de  $\text{Ca}^{2+}$  induisant la différenciation.

Des résultats préliminaires sur l'étude des événements calciques à long terme induits par le *calcium switch* tendent à confirmer l'implication de TRPC1 dans le processus de différenciation des kératinocytes. En effet, l'inhibition de son expression bloque quasiment totalement les influx de  $\text{Ca}^{2+}$  observés tout de suite après l'application du *calcium switch*, ainsi que les oscillations survenant dans les heures et les jours qui suivent. Ces nouveaux résultats confirment donc le rôle de TRPC1 dans les influx de  $\text{Ca}^{2+}$  impliqués dans l'induction

de la différenciation, mais suggèrent également un rôle dans des événements plus tardifs pouvant intervenir dans le maintien et la progression de l'état différencié des kératinocytes.

#### Rôle d'Orai1 lors du *calcium switch*

L'étude des canaux impliqués dans le courant SOC a pris un nouvel essor suite à la découverte du canal Orai1. Ce canal est maintenant considéré comme l'un des principaux acteurs de ce courant calcique, jusqu'à parfois voler la vedette aux canaux TRP. Suite aux travaux sur les souris montrant l'implication potentielle du canal dans le développement de l'épiderme (168), l'étude du rôle d'Orai1 dans l'homéostasie calcique et tissulaire de l'épiderme humain s'est imposée. Ainsi, cette étude a montré que ce canal est majoritairement exprimé dans les kératinocytes non-différenciés (à l'inverse de TRPC1 et TRPV6) et qu'il participe au courant calcique SOC, dont l'amplitude est diminuée dans les kératinocytes différenciés. De plus, des résultats préliminaires confirment l'implication du canal Orai1 dans les influx calciques prenant place dans les kératinocytes non-différenciés car lors de l'application du *calcium switch*, l'inhibition de l'expression du canal par des siRNA inhibe l'entrée de  $Ca^{2+}$  précoce. Par contre, même en présence du siRNA dirigés contre le canal Orai1, nous observons des oscillations calciques tardives. En conclusion, le canal Orai1 pourrait intervenir dans les influx calciques participant à l'induction de la différenciation mais ne serait pas impliqué dans les oscillations pouvant participer au maintien et à la progression de l'état différencié des kératinocytes. Il pourrait ainsi participer à une entrée de  $Ca^{2+}$  permettant la stimulation de la translocation du canal TRPV6 à la membrane par exemple.

#### Rôle de TRPV6 lors du *calcium switch*

L'implication du canal TRPV6 dans les influx calciques et la différenciation des kératinocytes a déjà été démontrée. Comme TRPC1, il est majoritairement exprimé dans les kératinocytes différenciés mais son expression dans les kératinocytes non différenciés est nécessaire à la différenciation des kératinocytes. Par conséquent, bien qu'il soit peu exprimé dans les cellules non différenciées, il y joue un rôle primordial. Il a également été montré que l'augmentation du nombre de canaux TRPV6 à la membrane plasmique suffisait à accélérer le processus de différenciation. Ce canal étant constitutivement ouvert à la membrane et participant à une entrée massive de  $Ca^{2+}$ , le simple fait d'augmenter le nombre de canaux présent au niveau de la membrane provoquerait une entrée de  $Ca^{2+}$  soutenue dans la cellule suffisante pour induire la différenciation des kératinocytes.

Des travaux préliminaires montrent qu'il est aussi indispensable aux influx de  $\text{Ca}^{2+}$  participant aux oscillations survenant plus tardivement. Il interviendrait donc lui aussi, non seulement dans l'induction de la différenciation, mais également dans le maintien et la progression de l'état différencié des kératinocytes.

Lors de la stimulation des kératinocytes par le *calcium switch*, il y aurait donc une première phase d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante de l'expression des canaux TRPC1, Orai1 et TRPV6 puis une deuxième phase, plus tardive nécessitant l'expression des canaux TRPC1 et TRPV6. La première phase d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  serait impliquée dans l'induction de la différenciation, c'est-à-dire la stimulation de l'expression de protéines spécifiques participant aux modifications morphologiques et structurales des kératinocytes différenciés. Tandis que les oscillations calciques observées 24 et 48 heures après le *calcium switch* participeraient au maintien de l'état différencié des kératinocytes et à l'augmentation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  observée dans les kératinocytes issus des couches supérieures de l'épiderme.

L'expression de certains marqueurs de différenciation, tels que l'involucrine ou la cytokératine 1, est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ . En effet, le promoteur des gènes codant pour ces protéines possède une région AP-1 sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  (58). Ces derniers étant des marqueurs de différenciation précoces, la première phase d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  pourrait alors stimuler leur expression. D'autre part, il a été montré que les entrées de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux SOC ainsi que par le canal TRPV6 pouvaient activer la translocation du facteur de transcription NFAT via l'activation de la calcineurine qui est dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$  (181). Dans les kératinocytes, l'activation de la voie calcineurine/NFAT serait induite par une augmentation prolongée de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol et est nécessaire pour leur différenciation (198). Ainsi, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par les canaux TRPV6 pourrait être responsable de l'activation de cette voie lors de la stimulation des kératinocytes par le *calcium switch*.

## II.D. Interactions des canaux SOC avec TRPV6

Les résultats de cette thèse montrent que le processus de différenciation induit par le *calcium switch* est dépendant d'une régulation complexe des canaux impliqués dans le transport des ions  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytosol. Ces travaux se sont principalement intéressés à 3 canaux calciques largement étudiés dans la littérature. Les canaux Orai1 et TRPC1 sont considérés depuis plusieurs années comme des canaux SOC, activé par la vidange calcique réticulaire. Le canal TRPV6 a lui aussi était envisagé comme un canal impliqué dans cet influx de  $\text{Ca}^{2+}$  (199). Durant mes années de thèses j'ai eu l'occasion de travailler sur l'implication du canal TRPV6 dans les influx calciques induit par la vidange du RE dans un modèle de cellule cancéreuse de la prostate (Annexe, [article1](#)). Ces travaux mettent en évidence que ce canal serait régulé par sa translocation à la membrane plasmique par des influx de  $\text{Ca}^{2+}$  portés par STIM1 et Orai1. L'activité du canal TRPV6 pourrait donc être régulée par les canaux SOC. En ce qui concerne les kératinocytes, mes travaux montrent que le canal TRPV6 peut en effet être régulé par sa translocation à la membrane plasmique. Cependant, les mécanismes cellulaires stimulant cette translocation ne sont pas encore connus. Toutefois, de nombreux travaux mettent en évidence l'implication protéines partenaires sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ , comme les protéines S100 et les annexines, dans le transport de vésicules contenant TRPV6 à la membrane plasmique (177). Il serait donc envisageable que le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant par les canaux SOC puisse activer la translocation de TRPV6 à la membrane. Dans le cadre de la stimulation de la différenciation des kératinocytes par le *calcium switch*, ceci pourrait expliquer le rôle du canal Orai1 dans la première phase d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$ , tandis que le canal TRPV6 permettrait une entrée plus soutenue de  $\text{Ca}^{2+}$  par l'augmentation du nombre de canaux à la membrane. Les kératinocytes, une fois entrés dans un processus de différenciation, vont perdre l'expression du canal Orai1 et augmenter celle du canal TRPV6.

Le rôle du canal TRPC1 reste, quant à lui, assez flou. Il est peu exprimé dans les kératinocytes non-différenciés, mais il est pourtant impliqué dans les influx calciques stimulés par le *calcium switch* et à l'induction de la différenciation. Toutefois, il a été démontré que le courant SOC pouvait être dépendant de l'association des canaux Orai1 et TRPC1 (200). Il serait donc possible que le canal TRPC1 nécessite une association avec le canal Orai1 pour être fonctionnel dans les kératinocytes non différenciés, tandis qu'Orai1 pourrait être fonctionnel sans cette interaction. Cependant, il est observé que l'expression de TRPC1 est augmentée dans les kératinocytes différenciés, alors que le courant SOC est fortement



diminué. Il reste envisageable que ce canal maintienne un courant de faible amplitude mais nécessaire pour la conservation de certains mécanismes cellulaires importants qui sont régulés spécifiquement par le courant SOC.

### **Conclusion**

**Ces résultats confirment les rôles importants des canaux TRPC1, TRPV6 et Orai1 dans l'homéostasie calcique des kératinocytes humains, cependant, leur mode de régulation reste encore mal connu. Les différentes hypothèses exprimées dans cette partie ne sont basées que sur les résultats obtenus pour les canaux TRPC1, TRPV6 et Orai1, alors que d'autres canaux sont également exprimés dans les kératinocytes et pourraient aussi jouer un rôle dans la différenciation.**

## **III. Rôle des canaux perméables au calcium dans la physiopathologie de l'épiderme humain**

Les travaux de *Gwack, Y., S. Srikanth, et al.* en 2008, décrivant le phénotype des souris KO pour le gène codant pour Orai1, ont pour la première fois montré le rôle potentiel du canal Orai1 dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme. Ces souris présentaient des altérations du développement de l'épiderme caractérisées par un amincissement de la peau et une diminution du nombre et une altération de la morphologie des kératinocytes (168). Bien que le rôle du canal Orai1 dans la migration et la prolifération des kératinocytes ait maintenant été démontré, il n'existe aucune donnée mettant en relation ce canal avec une pathologie cutanée spécifique. Pourtant, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent une absence d'expression de ce canal dans des kératinocytes issus de peaux psoriasiques et de cancers baso-cellulaires. Il serait ensuite intéressant de savoir si ce défaut d'expression d'Orai1 est une conséquence de la survenue de la pathologie ou s'il en serait l'une des causes.

Un grand nombre de pathologies dermatologiques, telles que le psoriasis ou la dermatite atopique, sont caractérisées par une altération de la prolifération et/ou de la différenciation des kératinocytes de l'épiderme. Il a également été montré une altération du

gradient calcique au sein de l'épiderme de peaux psoriasiques, s'accompagnant d'une diminution de l'influx calcique de type SOCE (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry) (201). Une publication décrivant le phénotype des souris possédant une extinction du gène codant pour le canal TRPV6 rapporte entre autre une modification importante de la structure de l'épiderme due à une altération de la différenciation des kératinocytes, ainsi qu'une altération du gradient calcique intra-épidermique (150). Ces résultats, s'ajoutant à ceux montrant l'implication du canal TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes humains, permettent de proposer ce canal calcique comme une potentielle cible thérapeutique dans le traitement de certaines physiopathologies dermatologiques.

Des altérations du développement de l'épiderme peuvent également être liées au vieillissement naturel ou au vieillissement prématuré par exposition excessive aux rayons UV. Dans ces conditions il est observé une diminution de l'épaisseur de l'épiderme dû à un ralentissement du renouvellement cellulaire (202), ainsi qu'une cicatrisation plus lente. Ces observations reflètent une altération des mécanismes de prolifération, de migration et de différenciation des kératinocytes. De nombreux laboratoires sont intéressés de comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu lors de ces modifications de l'homéostasie tissulaire de l'épiderme. Or, les travaux effectués au cours de cette thèse démontrent l'implication du  $\text{Ca}^{2+}$  et des canaux calciques dans des différents mécanismes. Il serait donc intéressant d'évaluer l'implication des ce canaux dans les altérations de l'épiderme observées lors du vieillissement de la peau humaine. C'est ainsi que les laboratoires *Johnson&Johnson* se sont intéressés à nos travaux et ont débuté une collaboration visant à l'identification de cibles pharmacologiques potentielle dans le traitement ou la prévention des effets délétères du vieillissement cutané.

## **Conclusion**

**Pour résumer, les travaux réalisés au cours de cette Thèse montrent pour la première fois que :**

- **le canal Orai1 et la protéine réticulaire STIM1 sont exprimés dans les kératinocytes humains**
- **Orai1 et STIM1 participent au courant SOC observé dans les kératinocytes humains**
- **Orai1 et STIM1 ne sont pas indispensables à l'induction de la différenciation des kératinocytes humains**
- **Orai1 et STIM1 participent à la prolifération des kératinocytes humains**
- **Et enfin, Orai1 et STIM1 sont impliqués dans la migration des kératinocytes humains par leur participation dans la dynamique des adhésions focales**

**Ces travaux ont ainsi pu mettre en évidence qu'Orai1 et STIM1 sont des acteurs cruciaux de l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain.**

# PERSPECTIVES

*“The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds the most discoveries, is not 'Eureka!' (I found it!) but 'That's funny!'”*

**Isaac Asimov**

L'étude de l'implication des canaux calciques dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain n'a débuté que depuis très peu de temps, et les laboratoires travaillant sur ce sujet ne sont pas nombreux également. Toutefois, ce sujet n'en reste pas moins intéressant et prometteur.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse témoignent de du rôle majeur des influx calciques dans les mécanismes de différenciation, de prolifération et de migration des kératinocytes, et donc de leur implication dans le développement de l'épiderme. Cependant, de nombreuses questions restent en suspens. La poursuite de ces études est donc primordiale.

## **I. Régulation de la migration des kératinocytes humains par le canal Orai1**

Mes travaux mettent en évidence le rôle du canal Orai1 dans la migration des kératinocytes humains. Il serait en fait impliqué dans une voie de signalisation activé par l'EGF et permettant l'activation de la protéine FAK, via sa phosphorylation. Les travaux à venir devraient permettre de déterminer le rôle du  $\text{Ca}^{2+}$  passant par Orai1 ce mécanisme, c'est-à-dire qu'il faudra chercher à savoir quelles sont les cibles intracellulaires du  $\text{Ca}^{2+}$  traversant le canal Orai1 qui participent à la phosphorylation de FAK. De nombreuses protéines intracellulaires sont sensibles et régulées par le  $\text{Ca}^{2+}$ , par exemple, la calmoduline fixe le  $\text{Ca}^{2+}$  et peut activer certaines protéines kinases. Il sera donc intéressant de savoir si le  $\text{Ca}^{2+}$  entrant par Orai1 peut activer des protéines kinases impliquées dans la phosphorylation de FAK. Il faudra également vérifier si il existe un rapprochement subcellulaire entre le canal Orai1 et la protéine FAK, et peut-être même une interaction. Les intégrines jouant un rôle important dans l'activation de FAK, il serait intéressant de savoir si Orai1 co-localise avec des intégrines et si cette co-localisation intervient dans l'activation de FAK. Si ces résultats se confirment, cela montrerait qu'il est impliqué dans l'assemblage des adhésions focales permettant l'ancrage des cellules à leur support ou à la matrice extracellulaire.

Il faudra également étudier l'implication d'Orai1 dans l'activation de la calpaïne. La migration des kératinocytes est régulée par l'assemblage et le désassemblage des adhésions focales. La calpaïne est une protéine sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  intervenant dans le désassemblage des adhésions focales en clivant la protéine FAK. De plus, il est connu que l'EGF puisse activer

les calpaïnes. Ainsi, il sera intéressant de savoir si l'action de l'EGF sur l'activation des calpaïnes met en jeu l'implication du canal Orai1 et des influx calciques le traversant. Des travaux seront donc menés sur l'activité enzymatique des calpaïnes en fonction de l'état d'expression et de fonctionnalité du canal Orai1 en utilisant des siRNA et des inhibiteurs spécifiques du canal.

## **II. Rôle des canaux perméables au $\text{Ca}^{2+}$ dans la différenciation des kératinocytes**

Les travaux menés sur l'implication du canal Orai1 sur la différenciation des kératinocytes montrent que l'inhibition d'expression de canal n'empêche pas l'apparition des marqueurs de différenciation suite au *calcium switch*. La diminution de son expression serait en fait un déclencheur de la différenciation. La suite de ces travaux consistera à étudier les conséquences de la diminution de l'expression du canal Orai1 sur l'expression d'autres canaux calciques comme TRPV6 ou sur les marqueurs de différenciation eux-mêmes.

En ce qui concerne le canal TRPV6, la différenciation des kératinocytes est accompagnée de l'augmentation de son expression. Il faudra donc étudier les mécanismes intracellulaires induisant cette augmentation d'expression, à savoir si c'est le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique qui active ces mécanismes ou si d'autres éléments, comme le CaR ( $\text{Ca}^{2+}$  Receptor), sont impliqués. Nous tenterons également d'identifier le ou les rôle(s) du canal TRPV6 dans les cellules différenciées.

## **III. Interactions des différents canaux calciques exprimés dans l'épiderme humain**

Suite à mes travaux sur les effets du *calcium switch* à long terme, et l'implication des canaux TRPC1, TRPV6 et Orai1 dans les influx calciques consécutifs, de nombreuses hypothèses ont été émises. Il faudra donc tenter de comprendre comment ces différents canaux sont régulés au cours de la différenciation des kératinocytes humains par le *calcium*

*switch*. Des travaux sur les effets de l'inhibition sélective de chacun de ces canaux sur l'expression des autres permettront de savoir si l'inhibition de l'expression du canal Orai1 induit la surexpression de TRPV6 et/ou de TRPC1, et inversement. Il sera ensuite important de comprendre quelles sont les interactions entre les différentes protéines participant au courant de type SOC dans les kératinocytes :

- *Existe-t-il d'autres canaux membranaires pouvant participer au courant SOC ?*

En effet, bien que le rôle des protéines TRPC1, TRPC4 et Orai1 sont maintenant démontrés, d'autres pourraient également participer soit au courant lui-même soit dans la régulation du courant. Ainsi, le rôle des protéines Orai2, Orai3 et STIM2 sera étudié.

- *Est-ce que, comme dans d'autres types cellulaires, STIM1 active les canaux membranaires par des interactions directes ?*

Cela nécessitera d'étudier la relocalisation de STIM1 suite à la vidange calcique réticulaire, et si cette relocalisation induit son rapprochement des canaux membranaires. Le laboratoire est d'ores et déjà en possession de mutants du canal Orai1 et de la protéine STIM1, qui permettront de savoir comment STIM1 active le canal membranaire Orai1. Pour compléter cette étude, il faudra également obtenir des mutants d'autres canaux membranaires impliqués dans le courant SOC.

- *Qu'elle est la participation du canal TRPV6 dans le courant SOC ?*

Il a déjà été rapporté que les canaux TRPV6 participaient au courant SOC global dans certains types cellulaires. Des études sur l'implication de son expression dans le courant SOC des kératinocytes humains seront réalisées en utilisant les techniques de patch-clamp et d'imagerie calcique en présence de siRNA dirigés contre le canal TRPV6.

- *L'activation de TRPV6 par sa translocation à la membrane plasmique implique-t-elle la participation d'autres canaux, et si tel est le cas, par quels mécanismes intracellulaires ?*

Un article en préparation au laboratoire montre que, dans le cas de cellules cancéreuses prostatiques, TRPV6 est impliqué dans le courant SOC, toutefois, il n'est pas dépendant de la vidange calcique réticulaire mais de l'activité des canaux SOC membranaires. Ces résultats montrent que le canal TRPV6 est régulé par sa translocation à la membrane par l'intermédiaire des protéines S100 et annexines sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$ . Il sera donc intéressant de mettre en évidence si le même

mécanisme entre en jeu dans la translocation de TRPV6 et si l'expression et/ou la fonctionnalité des canaux SOC est nécessaire à cette dernière.

## **IV. implications des canaux calciques dans les pathologies dermatologiques et les effets du vieillissement**

Comme il a été dit précédemment, les canaux de la famille TRP ainsi qu'Orai1 participent à de nombreux processus physiologiques et par conséquent, la modification de leur expression et/ou de leur fonctionnalité peut être à l'origine de pathologies. De récents travaux ont même montré une modification de l'expression de TRPC1 ainsi que des influx calciques dans les kératinocytes de patients atteints de la maladie de *Darier*. De précédents travaux au laboratoire se sont portés sur le profil d'expression de certaines protéines TRP dans les carcinomes cutanés (carcinomes baso- et spinocellulaires) et ont montré l'absence d'expression de TRPC1 et TRPC4 dans ces pathologies. De même, l'expression du canal TRPV6, qui participe également à la différenciation induite par le  $Ca^{2+}$  et la vitamine D3, est perdue dans ces cancers de la peau. Or, l'aspect pathologique des carcinomes cutanés est partiellement lié à la perte du processus de différenciation à l'origine de la prolifération anarchique des kératinocytes. La perte d'expression des canaux TRP cités précédemment pourrait alors participer au phénotype pathologique des kératinocytes dans les carcinomes cutanés.

D'autres pathologies dermatologiques non cancéreuses, comme le psoriasis, sont également caractérisées par une altération de la différenciation et de la prolifération des kératinocytes. Dans cette pathologie complexe, entre autres choses, les cellules de la couche basale prolifèrent trop rapidement par rapport à la différenciation des cellules des couches suprabasales, conduisant à la formation d'un épiderme présentant de graves modifications structurales. Or, il a été rapporté que les kératinocytes psoriasiques sont caractérisés par une altération de l'influx capacitif de  $Ca^{2+}$ . Des résultats préliminaires, obtenus au laboratoire, confirment l'altération de l'entrée de type SOCE dans ces cellules ainsi que la diminution de l'expression du canal Orai1. Il serait donc intéressant de savoir si cette altération de l'expression du canal pourrait être une des causes de la survenue de la pathologie ou si ce n'est que l'une des nombreuses conséquences de son apparition.



Enfin, le vieillissement de la peau, qu'il soit naturel ou prématuré, implique des altérations du développement de l'épiderme. Pour comprendre quel est l'implication des canaux calciques dans ces modifications, il faudra comparer l'expression de ces différents canaux dans des peaux issues de personnes jeunes et de personnes plus âgées ainsi que des peaux exposées à différentes doses de rayons UV. Ceci sera réalisé en collaboration avec les laboratoires *Johnson&Johnson*.

**En conclusion, les perspectives relatives à l'étude des canaux calciques réalisée au cours de cette thèse concernent l'intégration de ces protéines et de leurs voies de signalisation dans le tissu sain et pathologique (carcinome, psoriasis, dermatite atopique). Ces perspectives nécessiteront donc l'acquisition et le développement de nouveaux outils permettant de travailler sur de l'épiderme *in vitro* et *in vivo* ainsi que d'étroites collaborations avec des laboratoires spécialisés dans le domaine de la dermatologie.**

# CONCLUSION GENERALE

*“The trouble with being educated is that it takes a long time; it uses up the better part of your life and when you are finished what you know is that you would have benefited more by going into banking.”*

**Philip K. Dick**

Les travaux que j'ai réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence la diversité de l'expression et des rôles des canaux calciques dans l'épiderme humain.

Ces résultats contribuent à mieux comprendre les mécanismes régulant le développement de l'épiderme humain. Ils confirment, tout d'abord, le rôle majeur du canal TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes, et montrent qu'il représente une cible de choix dans le traitement de pathologies dermatologiques liées à une altération de ce processus. De plus, ces travaux mettent en évidence la complexité des échanges calciques provoqués par le *calcium switch* qui provoquent la différenciation des kératinocytes humains.

De plus, les résultats obtenus lors de l'étude du canal Orai1 et de la protéine STIM1 confirment leur implication dans le courant de type SOC et montrent son rôle essentiel dans la migration et la prolifération des kératinocytes. Ces protéines représentent donc également des cibles importantes dans l'étude des altérations du développement de l'épiderme.

Enfin, les travaux de cette thèse soulignent la diversité des rôles de différents canaux calciques au sein d'un même tissu.

**Ces travaux soulignent donc l'intérêt capital de l'étude du rôle des canaux calciques dans l'homéostasie tissulaire de l'épiderme humain.**

# **PUBLICATIONS**

- 1 **M. Vandenberghe**<sup>1</sup>, V. Lehen'kyi<sup>1</sup>, M. Raphaël, D. Gordienko, T. Oddos, R. Skryma and N. Prevarskaya. 'Orai1 in skin homeostasis: role in keratinocyte polarized migration'. (En preparation) (2011)
- 2 **M. Vandenberghe**<sup>1</sup>, V. Lehen'kyi<sup>1</sup>, F. Belaubre, S. Julie, N. Castex-Rizzi, R. Skryma, and N. Prevarskaya, 'Acceleration of Keratinocyte Differentiation by Transient Receptor Potential Vanilloid (Trpv6) Channel Activation', *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 25 Suppl 1 (2011), 12-8.
- 3 **M. Vandenberghe**<sup>1</sup>, V. Lehen'kyi<sup>1</sup>, B. Beck<sup>1</sup>, M. Raphaël<sup>1</sup>, M. Flourakis, C. Romanin, R. Skryma and N. Prevarskaya. 'ER store depletion-independent activation of TRPV6 and its implication in SOCE'. (En preparation) (2011)
- 4 M. Flourakis<sup>1</sup>, V. Lehen'kyi<sup>1</sup>, B. Beck<sup>1</sup>, M. Raphael, **M. Vandenberghe**, F. V. Abeele, M. Roudbaraki, G. Lepage, B. Mauroy, C. Romanin, Y. Shuba, R. Skryma, and N. Prevarskaya, 'Orai1 Contributes to the Establishment of an Apoptosis-Resistant Phenotype in Prostate Cancer Cells', *Cell Death Dis*, 1 (2010), e75.
- 5 M. Monet<sup>1</sup>, V. Lehen'kyi<sup>1</sup>, F. Gackiere, V. Firlej, **M. Vandenberghe**, M. Roudbaraki, D. Gkika, A. Pourtier, G. Bidaux, C. Slomianny, P. Delcourt, F. Rassendren, J. P. Bergerat, J. Ceraline, F. Cabon, S. Humez, and N. Prevarskaya, 'Role of Cationic Channel Trpv2 in Promoting Prostate Cancer Migration and Progression to Androgen Resistance', *Cancer Res*, 70 (2010), 1225-35.

# **ANNEXE**

Mon laboratoire d'accueil ayant pour sujet principal l'étude du rôle des canaux ioniques dans l'apparition et la progression du cancer de la prostate, j'ai eu l'occasion de participer à certains des travaux effectués sur ce sujet. Ces études ont abouti à la publication de deux articles tandis qu'un troisième est en préparation. Aussi, les résultats obtenus sur les cellules prostatiques apportent de nouveaux éléments concernant la régulation des canaux ioniques et leur implication dans des processus physiologiques et peuvent contribuer à comprendre les mécanismes dans lesquels sont impliqués les mêmes canaux dans l'épiderme humains.

**Article 1 (en préparation): "ER store depletion-independent activation of TRPV6 and its implication in SOCE"**

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les protéines Orai1 et STIM1 sont des acteurs essentiels à la génération du courant SOC dans un modèle de cellules cancéreuses prostatiques. Dans ce modèle, le canal TRPV6 participe également au courant global induit par la vidange du RE. Il est en fait régulé par sa translocation à la membrane plasmique induite par l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les canaux SOC, mettant en jeu l'activation de l'annexine 1.

**Ces mécanismes d'interaction entre les canaux TRPV6, Orai1 et la protéine STIM1 pourraient également prendre place dans les kératinocytes humain. En effet, nos travaux sur l'épiderme ont montré que le canal TRPV6 pourrait être également régulé par sa translocation et qu'Orai1 et STIM1 était aussi impliqués dans les courant SOC. Il serait donc envisageable que la translocation de TRPV6 soit activée par l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les canaux SOC dans les kératinocytes.**

**Article 2 (CDD, 2010): Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells**

Cette étude montre que le canal Orai1 et la protéine STIM1 ainsi que le courant SOC sont impliqué dans l'apoptose d'un modèle de cellule cancéreuse prostatique. Ces résultats démontrent que ces protéines sont responsables de la résistance à l'apoptose d'un autre modèle de cellules cancéreuses prostatiques plus agressives.

**La pertinence de ces travaux par rapport au développement de l'épiderme humain est en relation avec des résultats préliminaires montrant une diminution de l'amplitude du courant SOC et de l'expression des canaux Orai1 dans des cellules de carcinome baso-**

cellulaire. Ainsi, comme dans les cellules prostatiques, Orai1 pourrait être impliqué dans la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses du carcinome baso-cellulaire.

**Article 3 (Cancer Res, 2010): Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance.**

Cette étude montre que la transition des cellules cancéreuses prostatiques vers un phénotype androgène-indépendant s'accompagne de la nouvelle expression du canal TRPV2. Le canal TRPV2 participe en fait à la migration et la métastase des cellules cancéreuses prostatiques.

**Ce canal est également exprimé dans les kératinocytes de l'épiderme humain. Peu d'études existent quant à son implication dans la physiologie de l'épiderme, il serait en fait impliqué dans les sensations de chaleur nociceptives. Toutefois, il serait intéressant d'étudier son rôle dans les mécanismes de migration, de prolifération ou de différenciation des kératinocytes humains.**



## Article 1

### “ER store depletion-independent activation of TRPV6 and its implication in SOCE “

**Matthieu Vandenberghe**<sup>\*</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>\*</sup>, Benjamin Beck<sup>\*</sup>, Maylis Raphaël<sup>\*</sup>, Matthieu Flourakis, Christoph Romanin, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya.

Article en préparation

\* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail

L'entrée majoritaire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules non-excitables est activée par la vidange calcique réticulaire, elle est appelée SOCE (Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry). De nombreuses études ont eu pour but d'identifier la nature moléculaire des canaux membranaires impliqués dans cet influx calcique. Ces dernières années, il a été proposé que les meilleurs candidats appartiennent à la superfamille des canaux TRP. Des résultats obtenus précédemment au laboratoire ont montré qu'au moins 3 des canaux de cette famille participent à ce courant dans un modèle de cellules prostatiques cancéreuses, les LNCaP (Lymph Node Carcinoma of Prostate). L'inhibition de l'expression des canaux TRPC1, TRPC4 ou TRPV6 diminue significativement l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  SOCE (152, 199). Toutefois, il n'a pas encore été montré que TRPV6 pouvait être directement activé par la vidange calcique réticulaire. TRPV6 est constitutivement actif à la membrane des cellules épithéliales cancéreuses, comme dans d'autres tissus (203). La présence du canal à la membrane est régulée par un ensemble de protéines comme Rab11a, WNK3, WNK4 ou des  $\beta$ -glucuronidase (135, 204).

D'autres parts, deux protéines importantes ont fait leur apparition dans l'étude des canaux SOC, STIM1 et Orai1. La première est une protéine localisé sur la membrane du RE, elle est sensible à la diminution de la concentration en calcium réticulaire et active les canaux SOC membranaires. Orai1 est un canal membranaire impliqué dans l'entrée SOCE dans les lymphocytes T.

Le but de cette étude est de savoir si le canal TRPV6 est directement activé par la vidange calcique réticulaire comme les autres canaux SOC ou si son activation met en jeu d'autres mécanismes, comme sa translocation.

### **Conclusion**

Cette étude met en évidence que les protéines Orai1 et STIM1 sont des acteurs essentiels à la génération du courant SOC dans notre modèle de cellules cancéreuses prostatiques. Il semblerait même qu'ils soient les constituants majoritaires de cet influx calcique. Cependant, les canaux TRPC1 et TRPV6 participent également dans le courant SOC, mais dans une moindre mesure. Ces résultats suggèrent donc une composition plus complexe du courant SOC et ferait donc intervenir au moins 3 canaux calciques connus.

Contrairement à TRPC1 et Orai1, TRPV6 n'interagit pas directement avec STIM1 suite à la déplétion des stocks réticulaires en  $\text{Ca}^{2+}$ . Toutefois, le nombre de canaux TRPV6 à la membrane plasmique est augmentée suite à la cette vidange et l'activation des canaux SOC. TRPV6 serait donc régulé par un mécanisme de translocation à la membrane plasmique.

D'autres résultats montrent que la translocation du canal est dépendante de l'expression des canaux SOC, et que seule la vidange du RE ne permet pas d'induire ce phénomène. Enfin, nous montrons que la translocation de TRPV6 à la membrane est régulée par la protéine sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  annexine 1.

# **ER STORE DEPLETION-INDEPENDENT ACTIVATION OF TRPV6 AND ITS IMPLICATION IN SOCE**

V'yacheslav Lehen'kyi<sup>1,2</sup>, Benjamin Beck<sup>1,3</sup>, Matthieu Vandenberghe<sup>1,2</sup>, Maylis Raphaël<sup>1</sup>,  
Matthieu Flourakis<sup>4</sup>, Christoph Romanin<sup>5</sup>, Roman Skryma<sup>2,6</sup> and Natalia Prevarskaya<sup>2,6</sup>.

**Inserm, U-800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer,  
Villeneuve d'Ascq, F-59655 France; Université des Sciences et Technologies de Lille  
(USTL), Villeneuve d'Ascq, F-59655 France.**

Running title: Activation of TRPV6 by SOC

Correspondence address : Natalia Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800,  
Bâtiment SN3, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; Tel.: 33-3-20-43-4077; Fax: 33-3-20-43-  
4066; E-mail: [Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr](mailto:Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr)

<sup>1</sup> The authors contributed equally to this work

<sup>2</sup> Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U800, Bâtiment SN3, USTL, 59655 Villeneuve  
d'Ascq, France.

<sup>3</sup> Present address: Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire  
(IRIBHM), Université Libre de Bruxelles (ULB); 808 route de Lennik, 1070 Bruxelles, Belgium.

<sup>4</sup> Present address: Center for Sleep and Circadian Biology, Department of Neurobiology and  
Physiology, Northwestern University, 2205 Tech Drive, #2-160, 60208 IL, Evanston.

<sup>5</sup> Institute for Biophysics, Johannes Kepler Universität Linz, Altenbergerstr. 69, A-4040 Linz, Austria

<sup>6</sup> Share senior authorship

Topic: Biological science – Cell biology

Key words: Orai1, Store Operated Calcium Entry, TRPV6, translocation, annexin1.

19 PAGES / 36177 characters / 5 Figures and 2 supplemental Figures

### **Abstract**

TRPV6 is a highly selective  $\text{Ca}^{2+}$  channel which has already been shown to be expressed in several tissues, including the intestine, kidney, pancreas and testis. TRPV6 has been shown to be involved in  $\text{Ca}^{2+}$  absorption in small intestine and kidney. Intriguingly, TRPV6 appears in prostate cancers while it is undetectable in healthy prostate or in benign prostate hyperplasia. Moreover, our group has recently demonstrated that this protein is involved in human prostate cancer epithelial cell proliferation. Nonetheless, the mechanism of TRPV6 activation it is still not clear.

Previous studies suggested that TRPV6 might be activated by ER Store depletion that occurs after production of the  $\text{InsP}_3$  pathway via G-Protein Coupled Receptors, thus making of TRPV6 a “Store Operated Channel”. However, these results are still controversial and several studies suggest that TRPV6 may be constitutively active when expressed in plasma membrane. Thus, we aimed at determining the relationship between ER store depletion and endogenous TRPV6 activation in a model of human prostate cancer epithelial cell.

In the present study, using patch clamp technique, siRNA strategy and target mutagenesis, we demonstrate that TRPV6 activation does not depend on ER store depletion by itself but on the activity of endogenous SOC channels. The latter are essentially composed of recently identified Orai1  $\text{Ca}^{2+}$  channel and TRPC1. By using cell surface biotinylation and confocal microscopy,

we demonstrate that SOC channels activity stimulates TRPV6 export to plasma membrane. Using gene extinction by siRNA, we show that the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive protein Annexin I is required for TRPV6 translocation to plasma membrane. Our study therefore demonstrates that TRPV6 belongs to a  $\text{Ca}^{2+}$  dependent cascade triggered by “Store Operated Channel” without being activated by ER store depletion. These results therefore unravel the complex mechanism of regulation of endogenous TRPV6 channel activity and characterize it as a non-store operated channel.

## Introduction

Store operated calcium entry (SOCE) is a mechanism which occurs after any procedure inducing depletion of Endoplasmic Reticulum (ER). This process triggers in order to refill internal  $\text{Ca}^{2+}$  stores and constitutes the main way to induce cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  increase in non-excitable cells (1). However, the molecular nature of Store Operated calcium Channels (SOC) is still a matter of debate (2). For the last 15 years, the best candidates for SOC channels belonged to the TRP channels family. Indeed, several groups have reported the involvement of members of the TRP channel family in SOCE, including TRPC1, TRPC2, TRPC4, TRPC5 and TRPV6 (3, 4). Our group had previously reported that at least three members of TRP channels were involved in endogenous SOCE in a model of human prostate cancer epithelial cells (5). We have demonstrated that downregulation of TRPC1, TRPC4 and TRPV6 expression by antisense oligonucleotides significantly decreases SOC current magnitude in LNCaP (Lymph Node Carcinoma of Prostate) cells (4, 5). Nonetheless, it is still not clear whether all of these ion channels are directly activated by ER store depletion. We recently reported that TRPV6 is constitutively active on plasma membrane of prostate cancer epithelial cells as it does in other epithelia (6, 7). In other tissues like intestine, TRPV6 plasmalemmal expression is regulated by several protein partners, like Rab11a, WNK3, WNK4 or  $\beta$ -glucuronidase (8-10). Despite recent advances in the understanding of the mechanisms underlying

channel activity and trafficking of TRPV6, its involvement in SOCE remains to be answered.

For the last three years, studies have shown that two proteins play a crucial role in SOCE and even seem to compose the "hard core" of SOC. The first protein is STIM1 (Stromal Interacting Molecule1) -a  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive protein expressed in ER membrane- which detects  $\text{Ca}^{2+}$  concentration decrease within the ER *via* an EF-hand domain in ER lumen and activates SOC following  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion (11). The second protein is Orai1, a  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channel which is necessary for SOCE in T-cells and carries the best characterized SOC current called CRAC (Calcium Release Activated Current) (12). Furthermore, data suggest that STIM1, Orai1 and TRPC1 channels may form functional protein complex and carry SOCE (13). Taken together, these data raise the question of the hypothetical interactions between STIM1, Orai1 and TRP channels in endogenous models.

In this study, we have used the LNCaP cell model, in which we had previously demonstrated that TRPV6 channels were involved in SOCE (4), with the aim of determining whether TRPV6 activation is triggered by ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion by itself or by downstream mechanisms. We report that TRPV6  $\text{Ca}^{2+}$  channel does not belong to the SOC ion channel family but is a protein whose activity is modulated by SOC. We therefore propose a mechanism in which ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion activates Orai1/TRPC1 mediated SOCE, which in turn activates  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive Annexin I and so, triggers cytoskeleton

reorganization and TRPV6 translocation to plasma membrane, thus leading to a modification of the global  $\text{Ca}^{2+}$  influx triggered following ER store depletion. Hence, this work unravels the mechanism linking TRPV6 activation to ER store depletion and characterizes TRPV6 as a non Store operated channels.

## Results

### *ER store depletion triggers a complex SOC current in epithelial prostate cancer cells.*

As we have previously reported, in our endogenous model, ER store depletion by Thapsigargin (TG) or  $\text{InsP}_3$  stimulates SOC currents ( $I_{\text{SOC}}$ ) with distinct kinetics and magnitude (Figure 1A and 1C) (5). To determine what are the ion channels involved in SOCE, we used siRNA strategy to inhibit the expression of each protein candidate. Three  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels putatively involved in  $I_{\text{SOC}}$  are expressed in LNCaP cells, TRPC1, TRPV6 and Orai1. Downexpression of Stim1 ER  $\text{Ca}^{2+}$  sensor decreased its expression at protein level by 75% (suppl. Figure 1C) and downexpression of Orai1  $\text{Ca}^{2+}$  channels decreased its expression by 80% (suppl. Figure 1A). Silencing of either Stim1 or Orai1, which are now considered as the “hard core” of SOC, inhibited both  $\text{InsP}_3$ - and TG evoked  $I_{\text{SOC}}$  by 80% (Figure 1A-D; n=15 per condition). This result shows that both proteins play a pivotal role in SOC current generation in epithelial prostate cancer cells. Nonetheless, downregulation of TRP channels also decreased  $I_{\text{SOC}}$  magnitude pointing to a composition of endogenous SOC wider than the couple Stim1/Orai1. So, siRNA against TRPC1 decreased TRPC1 protein expression by 75% (suppl. Fig. 1D) and SOC magnitude by 60% ( $61.2 \pm 10.1\%$ ; n=11). Beside, siRNA against TRPV6 decreased TRPV6 protein expression by 80% (suppl. Fig1B) and SOC magnitude by 50% ( $45 \pm 9.6\%$ ; n=14) thus demonstrating that TRPV6 is also involved in

SOCE. This result is confirmed by FURA-2  $\text{Ca}^{2+}$  imaging experiment which shows that in cells downexpressing TRPV6, SOCE magnitude is 2 times lower than in control conditions (suppl. Figure 1E). Hence, the composition of endogenous  $I_{\text{SOC}}$  in our model is rather complex and at least 3 different  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels are involved in the global current activated following ER store depletion, including TRPV6. We thus aimed at determining the mechanism of endogenous TRPV6 channels activation in LNCaP cells and its relationship with ER  $\text{Ca}^{2+}$  stores.

### *TRPV6 does not directly interact with ER calcium sensor STIM1*

To determine whether TRPV6 is directly activated by ER  $\text{Ca}^{2+}$  store, we investigated whether TRPV6 interacts with ER  $\text{Ca}^{2+}$  sensor STIM1. By performing Co-immunoprecipitation essays, we observed that Orai1 and STIM1 are constitutively tethered and that this interaction increases after TG triggered ER store depletion (suppl. Figure 2A,D). We observed a comparable interaction between TRPC1 and STIM1 (suppl. Figure 2B,E). On the opposite, we failed to detect any physical interaction between TRPV6 and STIM1, suggesting that TRPV6 is not activated directly by STIM1 following ER store depletion (suppl. Figure 2C,F).

### *TRPV6 is regulated by modulation of its level of expression on plasma membrane*

It has been previously demonstrated that, in different models, TRPV6 activity is modulated by the regulation of its cell surface

expression (14). We thus aimed at determining whether TRPV6 activity was modulated by the same mechanism in human prostate cancer epithelial cells. We have therefore performed cell surface biotinylation of LNCaP cells before and after TG evoked ER store depletion. So, we observed that in control conditions, TRPV6 is slightly expressed on cell surface and that TG-induced ER store depletion triggers an increase of TRPV6 plasmalemmal expression by 3 times (Figure 2A,B) after 2 minutes. This modification of TRPV6 cellular localization is confirmed by confocal microscopy which shows that while TRPV6 is mainly expressed in intracellular clusters in basal conditions, TG-evoked ER store depletion and SOCE triggers its gathering in plasma membrane (Figure 2C,D). These experiments show that TRPV6 translocation is transient and that in around 10 minutes, its expression on plasma membrane goes back to its normal level.

To determine whether TRPV6 translocation is triggered by store depletion itself or by SOCE, we performed the same experiment in a  $\text{Ca}^{2+}$  free medium or in a medium where  $\text{Ca}^{2+}$  is replaced by the same amount of  $\text{Ba}^{2+}$  (1.7mM). In both conditions, we observed a dramatic decrease of TRPV6 expression in plasma membrane suggesting that its stability at cell surface is dependent on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration (Fig2E and 2F). We have then measured the amount of TRPV6 on cell surface after TG treatment, nd depending on STIM1, Orai1 and TRPC1 downexpression by specific siRNA (Fig2E and 2F). So we observed that after STIM1 downexpression, when there is no SOC current

triggered by ER store depletion (Fig1A-D) and virtually no SOCE (supplementary Fig1F), TRPV6 expression on plasma membrane did not increase. This result suggests that TRPV6 is not “store operated”. In the same manner, in the absence of Orai1, TG-evoked ER store depletion failed to stimulate TRPV6 translocation to the cell surface (Figure2E and 2F). Moreover, we observed an analogue result after TRPC1 silencing, suggesting that TRPV6 translocation is triggered by the activity of Orai1/TRPC1 complex mediated  $\text{Ca}^{2+}$  influx. This putative pivotal role for TRPC1 is strengthened by data of Stim1 and Orai1 overexpression in LNCaP cells. Indeed, the overexpression of both Stim1 and Orai1 just slightly increases TRPV6 translocation to plasma membrane following ER store depletion (Fig3 A, B) while it significantly increases SOC current (suppl. Figure 3D), suggesting that alone, this couple of protein is not sufficient to induce translocation of TRPV6. On the opposite, co-transfecting Stim1 and Orai1 mutants, either for coil-coiled domain (L273S) responsible for Stim1-Orai1 interaction (15) or for an amino acid involved in Orai1 permeation (R91W) (16), blocked Orai1 mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (Figure 3E) and blocked TRPV6 translocation (Figure3A, B). Together, these observations point to the crucial role of Orai1/TRPC1 mediated SOCE in TRPV6 translocation.

#### ***Annexin I expression is necessary for TRPV6 translocation to the plasma membrane***

Several proteins have been shown to play a role in the regulation of TRPV6 activity.



The first partner proteins identified were annexin A2 and S100A10 which are involved in TRPV5 and TRPV6 translocation to plasma membrane (17). We therefore investigated expression of annexin and S100 proteins in our model and found that both AnnexinI (AnxI) and its partner S100A11 are expressed in LNCaP cells (Figure 4A, B).

Since AnnexinI function is  $Ca^{2+}$  dependent and is involved in membranes targeting and cross linking (18), we aimed at determining whether AnnexinI which is  $Ca^{2+}$  sensitive was involved in TRPV6 translocation. We have therefore used siRNA to specifically silence AnxI expression in LNCaP cells. After AnxI siRNA treatment which decreases AnxI mRNA expression by 90% (Fig 4B), we observed a significant decrease of TRPV6 expression in plasma membrane (Fig 4A). This decrease of TRPV6 expression correlates with an inhibition by 50% of  $I_{SOC}$  induced by TG and Insp3. The current magnitude in those conditions is comparable to the SOC current left after TRPV6 knockdown (Fig 4F-I). It had been shown that in neurons translocation of TRP channels from intracellular to plasma membrane was a rapid mechanism dependent on Rac1 Rho GTPase and PIP(5) kinase alpha (19). Now, since Rac1 is expressed in LNCaP cells as shown by RT-PCR (Fig4D), we aimed at determining whether this protein was also involved in TRPV6 translocation. Nonetheless, we failed to observe any decrease of TRPV6 translocation after Rac1 knockdown by siRNA (Fig 4C), suggesting that the mechanism of translocation is distinct from the one that rules

TRPC5 translocation in neurons.

## Discussion

In the present study, we have used siRNA strategy to determine what are the ion channels involved in endogenous SOCE of human prostate cancer epithelial cells. So we highlighted the complex composition of  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels participating in the generation of the  $I_{\text{SOC}}$ . Silencing of Stim1 ER  $\text{Ca}^{2+}$  sensor or Orai1  $\text{Ca}^{2+}$  channels which are now considered as the “hard core” of SOC, virtually abolished  $I_{\text{SOC}}$  thus demonstrating that both proteins play a pivotal role in  $I_{\text{SOC}}$  of epithelial prostate cancer cells. However, downregulation of TRP channels also decreased  $I_{\text{SOC}}$  magnitude pointing to a more complex composition of endogenous  $I_{\text{SOC}}$  involving several ion channels and not exclusively the Orai1/Stim1 complex. Indeed, siRNA against TRPC1 decreased SOC magnitude by 60% and siRNA against TRPV6 decreased SOC magnitude by 50%. Hence, the global current activated by ER store depletion in our model requires at least 3 different  $\text{Ca}^{2+}$  permeable channels. Yet, Orai1  $\text{Ca}^{2+}$  channels seem necessary for  $I_{\text{SOC}}$  while TRPV6 ion channels are involved in only half of  $I_{\text{SOC}}$  density. These observations therefore suggest that TRPV6 is activated downstream of the Orai1/Stim1 protein complex, thus making of TRPV6 not a “store operated” channel. We thus aimed at determining the mechanism that constitutes the link between Orai1/Stim1 and TRPV6 channels.

To determine whether TRPV6 is directly activated by ER  $\text{Ca}^{2+}$  store, we first investigated whether TRPV6 interacts with ER

$\text{Ca}^{2+}$  sensor Stim1. Several studies have well demonstrated how Stim1 senses the decrease in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration within ER lumen and subsequently activates Orai1  $\text{Ca}^{2+}$  channel on plasma membrane (20-22). By performing Co-immunoprecipitation essays, we observed that Orai1 and STIM1 are constitutively tethered and that this interaction increases after TG triggered ER store depletion. This observation is consistent with the results on Stim1/Orai1 interaction (for review see (23)). Importantly, we observed a comparable interaction between TRPC1 and Stim1. This suggests that in our model, TRPC1 may be gated by electrostatic interaction between TRPC1 with Stim1 as it occurred in HEK cells (24). Beside, our electrophysiological experiments (Figure 1) suggest that Orai1 expression is necessary for TRPC1 activation pointing to an interaction of Stim1, Orai1 and TRPC1 as a functional complex as proposed few years ago by Huang and colleagues (13) and a functional requirement for Orai1 in Stim1/TRPC1 interaction and function as in blood platelets and HEK cells (25, 26). On the opposite, we failed to detect any physical interaction between TRPV6 and Stim1, suggesting that TRPV6 is not activated directly by Stim1 following ER store depletion. Now, since Stim1 knockdown leaves the ER store depletion unchanged (suppl. Fig3E) but blocks  $I_{\text{SOC}}$  activation, it demonstrates that TRPV6 is not a “Store Operated Channel” but more a component of a “Store Operated Cascade” of ion channels activation.

It had been previously demonstrated that, in heterologous models, TRPV6 activity

is modulated by the regulation of its cell surface expression (14). We have therefore performed cell surface biotinylation of LNCaP cells before and after ER store depletion by TG. These experiments clearly show that TRPV6 surface expression is tightly modulated by ER store depletion. We indeed observed that in control conditions, TRPV6 is slightly expressed on cell surface and that TG-induced ER store depletion triggers an increase of TRPV6 plasmalemmal expression. Confocal microscopy experiments, also show that TRPV6 pattern of expression is modified after TG treatment. ER store depletion induces TRPV6 gathering near the plasma membrane. Cell surface biotinylation experiments show that TRPV6 translocation to cell surface is transient and that in around 10 minutes, TRPV6 expression on plasma membrane goes back to its initial level. In LNCaP cells, TRPV6 activity is therefore modulated by a mechanism of translocation to plasma membrane dependent on ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion and SOCE. As shown by Orai1 and TRPC1 knockdown which blocks TRPV6 translocation, the latter is not activated by ER store depletion *per se* but by the activity of Orai1/TRPC1 protein complex. By modulating cationic composition of extracellular medium, we show that it is likely the store operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx through Orai1/TRPC1 protein complex that stimulates TRPV6 translocation. Since this mechanism is  $\text{Ca}^{2+}$  dependent, it most probably relies on the activity of a  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive protein.

Several proteins play a role in the regulation of TRPV6 activity. The first partner

proteins identified were annexin A2 and S100A10, two  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive proteins which are involved in TRPV5 and TRPV6 translocation to plasma membrane (17). We investigated expression of annexin and S100 proteins in our model and found that both AnnexinI and its partner S100A11 are expressed in LNCaP cells. Knockdown of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive AnxI inhibits TRPV6 translocation and consequently, decreases magnitude of the current activated following ER store depletion by TG. Other proteins are involved in TRP channel trafficking, especially Rac1 and PIP(5) kinase  $\alpha$  which are involved in TRPC5 translocation to cell surface in neurons and whose activity is also  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive (19). Nonetheless, in spite of its expression in LNCaP cell, we fail to detect any variation of TRPV6 translocation after Rac1 knockdown (Fig. 4C), suggesting that the underlying mechanism of TRPV6 activation is distinct from the one described by *Bezzrides* and colleagues (19). Given the major role of these partner proteins, their pattern of expression determine how TRPV6 is modulated in different cell model. This might explain the discrepancies of the results reported in the different studies performed to date. Indeed, in prostate cancer epithelial cells, Jurkat and RBL cells, down regulation of TRPV6 significantly decrease SOC current (4, 27, 28) while in other studies performed in HEK and T-Lymphocytes TRPV6 activity is store independent and has distinct properties compared to classical SOC current (28, 29).

Taken together, these experiments highlight two distinct processes triggered by

ER store depletion. The first process is a direct activation of SOC channels, i.e Orai1 and TRPC1 in our model. The second process is the indirect activation of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive mechanisms, including TRPV6 translocation to plasma membrane which modifies the global  $\text{Ca}^{2+}$  influx that will help refill the ER stores and probably activate specific pathways. As we reported in a recent study TRPV6 indeed specifically stimulates NFAT signalling pathway in epithelial prostate cancer cells (6).

By doing these experiments, we highlight 2 distinct processes triggered by ER store depletion, the first directly, the second, indirectly. The first part is the activation of SOC channels, i.e Orai1 and TRPC1 in our model which constitute the SOC channels. The second part is the activation of  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive mechanisms, including TRPV6 translocation to plasma membrane which modifies the global  $\text{Ca}^{2+}$  influx that will help refill the ER stores and probably activate their own pathway. Indeed, in a recent study we showed the relationship between TRPV6 and NFAT signalling pathway in epithelial prostate cancer cells (6).

TRPV6 translocation is  $\text{Ca}^{2+}$  dependent mechanism and in our electrophysiological recordings condition, we used a combination of  $\text{Ca}^{2+}$  buffers (5mM EDTA/10mM BAPTA) which may thwart this process. In spite of it, TRPV6 translocation is not blocked by this large amount of chelators suggesting a very high proximity between the source of  $\text{Ca}^{2+}$  increase and  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive proteins that regulate TRPV6 translocation, most probably AnnexinI. This hypothesis is strengthened by the

recent study of *Jardin* and colleagues which showed that TRPC1 is localized in lipid raft domains and interacts with Stim1 and Orai1 (30). It is therefore very likely that TRPC1, Orai1 and Stim1 are clustered in specific area of the cell and that  $\text{Ca}^{2+}$  sensors such as AnnexinI and TRPV6 are localized nearby.

To distinguish whether TRPV6 translocation is triggered by store depletion or by SOCE, we have performed cell surface biotinylation in a  $\text{Ca}^{2+}$  free medium or in a medium where  $\text{Ca}^{2+}$  had been replaced by the same amount of  $\text{Ba}^{2+}$  (1.7mM). In these conditions, we observed a dramatic decrease of TRPV6 expression in plasma membrane suggesting that its stability at cell surface is dependent on extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. We have then measured the amount of TRPV6 at cell surface after TG treatment depending on STIM1, Orai1 and TRPC1 downexpression by siRNA strategy (Fig2E and 2F). We observed that after STIM1 downexpression, when there is no SOC current (Fig1A-D) and no SOCE in spite of an unchanged ER store depletion (Fig. 1F), TRPV6 expression on plasma membrane does not increase after stimulation by TG. Since TRPV6 does not interact with Stim1, this result suggests that TRPV6 is not “store operated”. In the same manner, in the absence of Orai1, TG evoked Store depletion failed to stimulate TRPV6 translocation to the cell surface. TRPV6 translocation seems therefore to be dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  influx from the extracellular medium *via* Orai1. Moreover, our results also hint at an involvement of TRPC1 in this process, since TRPC1 knockdown inhibits TG-induced TRPV6

translocation. TRPC1 co-expression with Stim1 and Orai1 as well as its expression in a specific microdomain, could be a limiting element in TRPV6 recruitment. This is strengthened by the observation that Stim1 and Orai1 overexpression leads to a huge increase in  $I_{SOC}$  (Fig 3D, F) but does not increase the amount of TRPV6 that is translocated to plasma membrane after ER store depletion.

In conclusion, we demonstrate that TRPV6 is not a store operated channel *stricto sensu* but that its activity depends on a mechanism of translocation to the cell surface that is triggered by the SOCE. This latter is carried by Orai1 and TRPC1 and dependent on STIM1 expression and coupling with Orai1, confirming the strong functional relationship that exists between these three proteins (31). One should therefore consider Orai1 and TRPC1 as the “hard core” of endogenous SOC in prostate epithelial cells. Nevertheless, their activity triggers other  $Ca^{2+}$  dependent mechanisms including activation of other ion channels which participate to the global  $Ca^{2+}$  influx. Here, we confirm that TRP channels, especially TRPV6, play a pivotal role in  $I_{SOC}$  but is not by definition a SOC channel. Hence, depending on the pattern of expression of  $Ca^{2+}$  sensitive proteins and their subcellular localization, Orai1/TRPC1 carried  $Ca^{2+}$  influx will be able to recruit different ion channels. In the same manner, depending on TRPV6 partner proteins expression, this channel might be differently activated. This might explain the discrepancies concerning TRPV6 activation by ER store depletion depending on the cell model. In cells expressing proteins able to

maintain TRPV6 into premembrane vesicles, TRPV6 overexpression would induce an increase in SOCE by increasing the amount of TRPV6 recruitable by SOC mediated  $Ca^{2+}$  entry. On the opposite, in cells that do not express those proteins, TRPV6 overexpression would lead to a constitutive TRPV6 current that would be insensitive to ER store depletion and SOCE. Finally, TRPV6 by itself is modulated by the ion channels localized nearby, as our group recently show for IKCa1 potassium channels that physically interacts with TRPV6 and modulates its activity by increasing  $Ca^{2+}$  driving force in this microdomain (32). Hence, study of endogenous  $I_{SOC}$  provides evidences that TRPV6 is not a store operated channel and highlight the complexity of ion channels scaffolds that defines  $Ca^{2+}$  signature.

## Material and methods

### *Cell culture*

Human LNCaP (lymph node cancer of the prostate) cell line from American Type Culture Collection (ATCC) was cultured in RPMI medium (Gibco-BRL, CergyPontoise, France) supplemented with 10% foetal calf serum and containing kanamycin (100 µg/ml) and L-glutamine (2 mM). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> 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 confluence. For the experiments, cells were seeded in 6-well plates for PCR and western-blotting and in 35 mm dishes for patch-clamp recordings.

### *Electrophysiology and solutions*

Macroscopic currents in LNCaP cells were recorded in the whole cell configuration of the patch-clamp technique as described previously (33).

The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM) 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 10 HEPES, pH 7.3 adjusted with TEA-OH, osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-Mannitol. The pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs Methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid), 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.2 with CsOH and osmolarity 295 mOsm/kg adjusted with D-Mannitol). Necessary supplements were added directly to the respective solutions from appropriately

stock solutions.

### *SDS-PAGE and 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 MgCl, 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% bromphenol 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, and anti-TRPC1 antibodies (Alomone Labs Ltd., 1/200), anti-STIM1 (BD Biosciences ThermoFisher, 1/200), and mouse monoclonal anti-β-actin (Lab Vision Co., 1/1000) antibodies. In the case of TRPV6 antibody, the different batches were tested using the lysates of HEK cells transfected with TRPV6-YFP fusion protein. Only that batch which matched the band corresponding to the TRPV6-YFP fusion protein co-detected with anti-GFP antibody (Abcam, 1/1000) was used in the study. 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).

### ***Biotinylation***

After the treatment cell dishes were immediately put on ice and the medium was replaced by an ice-cold PBSB solution containing 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=8, washed once, and incubated with PBSB solution containing 2 mM biotin (Pierce, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin) for 30 minutes at 4°C. Cells were then washed once with PBSB solution containing 0.1% BSA, and lysed with ice-cold lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. Biotinylated proteins were precipitated using neutravidin-agarose beads (Pierce, Rockford, IL, USA), eluted with SDS-PAGE loading buffer and subjected to SDS-PAGE as described above.

### ***RT-PCR***

The RT-PCR experiments were performed as previously described (34). The PCR primers used to amplify hSTIM1, hOrai1, TRPC1, TRPV6 cDNAs as well as the primers for  $\beta$ -actin are specified in Table 1.

### ***Immunocytochemistry***

LNCaP cells grown on the glass coverslips were treated with 1  $\mu$ M TG for 2 min and immediately fixed in 4% 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<sup>®</sup> 488 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 63X1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature. Both channels were excited, collected separately and then merged using software Carl Zeiss LSM Image Examiner.

### ***Plasmids***

pcCFP-C1-hSTIM1 wild type, pcYFP-C1-hOrai1 wild type, pcYFP-C1-hOrai1(L273S), and pcYFP-C1-hOrai1(E106Q) were designed as described (Frischauf et al.; 2009). Human TRPV6 (Accession No: NM\_018646) was cloned into pGEM-T-Easy vector (Promega, USA), using human kidney total mRNA library (Clontech, USA). The cloned TRPV6 was sequenced (Genoscreen, France), and EcoRI sites were used to subclone TRPV6 into MCS1 of pIRES vector (Clontech, USA). The specific primers containing F1- EcoRI recognition site and the backward primer containing the mutated stop codon (TGA→TTA(Leu)) as well as SalI recognition site were designed.

The whole TRPV6 molecule containing EcoRI and SalI ends was amplified, digested with the corresponding restriction enzymes (NEB, USA) and subcloned in frame into pEYFP-N1 vector (BD Biosciences Clontech) resulting in TRPV6-eYFP fusion protein. The final pTRPV6-eYFP vector was sequenced (Genoscreen, France), nucleofected into both LNCaP and HEK-293

cells and the functionality of TRPV6-eYFP fusion protein was tested using the patch-clamp experiments. This fusion protein was also used to screen for different batches of anti-TRPV6 antibody.

#### *siRNA and plasmid transfections*

LNCaP cells were transfected overnight with 60 nM of siRNAs per well using “jet SI-Endo” (Polyplus-Transfection SA, Illkirch, France) in a final volume of 1.5 ml. Ready-to-use siRNAs (processing option:A4) were synthesized by Dharmacon Research Inc (Lafayette, USA)(see Table 1). Nucleofection of plasmids was carried out using Nucleofector (Amaxa GmbH, Köln, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Briefly, 2 µg of each vector were transfected into 2 millions of trypsinized cells, which then were plated onto plastic dishes. LNCaP cell were left at least 48 hours to recover before experiments were conducted.

#### *Reagents*

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

#### *Statistics*

Data were expressed as mean±SD. Statistical analysis were carried out using Student's unpaired *t*-tests.  $P<0.05$  indicates statistical significance.



## Figure legends

### **Figure 1: Involvement of TRPC1, TRPV6 and Orai1 channels in SOC current.**

A. Time courses of  $I_{SOC}$  development measured at -100 mV holding potential in response to dialysis of 100  $\mu$ M  $InsP_3$  in control LNCaP cells (black circles), and in LNCaP pretreated with siRNA against either -Orai1 (grey triangles), -STIM1 (white squares), -TRPC1 (grey circles), or TRPV6 (white triangles). B. Histogram summarizing the normalized density of  $InsP_3$  activated SOC following treatment with siRNA targeting Orai1, STIM1, TRPC1 or TRPV6. C. Same experiment as in (A) but using EGTA 5mM and thapsigargin (TG) 1 $\mu$ M to deplete ER  $Ca^{2+}$  stores and activate  $I_{SOC}$ . D. Histograms summarizing EGTA/TG activated  $I_{SOC}$  normalized density in control LNCaP or LNCaP cells pretreated with siRNA against either -Orai1, -STIM1, -TRPC1, or TRPV6.

### **Figure 2: The study of STIM1 interaction with Orai1, TRPC1, and TRPV6 upon ER store depletion.**

A. STIM1 co-immunoprecipitation with Orai1 (A), TRPC1 (B), and TRPV6 (C) in control and ER-depleted conditions using 1  $\mu$ M TG for 1 min. The respective controls for co-immunoprecipitation of STIM1 by Orai1 (D), TRPC1 (E), and TRPV6 (F) are indicated.

### **Figure 3: TRPV6 activity is modulated by its cell surface expression.**

A. Translocation of TRPV6 channel to the plasma following ER store depletion using 1  $\mu$ M TG. B. Histogram summarizing the variation of TRPV6 expression in plasma

membrane. Values are normalized by the level of TRPV6 expression in plasma membrane in unstimulated cells. C. Immunofluorescence experiment representing TRPV6 expression (green) in unstimulated LNCaP cells. Cells were stained using rabbit anti-hTRPV6 antibody and Alexa Fluor488 coupled goat anti-rabbit secondary antibody. D. Same as in (C) after treatment of LNCaP cells with 1 $\mu$ M of thapsigargin. E. Western-Blot experiment for TRPV6 expression in LNCaP membranes (membrane) and in total LNCaP lysate (total) under the following conditions: siRNA against TRPC1 (siTRPC1), Orai1 (siOrai1) or Stim1 (siStim1) as well as in a  $Ca^{2+}$  free medium (0  $Ca^{2+}$ ) or in a medium where  $Ca^{2+}$  had been replaced by the same amount of Barium (1,7 mM  $Ba^{2+}$ ). F. Histogram summarizing the variation of TRPV6 expression in plasma membrane. Values are normalized by the level of TRPV6 expression in plasma membrane in unstimulated cells. G. Western-Blot experiment for TRPV6 expression in LNCaP membranes (membrane) and in total LNCaP lysate (total) under the following conditions: empty vector (pMax), plasmid coding for Stim1 and Orai1 (Stim1 wt / Orai1 wt), plasmid coding for Stim1 and Orai1 mutated for its coil coiled domain (Orai c-c), plasmid coding for Stim1 and Orai1 mutated in a region involved in its permeation (Orai1 p-m). H. Histogram summarizing the variation of TRPV6 expression in plasma membrane measured in (G). Values are normalized by the level of TRPV6 expression in plasma membrane in unstimulated cells. I. Control fluorescence images of chimeras-transfected

cells as well as control pMax plasmid. The numbers a to d correspond to as indicated in (H).

**Figure 4: Annexin I is necessary for TRPV6 translocation to plasma membrane.**

A. RT-PCR experiment showing expression of S100A11 in LNCaP cells. B. RT-PCR showing expression AnnexinI in LNCaP cells under control conditions and after treatment with siRNA against AnxI. C. Western blot experiment showing expression of TRPV6 in plasma membrane (membrane) and in total LNCaP lysate (total) in control conditions (siRNA#1) and after treatment with siRNA against ANXI (siANXI). D. Time course of InsP3 (100 $\mu$ M) evoked current in LNCaP under control conditions (siCTRL – black circles) and after treatment with siRNA against ANXI (siANXI – grey triangle) using patch clamp recording. E. Histogram summarizing the magnitude of InsP3 evoked current in LNCaP cells in control conditions (siCTRL) and after treatment with siRNA against ANXI (siANXI). F. Time course of TG (1 $\mu$ M) evoked current in LNCaP under control conditions (siCTRL – black circles) and after treatment with siRNA against ANXI (siANXI – grey triangle) using patch clamp recording. G. Histogram summarizing the magnitude of TG evoked current in LNCaP cells in control conditions (siCTRL) and after treatment with siRNA against ANXI (siANXI).

**Figure 5: Scheme summarizing the mechanism of endogenous TRPV6 activation.**

After ER Calcium store depletion by activation of InsP3 receptors or inhibition of SERCA pumps by Thapsigargin (TG), Stim1 detects

the decrease of Ca<sup>2+</sup> concentration within ER lumen and activates Orai1 and TRPC1 store operated channels (SOC). Subsequently, the local cytosolic calcium increase activates Ca<sup>2+</sup> sensitive protein annexin I which in turn stimulates TRPV6 translocation to plasma membrane that induces a supplemental Ca<sup>2+</sup> entry.

## REFERENCES

1. Nilius, B. (2004) *Sci STKE* **2004**, pe36.
2. Potier, M. & Trebak, M. (2008) *Pflugers Arch* **457**, 405-15.
3. Yuan, J. P., Zeng, W., Huang, G. N., Worley, P. F. & Muallem, S. (2007) *Nat Cell Biol* **9**, 636-45.
4. Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2003) *J Biol Chem* **278**, 15381-9.
5. Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2004) *J Biol Chem* **279**, 30326-37.
6. Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2007) *Oncogene* **26**, 7380-5.
7. Nijenhuis, T., Hoenderop, J. G. & Bindels, R. J. (2005) *Pflugers Arch* **451**, 181-92.
8. Zhang, W., Na, T. & Peng, J. B. (2008) *Am J Physiol Renal Physiol* **295**, F1472-84.
9. Lu, P., Boros, S., Chang, Q., Bindels, R. J. & Hoenderop, J. G. (2008) *Nephrol Dial Transplant* **23**, 3397-402.
10. van de Graaf, S. F., Chang, Q., Mensenkamp, A. R., Hoenderop, J. G. & Bindels, R. J. (2006) *Mol Cell Biol* **26**, 303-12.
11. Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A. & Cahalan, M. D. (2005) *Nature* **437**, 902-5.
12. Soboloff, J., Spassova, M. A., Tang, X. D., Hewavitharana, T., Xu, W. & Gill, D. L. (2006) *J Biol Chem* **281**, 20661-5.
13. Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S. & Worley, P. F. (2006) *Nat Cell Biol* **8**, 1003-10.
14. van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G. & Bindels, R. J. (2006) *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F1295-302.
15. Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., Kahr, H., Madl, J., Gruber, H., Groschner, K. & Romanin, C. (2008) *J Biol Chem* **283**, 8014-22.
16. Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. & Rao, A. (2006) *Nature* **441**, 179-85.
17. van de Graaf, S. F., Hoenderop, J. G., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B. & Bindels, R. J. (2003) *Embo J* **22**, 1478-87.
18. Seemann, J., Weber, K. & Gerke, V. (1996) *Biochem J* **319** ( Pt 1), 123-9.
19. Bezzèrides, V. J., Ramsey, I. S., Kotecha, S., Greka, A. & Clapham, D. E. (2004) *Nat Cell Biol* **6**, 709-20.
20. Feske, S. (2009) *Immunol Rev* **231**, 189-209.
21. Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E. & Lewis, R. S. (2009) *Cell* **136**, 876-90.
22. Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. & Kinet, J. P. (2006) *Nat Cell Biol* **8**, 771-3.
23. Fahrner, M., Muik, M., Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Frischauf, I. & Romanin, C. (2009) *Immunol Rev* **231**, 99-112.
24. Kim, M. S., Zeng, W., Yuan, J. P., Shin, D. M., Worley, P. F. & Muallem, S. (2009) *J Biol Chem* **284**, 9733-41.
25. Cheng, K. T., Liu, X., Ong, H. L. & Ambudkar, I. S. (2008) *J Biol Chem* **283**, 12935-40.
26. Jardin, I., Lopez, J. J., Salido, G. M. & Rosado, J. A. (2008) *J Biol Chem* **283**, 25296-

- 304.
27. Cui, J., Bian, J. S., Kagan, A. & McDonald, T. V. (2002) *J Biol Chem* **277**, 47175-83.
  28. Schindl, R., Kahr, H., Graz, I., Groschner, K. & Romanin, C. (2002) *J Biol Chem* **277**, 26950-8.
  29. Voets, T., Prenen, J., Fleig, A., Vennekens, R., Watanabe, H., Hoenderop, J. G., Bindels, R. J., Droogmans, G., Penner, R. & Nilius, B. (2001) *J Biol Chem* **276**, 47767-70.
  30. Jardin, I., Salido, G. M. & Rosado, J. A. (2008) *Channels (Austin)* **2**, 401-3.
  31. Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., Gill, D. L. & Ambudkar, I. S. (2007) *J Biol Chem* **282**, 9105-16.
  32. Lallet-Daher, H., Roudbaraki, M., Bavencoffe, A., Mariot, P., Gackiere, F., Bidaux, G., Urbain, R., Gosset, P., Delcourt, P., Fleurisse, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Mauroy, B., Bonnal, J. L., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2009) *Oncogene* **28**, 1792-806.
  33. Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2006) *FASEB J* **20**, 1215-7.
  34. Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2007) *Oncogene*.

**Table I**  
**Primers and siRNA**

No	Name, Accession No	Forward (5'....3')	Backward (5'....3')	Expected Size (b.p)
1.	ORAI1, NM_032790	CTTCAGTGCCTGCACCACAG	CCTGGAAGTTCGGTCAGTC	448
2.	RAC1, NM_006908	GCTTATGGGATACAGCTGGAC	CTCTCCCTTCTTCACGGG	399
3.	ANX I, NM_000700	CTGTGAAGTCATCCAAAGGTG	CTTCAGTTCCTCTGTAGACC	412
4.	S100A11, NM_005620	CAGCCCTACAGAGACTGAGC	CCTTGAGGAAGGAGTCATGG	277
5.	$\beta$ -Actin, NM_001101	CAGAGCAAGAGAGGCCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	209
6.	siTRPV6, NM_018646	5'-CCUGCUCAGCAGAAGAGG(dTdT)-3' (position 111-129 from ATG)		
7.	siRac1, NM_032790	5'-GAUAAAGACACGGAUCGAGAdTdT-3' (position 364-383 from ATG)		
8.	siANX I, NM_000700	5'-ACUCCAGCGCAAUUUGAUGdTdT-3' (position 414-432 from ATG)		
9.	siTRPC1, NM_003304	5'-GGGUGACUAUUAUUGGUUdTdT-3' (position 170-188 from ATG)		
10.	siSTIM1, NM_003156	5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)-3' (position 578-596 from ATG)		
11.	siOrai1, NM_032790	5'-UGAGCAACGUGCACAUCU(dTdT)-3' (position 451-469 from ATG)		

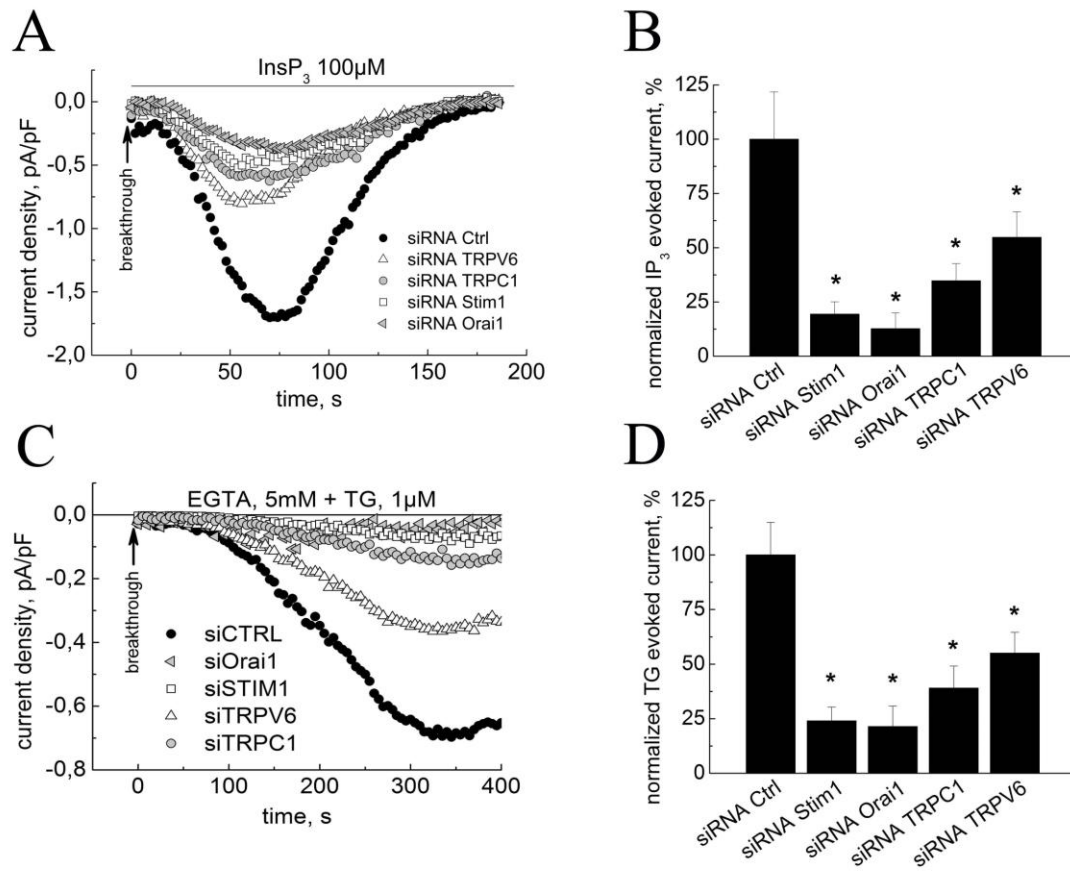


Fig. 1

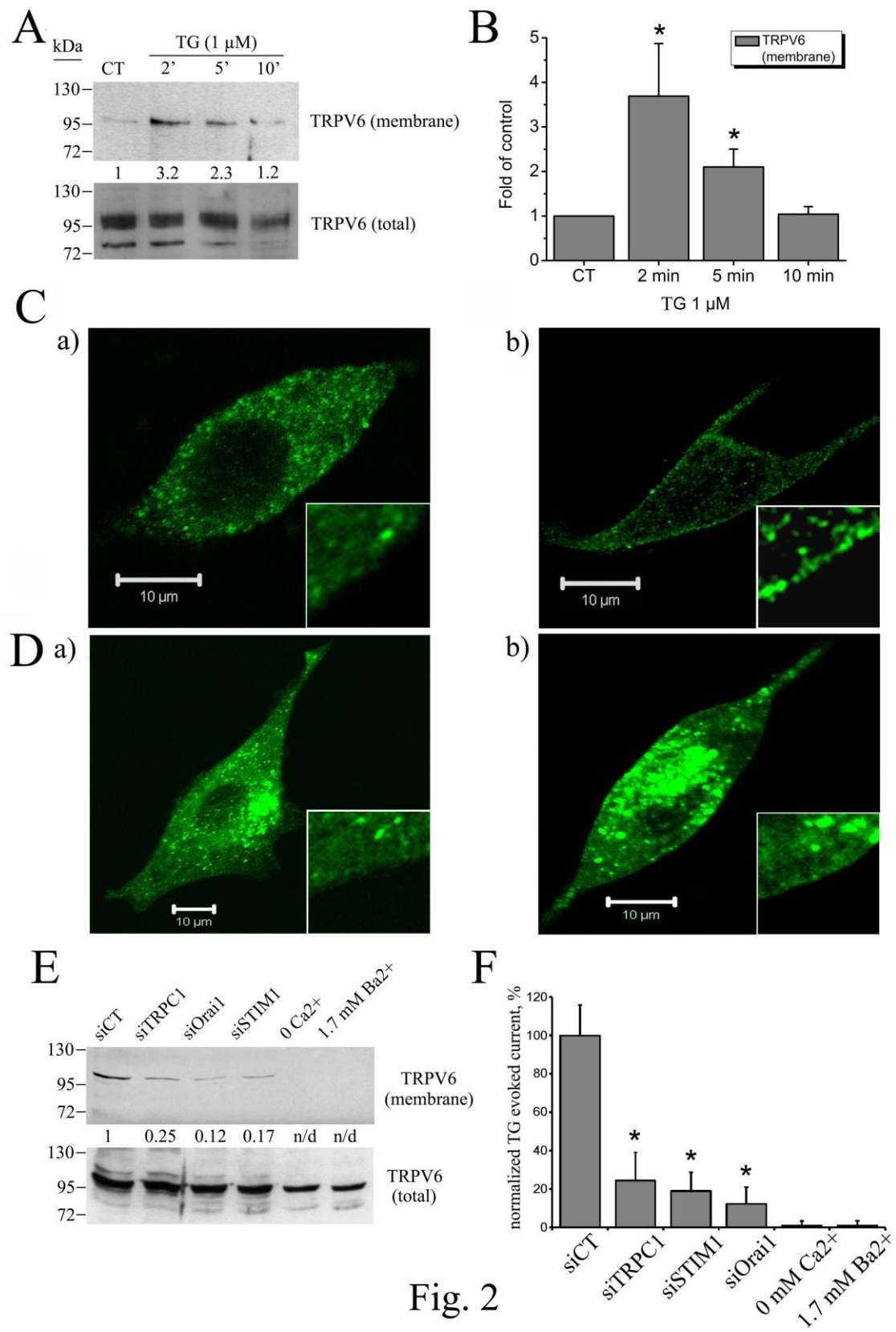


Fig. 2

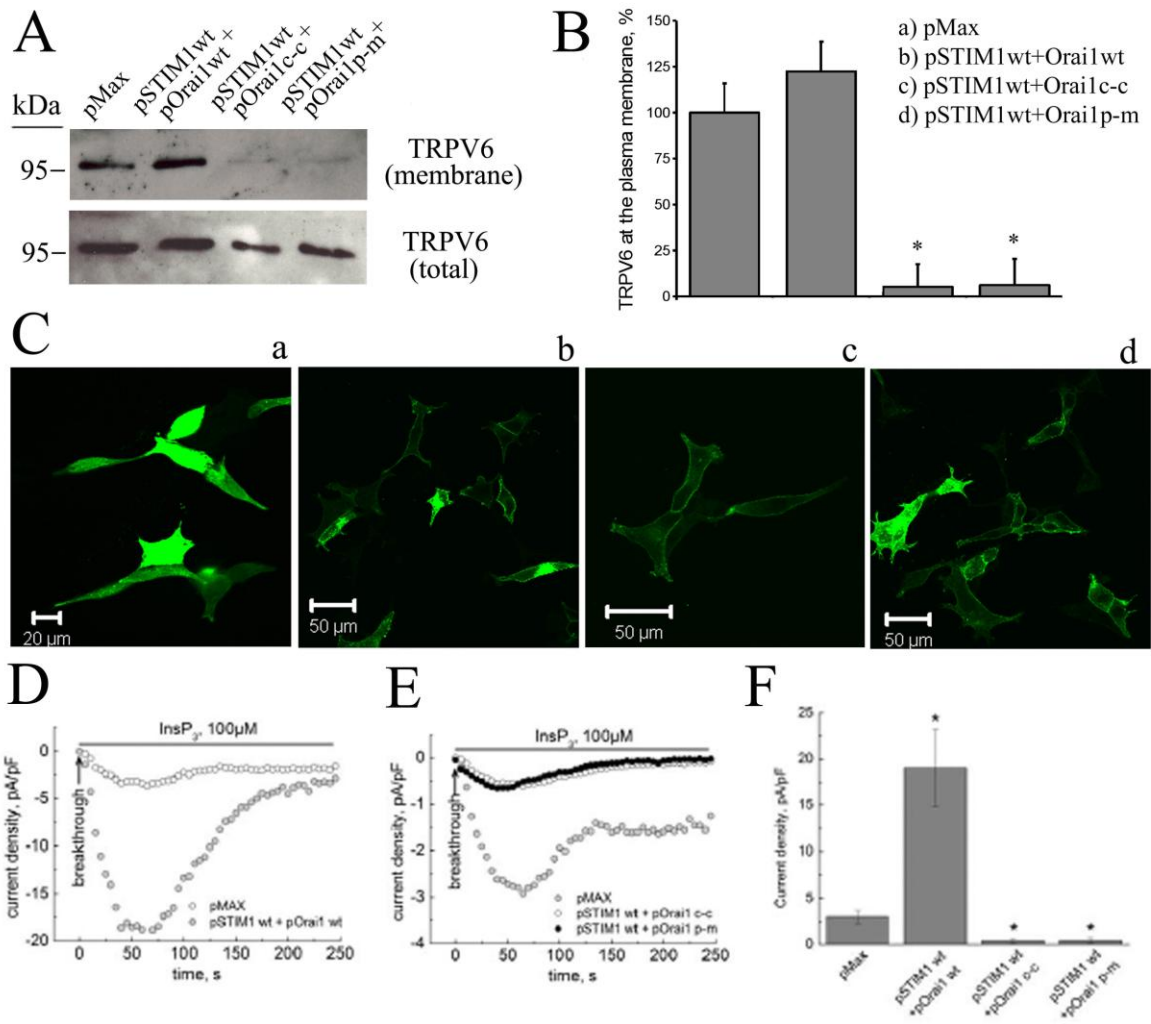


Fig. 3



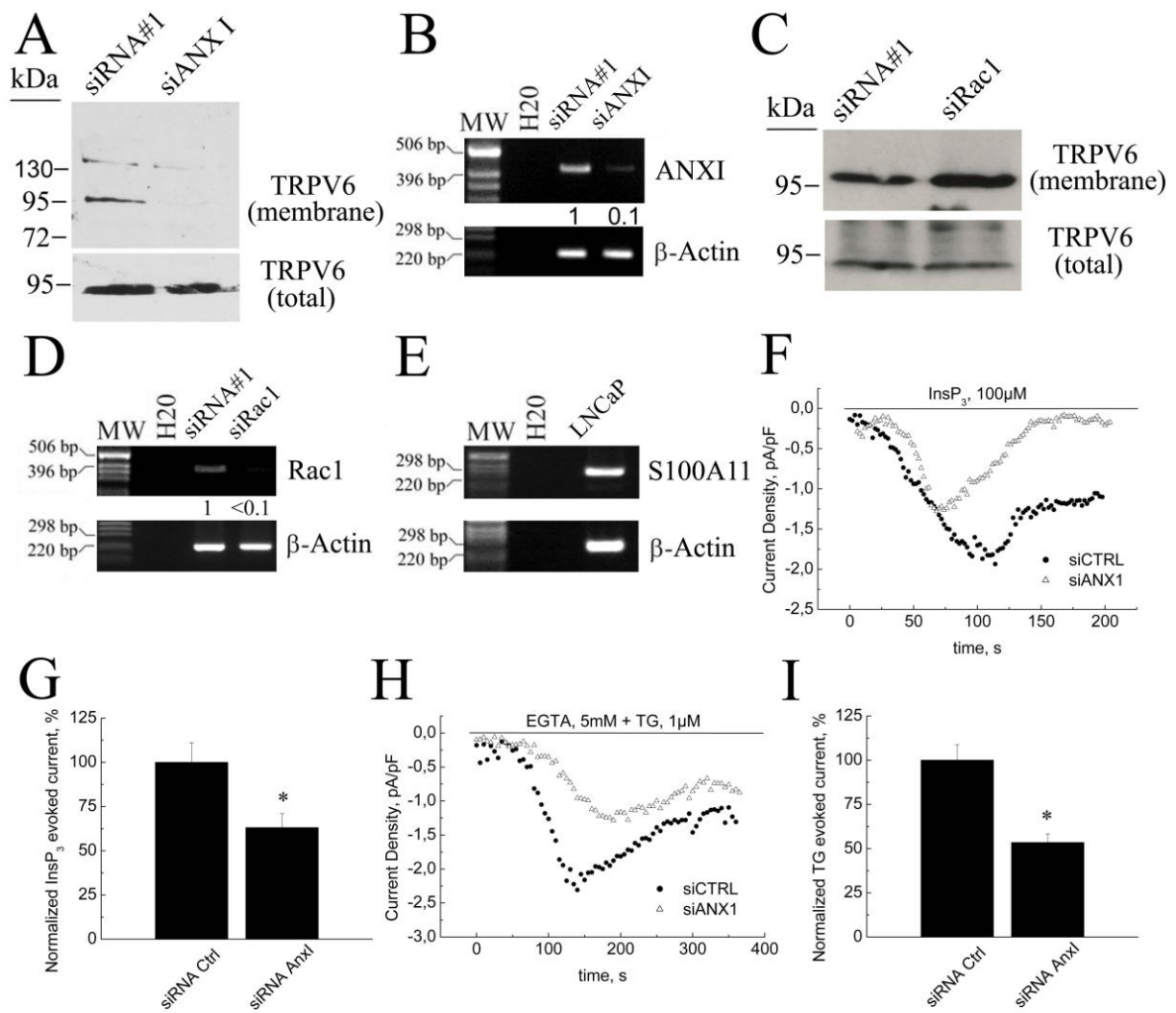


Fig. 4

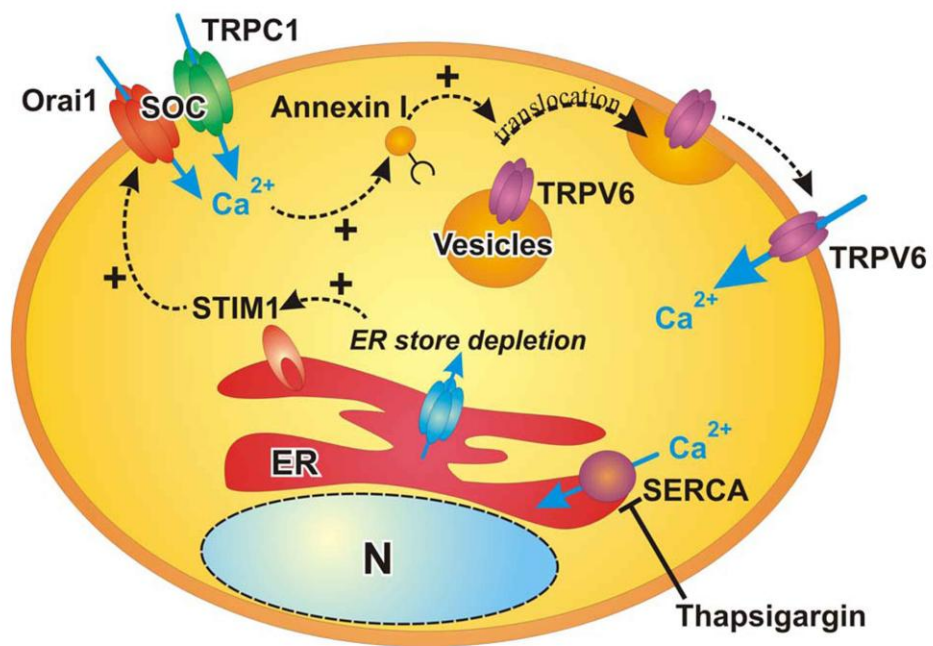


Fig. 5

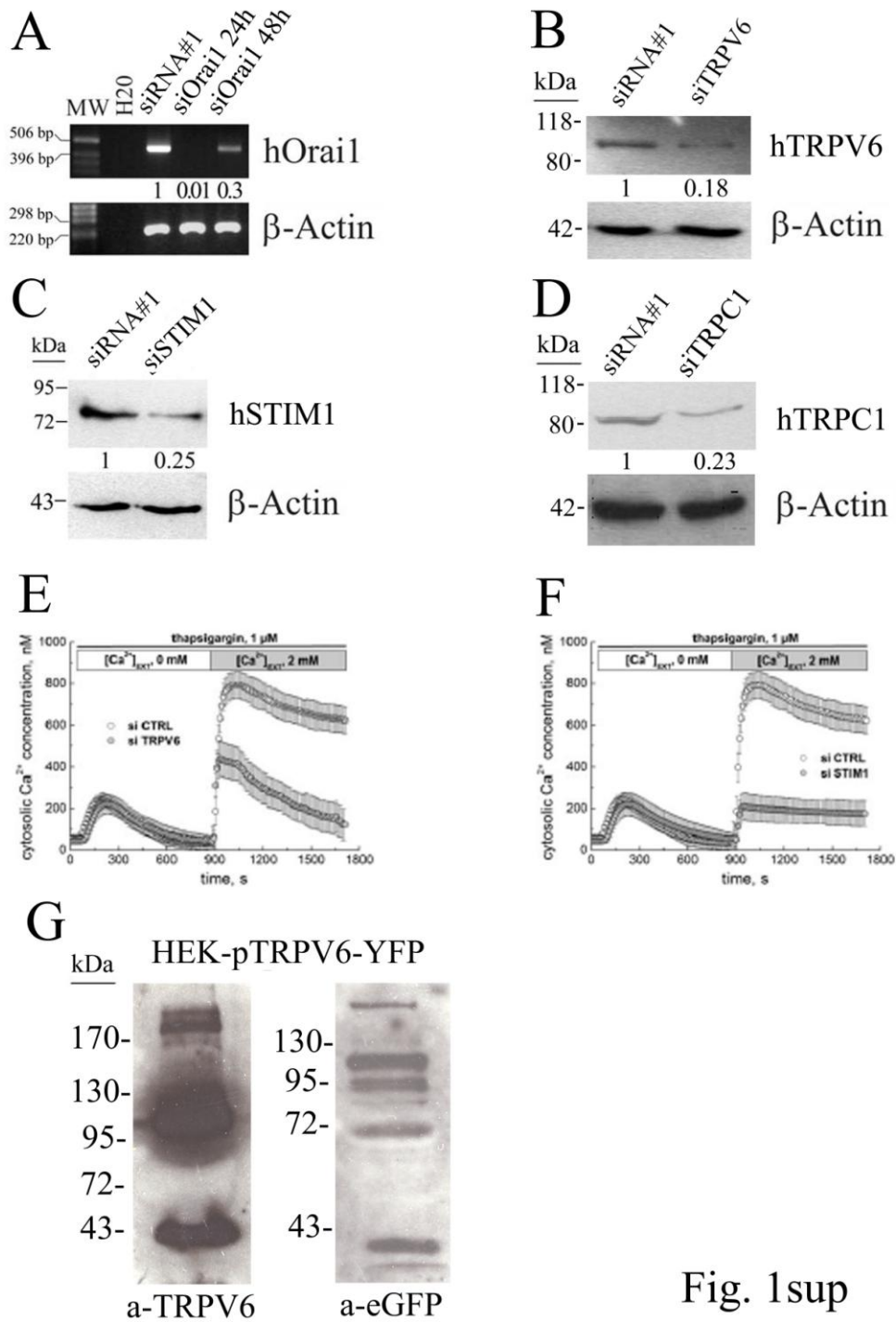


Fig. 1sup

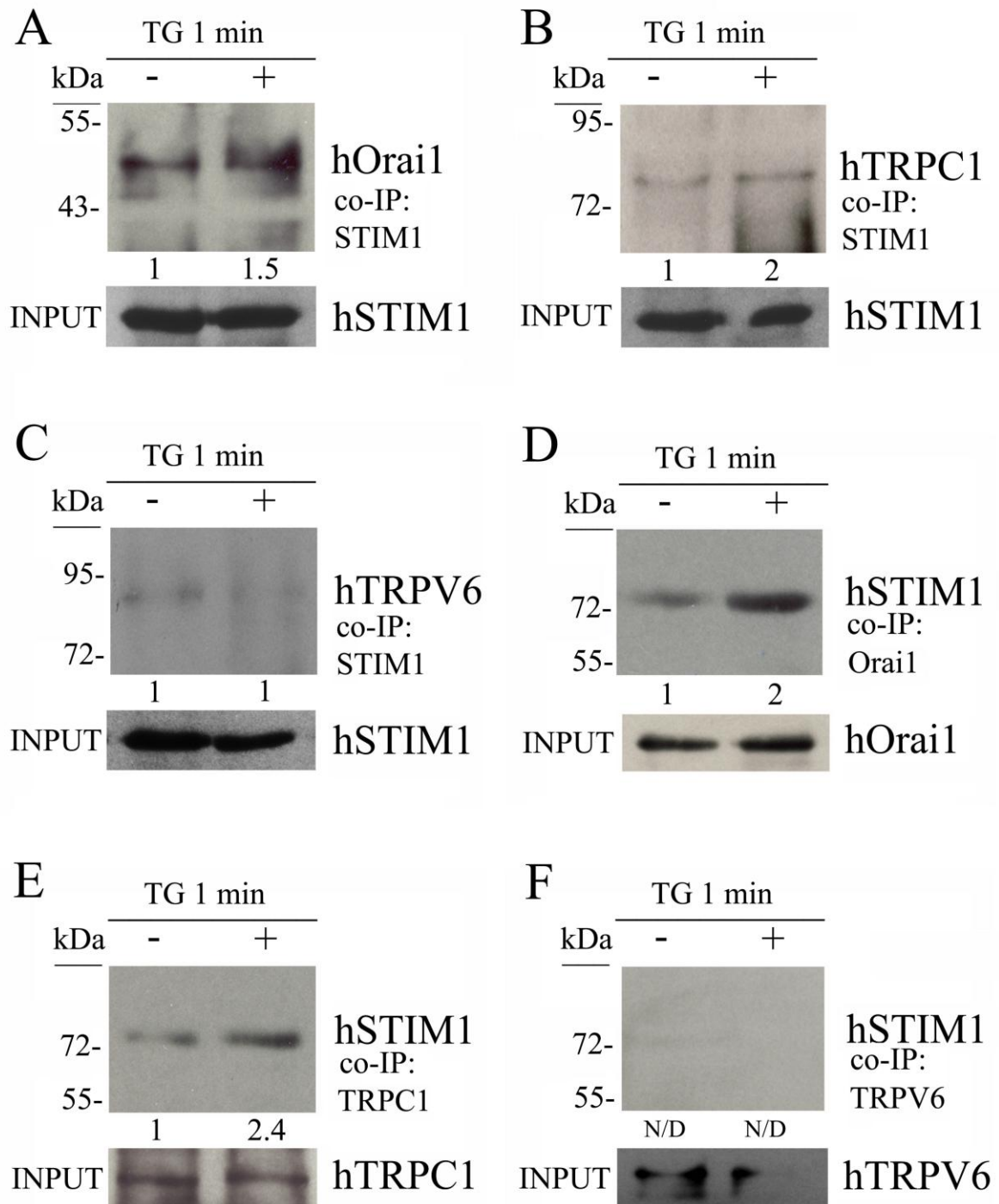


Fig. 2sup

## Article 2

### “Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells”

Matthieu Flourakis\*, V'yacheslav Lehen'kyi\*, Benjamin Beck\*, Maylis Raphaël, **Matthieu Vandenberghe**, Fabien Vanden Abeele, Morad Roudbaraki, Gilbert Lepage, Brigitte Mauroy, Christophe Romanin, Yaroslav Shuba, Roman Skryma et Natalia Prevarskaya

Cell Death and Disease (2010) 1, e75

\* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail

L'apoptose est un mécanisme complexe mettant en jeu les différents compartiments intracellulaires, comme le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries. La sortie du cytochrome C de la mitochondrie et la fuite du  $Ca^{2+}$  du RE sont des éléments déclencheur de l'apoptose dans de nombreux cas (205). Le cancer de la prostate représente la deuxième cause de mortalité par cancer chez l'homme et dont la particularité est l'acquisition d'une résistance à l'apoptose plutôt qu'une prolifération anarchique des cellules (206). La phase précoce du cancer de la prostate est dépendante des androgène, qui interviennent dans la prolifération et la survie cellulaire. A ce stade, le traitement par la privation d'androgène peut permettre une régression de la tumeur due à l'induction de l'apoptose (207). Malheureusement, ce cancer évolue vers un stade androgène-indépendant et l'apparition de cellules plus agressives et une résistance à l'apoptose plus marquées. Malgré de nombreuses études, la compréhension des mécanismes impliqués dans la survenue de la résistance à l'apoptose sont encore flous.

Certains travaux ont montré que l'apoptose pouvait être induite par une entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule par l'intermédiaire de canaux SOC (Store-Operated Channel), activé par la vidange calcique réticulaire (208). Ces canaux permettent de réguler les taux de  $Ca^{2+}$  dans le cytosol et dans le RE, c'est ainsi qu'ils suscitent en grand intérêt comme régulateurs potentiels de l'apoptose (209). L'un des candidats les plus particulièrement étudiés pour son implication

dans le courant de type SOC est Orai1. De plus, nous avons déjà montré que l'inhibition de l'apoptose dans les cellules androgène-indépendantes est associée à une diminution de l'amplitude du courant SOC et du nombre de canaux. Cependant, la nature moléculaire des canaux impliqués est encore inconnue.

Le but de cette étude est d'identifier les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la résistance à l'apoptose des cellules androgène-indépendantes.

## **Conclusion**

**Ces résultats montrent donc que le canal Orai1 est un des principaux acteurs du courant SOC et qu'il est impliqué dans l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$ . La transition vers un phénotype androgène-indépendant est associée à la diminution de l'expression du canal Orai1 et de l'amplitude du courant SOC.**



## Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells

M Flourakis<sup>1,2,6,7</sup>, V Lehen'kyi<sup>1,2,6</sup>, B Beck<sup>1,2,6</sup>, M Raphaël<sup>1,2</sup>, M Vandenberghe<sup>1,2</sup>, FV Abeele<sup>1,2</sup>, M Roudbaraki<sup>1,2</sup>, G Lepage<sup>1,2</sup>, B Mauroy<sup>3</sup>, C Romanin<sup>4</sup>, Y Shuba<sup>5</sup>, R Skryma<sup>1,2</sup> and N Prevarskaya<sup>1,2</sup>

The molecular nature of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ )-dependent mechanisms and the ion channels having a major role in the apoptosis of cancer cells remain a subject of debate. Here, we show that the recently identified Orai1 protein represents the major molecular component of endogenous store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) in human prostate cancer (PCa) cells, and constitutes the principal source of  $\text{Ca}^{2+}$  influx used by the cell to trigger apoptosis. The downregulation of Orai1, and consequently SOCE, protects the cells from diverse apoptosis-inducing pathways, such as those induced by thapsigargin (Tg), tumor necrosis factor  $\alpha$ , and cisplatin/oxaliplatin. The transfection of functional Orai1 mutants, such as R91W, a selectivity mutant, and L273S, a colled-coll mutant, into the cells significantly decreased both SOCE and the rate of Tg-induced apoptosis. This suggests that the functional coupling of STIM1 to Orai1, as well as Orai1  $\text{Ca}^{2+}$ -selectivity as a channel, is required for its pro-apoptotic effects. We have also shown that the apoptosis resistance of androgen-independent PCa cells is associated with the downregulation of Orai1 expression as well as SOCE. Orai1 rescue, following Orai1 transfection of steroid-deprived cells, re-established the store-operated channel current and restored the normal rate of apoptosis. Thus, Orai1 has a pivotal role in the triggering of apoptosis, irrespective of apoptosis-inducing stimuli, and in the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in PCa cells.

Cell Death and Disease (2010) 1, e75; doi:10.1038/cddis.2010.52; published online 16 September 2010

Subject Category: Cancer

Early and pivotal events in apoptosis are now known to occur in mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER), where the release of cytochrome *c* from the mitochondria and calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) from the ER into the cytosol is a requisite for apoptosis in many cases.<sup>1</sup> Irrespective of apoptosis-induced stimuli, a lethal influx of  $\text{Ca}^{2+}$  constitutes a *sine qua non* condition of apoptosis. The recruitment of three major  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptotic mechanisms, mitochondrial, cytoplasmic and ER, were already shown (for reviews, see Prevarskaya *et al.*,<sup>2</sup> Pinton *et al.*<sup>3</sup> and Norberg *et al.*<sup>4</sup>). However, until now, the specific mechanisms through which  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics are controlled and by which  $\text{Ca}^{2+}$  participates in apoptotic cascades have been elusive. The function of  $\text{Ca}^{2+}$  in apoptosis is particularly fascinating, especially when we consider the prominence of  $\text{Ca}^{2+}$  in regulating a multitude of physiological processes and the involvement of perturbed cellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in the pathogenesis.

Prostate cancer (PCa) is the second most lethal tumor among men, wherein the major hallmark is the acquired resistance to apoptosis rather than enhanced proliferation.<sup>5,6</sup> The early stage of PCa depends on the androgens needed for

growth and survival, and androgen ablation therapy may at this time be effective in causing the tumor to regress due to the induction of massive apoptosis.<sup>7</sup> Unfortunately, PCa progresses into an androgen-independent stage, causing cancer relapse with the appearance of more aggressive cell phenotypes characterized by enhanced apoptosis resistance. Despite a growing number of studies, the mechanisms leading to these phenotypes are still poorly defined, even though understanding the factors that drive PCa to apoptosis resistance is vital for the development of new therapies for advanced PCa.

A number of studies have shown that a large, sustained influx of  $\text{Ca}^{2+}$  triggering apoptosis in cancer cells is provided by capacitative or store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (capacitative calcium entry (CCE) or store-operated calcium entry (SOCE)), mediated by store-operated channels (SOCs).<sup>8,9</sup> SOCs are located in the plasma membrane (PM) and are activated by store depletion in the ER.  $\text{Ca}^{2+}$  entry via SOCs induces a sustained increase in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, thus restoring the ER  $\text{Ca}^{2+}$  content. Therefore, when SOCs are activated, they regulate both cytosolic and

<sup>1</sup>INSERM U1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq F-59655, France; <sup>2</sup>Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq F-59655, France; <sup>3</sup>Université Catholique de Lille, Service d'Urologie, Lille F-59000, France; <sup>4</sup>Institute for Biophysics, Johannes Kepler Universität Linz, Linz A-4040, Austria and <sup>5</sup>Bogomoletz Institute of Physiology and International Center of Molecular Physiology NASU, Kyiv 01024, Ukraine

\*Corresponding author: N Prevarskaya, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Bâtiment SN3, USTL, Villeneuve d'Ascq F-59655, France. Tel: +33 3 20 43 4077; Fax: +33 3 20 43 4066; E-mail: Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>7</sup>Current address: Center for Sleep and Circadian Biology, Department of Neurobiology and Physiology, Northwestern University, 2205 Tech Drive, #2-160, Evanston, IL 60208, USA.

**Keywords:** store-operated calcium entry; Orai channels; prostate cancer; apoptosis resistance

**Abbreviations:** AR, androgen receptor;  $\text{Ca}^{2+}$ , calcium; CCE, capacitative calcium entry; ER, endoplasmic reticulum;  $I_{\text{SOC}}$ , SOC current; LNCaP, lymph node carcinoma of the prostate cells; LNCaP-ST, steroid-deprived LNCaP; PCa, prostate cancer; PM, plasma membrane; SOCs, store-operated channels; SOCE, store-operated calcium entry; Tg, thapsigargin; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$

Received 11.5.10; revised 12.7.10; accepted 02.8.10; Edited by A Finazzi-Agro

ER intraluminal  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. This is one reason why SOCs have become of great interest as potential apoptosis regulators.<sup>8</sup> Moreover, we have previously shown that the inhibition of apoptosis in androgen-independent PCa cells was associated with the downregulation of SOCs due to a decrease in the number of functional channels.<sup>9</sup> Nevertheless, despite considerable progress in the understanding of SOCs, the molecular nature of the channels involved in PCa cell apoptosis, and thus contributing to the development of apoptosis resistance, remains unknown.

Our work here focused on studying the molecular mechanisms involved in the enhanced apoptosis resistance of PCa cells in their transition to the most aggressive hormone-refractory stage.

## Results

**Orai1 and STIM1 expression and their involvement in CCE in steroid-deprived PCa cells.** The whole-cell configuration of the patch-clamp technique was used to compare the amplitudes of SOC current ( $I_{\text{SOC}}$ ) in lymph node carcinoma of the prostate cells (LNCaP) and steroid-deprived LNCaP (LNCaP-ST) cells. As documented in Figure 1a–c,  $I_{\text{SOC}}$  induced by the cell dialysis, with the basic intracellular solution supplemented with either  $\text{IP}_3$  (100  $\mu\text{M}$ ) or EGTA (5 mM) (EGTA + BAPTA), was approximately 50% lower in LNCaP-ST cells compared with the regular LNCaP cells. This correlated nicely with the decrease in Orai1 expression in LNCaP-ST cells (Figure 1d) as assayed by the quantitative PCR and western blotting (Figure 1f). As Orai1 is known to colocalize with the ER  $\text{Ca}^{2+}$  sensor, STIM1, at ER–PM junctions and requires STIM1 translocation into punctate structures to be activated,<sup>10</sup> we also checked for STIM1 expression during steroid deprivation. In contrast to Orai1, the expression of STIM1 remained invariable irrespective of whether or not androgens were present in the culture medium (Figure 1d).

To demonstrate the involvement of STIM1 and Orai1 in  $I_{\text{SOC}}$  in LNCaP cells, we conducted a series of siRNA-mediated knockdown experiments. As shown in Figure 1e–h, a 24-h treatment with siRNA against Orai1 (si-Orai1) significantly reduced Orai1 mRNA (Figure 1g) and protein (Figure 2e) in LNCaP cells. This was paralleled by a decrease in the  $\text{IP}_3$ - as well as EGTA + BAPTA-evoked  $I_{\text{SOC}}$  density by  $75.4 \pm 7.5\%$  and  $77.8 \pm 11.3\%$ , respectively (Figure 1e). Similarly, the use of siRNA against STIM1 (si-STIM1) specifically decreased STIM1 protein expression by approximately 80% (Figure 1i) and correlated with a reduction in both  $\text{IP}_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{\text{SOC}}$  density by  $80.5 \pm 8.4\%$  and  $83.5 \pm 4.2\%$ , respectively (Figure 1h).

**Downregulation of Orai1 confers apoptosis resistance to LNCaP cells.** In view of the major role of Orai1 in PCa cells' SOCE and the decrease in Orai1 expression following androgen withdrawal, we next sought to examine Orai1 involvement in apoptosis. The classic apoptosis inducer, thapsigargin (Tg, a SERCA pump inhibitor that triggers  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis via ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion and SOCE (e.g., Prevarskaya *et al.*<sup>2</sup>)) was used.

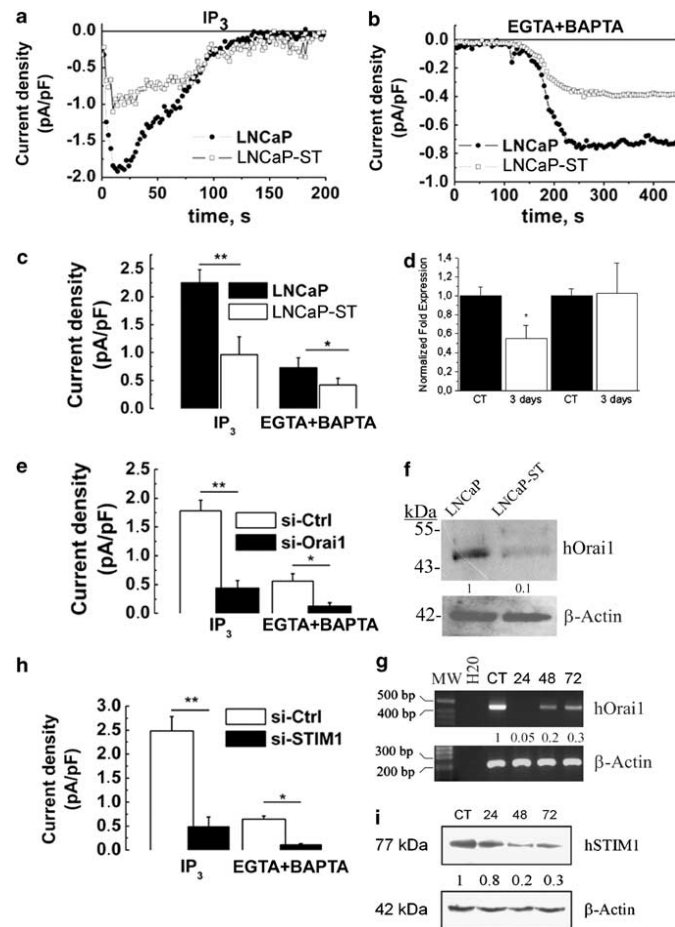
We used the TUNEL technique (including both negative and positive controls) to measure the apoptosis rate of LNCaP cells (Figure 2a). Cells were transfected with either si-Orai1 or si-Ctrl and the day after treated with 1  $\mu\text{M}$  Tg for 24 h. As revealed by TUNEL staining, a 24-h Tg treatment is sufficient to induce apoptosis in around 50% of LNCaP cells (Figure 2b). However, knocking down Orai1 expression (with si-Orai1, Figure 2e) made the cells much more resistant to Tg-induced apoptosis ( $4.24 \pm 1.47$  versus  $48.4 \pm 4.9\%$ ; Figure 2b). This result was confirmed by Hoechst nuclear staining, which revealed 27% of apoptosis in control cells after a 24-h Tg treatment and approximately 8% in si-Orai1-transfected cells (Figure 2c). Thus, Orai1 appears to be an important player in Tg-induced apoptosis, most likely as the key provider of lethal  $\text{Ca}^{2+}$  influx in response to Tg-induced ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion and consecutive SOCE. To validate the role of Orai1 in response to physiological pro-apoptotic signals, we conducted similar experiments with tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ). TNF $\alpha$  10 ng treatment for 48 h triggered apoptosis in 7.25% of the control LNCaP cells, and in only 2.5% of the Orai1-knockdown LNCaP cells (Figure 2d).

To assess whether Orai1 underexpression could be involved in resistance to chemotherapy-induced apoptosis, we also investigated the cisplatin- and oxaliplatin-evoked apoptosis. The use of 20  $\mu\text{M}$  cisplatin (Y) and 40  $\mu\text{M}$  oxaliplatin (X), two very strong alkylating agents, resulted in an apoptosis rate that was significantly diminished in the Orai1-knockdown LNCaP cells (Figure 3a). Even in the case of these strong alkylating agents si-Orai1 was able to protect the cells against apoptosis (Figure 3b). Moreover, a 24-h pretreatment with either 20  $\mu\text{M}$  cisplatin or 40  $\mu\text{M}$  oxaliplatin showed a statistically significant increase in basal  $\text{Ca}^{2+}$  level as compared with control DMSO-treated cells (data not shown). These data provide the evidence of the possible link between the alkylating agent and  $\text{Ca}^{2+}$ -homeostasis. Thus, our data suggest that Orai1 underexpression might prevent apoptosis triggered either physiologically or by chemotherapies and thus might be important in PCa progression.

**Loss of Orai1 function protects LNCaP cells against Tg-induced apoptosis.** To further study the role of Orai1 in apoptosis, we used two functional Orai1 mutants described as  $I_{\text{SOC}}$  inhibitors: the 'selectivity mutant' R91W, which prevents  $\text{Ca}^{2+}$  permeation through Orai1,<sup>11</sup> and the 'coiled-coiled mutant' L273S, which impairs the interaction between STIM1 and Orai1 and thus inhibits its activation.<sup>12</sup> Electrophysiological measurements on LNCaP cells transiently transfected with the YFP-tagged R91W mutant (YFP-Orai1-R91W) or YFP-tagged L273S mutant (YFP-Orai1-L273S) (Figure 4a) revealed a significantly reduced  $\text{IP}_3$ - and EGTA + BAPTA-evoked  $I_{\text{SOC}}$  density compared with the control LNCaP cells, consistent with the negative action of these mutants on endogenous Orai1 function.

Moreover, similar to what has been observed with an siRNA-mediated Orai1 knockout, LNCaP cells transfected with any of the Orai1 mutants showed an enhanced resistance to Tg-induced apoptosis. A 24-h exposure to Tg caused  $22 \pm 4\%$  of apoptosis in the control LNCaP cells, and in the cells transfected with YFP-Orai1-R91W or YFP-Orai1-L273S,



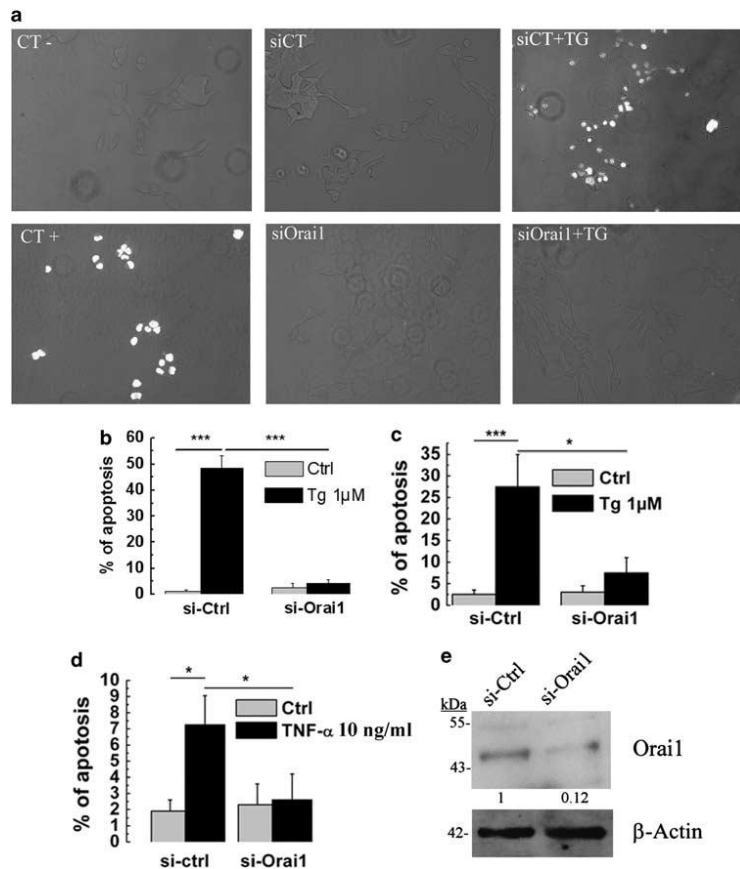


**Figure 1** The expression of Orai1 and STIM1 in steroid-deprived prostate cancer epithelial cells and their involvement in SOCE. (a, b) Representative time courses of  $I_{SOCE}$  development (measured at  $-100$  mV holding potential) in control LNCaP (black circles) and LNCaP-ST (white squares) cells in response to the dialysis of  $100 \mu\text{M}$   $\text{IP}_3$  (a) or  $5$  mM EGTA (b). (c) Quantification of  $\text{IP}_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOCE}$  densities in control LNCaP (black columns,  $2.25 \pm 0.23$  pA/pF,  $n = 23$  and  $0.73 \pm 0.18$  pA/pF,  $n = 31$ , respectively) and in LNCaP-ST (white columns,  $0.96 \pm 0.32$  pA/pF,  $n = 17$  and  $0.42 \pm 0.12$  pA/pF,  $n = 21$ , respectively) cells. (d) Real-time quantitative PCR showing the expression of Orai1 and STIM1 in control LNCaP cells (CT) and LNCaP cells cultured for 3 days in steroid-deprived medium (3 days). (e) Quantification of  $\text{IP}_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOCE}$  densities in LNCaP cells following 24 h of transfection with control siRNA (si-Ctrl, white columns,  $1.78 \pm 0.18$  pA/pF,  $n = 23$  and  $0.56 \pm 0.13$  pA/pF,  $n = 22$ , respectively) and anti-Orai1 siRNA (si-Orai1, black columns,  $0.44 \pm 0.13$  pA/pF,  $n = 19$  and  $0.12 \pm 0.06$  pA/pF,  $n = 22$ , respectively). (f) A western blotting experiment showing the relative expression of Orai1 protein upon androgen withdrawal in LNCaP cells. The data are normalized to the expression of  $\beta$ -actin. (g) Representative RT-PCRs showing the dynamics of Orai1 mRNA expression in LNCaP cells following 24, 48, or 72 h of transfection with anti-Orai1 siRNA (si-Orai1); CT stands for the cells transfected with control si-RNA; the numbers represent the relative amounts of Orai1 mRNA compared with  $\beta$ -actin mRNA. (h) Quantification of  $\text{IP}_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOCE}$  densities in LNCaP following 24 h of transfection with control siRNA (si-Ctrl, white columns,  $2.52 \pm 0.28$  pA/pF,  $n = 18$  and  $0.70 \pm 0.05$  pA/pF,  $n = 24$ , respectively) and anti-STIM1 siRNA (si-STIM1, black columns,  $0.49 \pm 0.23$  pA/pF,  $n = 18$  and  $0.11 \pm 0.03$  pA/pF,  $n = 23$ , respectively). (i) Representative western blot showing the dynamics of the hSTIM1 protein (77 kDa) expression in LNCaP cells following 24, 48 or 72 h of transfection with anti-hSTIM1 siRNA (si-STIM1); CT stands for the cells transfected with control si-RNA; numbers represent relative amounts of hSTIM1 protein compared with  $\beta$ -actin protein (42 kDa). Throughout the figure, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences with  $P < 0.05$  and  $P < 0.02$ , respectively

the apoptosis rate was decreased by approximately 70–80% ( $6 \pm 3\%$  and  $5 \pm 2\%$ , respectively; Figure 4b).

Taken together, these data indicate that Orai1 forms a major  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathway required in  $\text{Ca}^{2+}$ -induced

apoptosis: the downregulation or the loss of Orai1 function triggers apoptosis resistance. On the other hand, the Orai1 gain of function by co-expressing both CFP-tagged Orai1 and YFP-tagged STIM1 in LNCaP cells produced a 10-fold

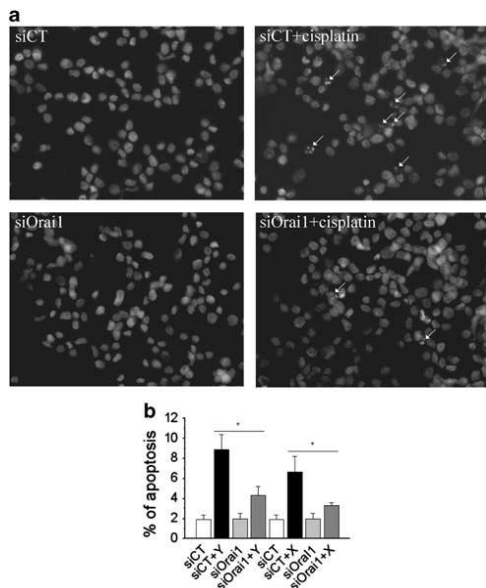


**Figure 2** Underexpression of Orai1 protects LNCaP cells against apoptosis. (a) Apoptotic cells revealed using TUNEL technique. (b) Quantification using TUNEL of the apoptosis rate (Ctrl, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg (1  $\mu$ M, 24 h, black columns) in control LNCaP cells (si-Ctrl) and LNCaP cells with si-RNA-mediated Orai1 silencing (si-Orai1). (c) Quantification using Hoechst technique of the apoptosis rate (Ctrl, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg (1  $\mu$ M, 24 h, black columns) in control LNCaP cells (si-Ctrl) and LNCaP cells with si-RNA-mediated Orai1 silencing (si-Orai1). (d) Apoptosis induced by TNF- $\alpha$  (10 ng/ml, 48 h, black columns) in control LNCaP cells (si-Ctrl) and LNCaP cells with si-RNA-mediated Orai1 silencing (si-Orai1) (quantified using Hoechst technique). (e) A representative western blotting of si-Orai1 knockdown in LNCaP cells. The data are normalized to the expression of  $\beta$ -actin. Throughout the figure, (\*) and (\*\*\*) denote statistically significant differences with  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively

increase in the  $I_{SOC}$  density in response to the infusion of either  $IP_3$  or EGTA + BAPTA compared with the respective controls (Figure 4c). At the same time, the co-expression of Orai1 and STIM1 more than doubled the Tg-induced apoptosis ( $50 \pm 6\%$  versus  $22 \pm 4\%$  apoptosis rate; Figure 4d). The control of CFP-tagged Orai1 and YFP-tagged STIM1 transfections into LNCaP cells was performed using confocal microscopy (Figure 4e). Thus, the amplification of SOCE due to Orai1 and STIM1 overexpression correlates with the marked increase in Tg-induced apoptosis.

**Orai1 rescue restores  $Ca^{2+}$ -induced apoptosis in LNCaP-ST cells: a possible regulation by androgens.** We have

shown that the decrease in Orai1 expression and the density of  $I_{SOC}$  were responsible for the apoptosis resistance of androgen-deprived LNCaP-ST cells. To further demonstrate the role of Orai1 in apoptosis, we rescued Orai1 expression in LNCaP-ST cells. The cells were transfected with CFP-tagged Orai1. Orai1 overexpression in LNCaP-ST cells resulted in an approximate twofold increase of both  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-activated  $I_{SOC}$  densities compared with the respective controls (Figure 5a), indicating that Orai1 overexpression was able, at least in part, to rescue SOCs downregulated by androgen deprivation. This rescue essentially restored the rate of Tg-induced apoptosis



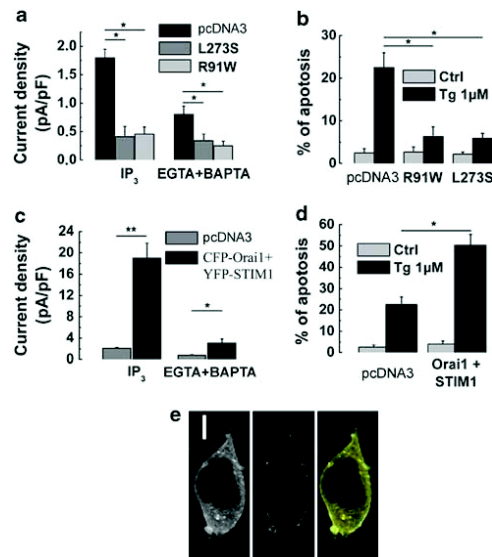
**Figure 3** The role of Orai1 in apoptosis induced by alkylating agents cisplatin and oxaliplatin. (a) Representative images of apoptosis rate measured using the Hoechst technique of LNCaP cells treated with 20  $\mu$ M cisplatin. White arrows indicate the apoptotic nuclei. (b) A corresponding histogram showing the apoptosis of LNCaP cells treated with either 20  $\mu$ M cisplatin (Y) or 40  $\mu$ M oxaliplatin (X) in siCT- and siOrai1-pretreated cells. (\*) denotes statistically significant differences with  $P < 0.05$  (quantified using the Hoechst technique)

of Orai1-overexpressing cells (from 9  $\pm$  4% to 16  $\pm$  6%), bringing it closer to the value of normal LNCaP cells (24  $\pm$  7%, Figure 5b).

To establish the link between Orai1 and the androgen-independent PCa phenotype, we sought to examine whether the androgen receptor (AR) could regulate Orai1 expression. To directly demonstrate that the *orai1* gene is dependent on the functional AR, we used siRNA against AR (si-AR). As shown in Figure 5d, after 48 h of siAR transfection, the mRNA level of Orai1 was decreased by 70% in the LNCaP cells. Patch-clamp experiments using siAR-transfected cells revealed that their IP<sub>3</sub>- and EGTA + BAPTA-evoked  $I_{SOC}$  were also reduced by 63% and 67%, respectively (Figure 5c). This result indicates that the AR could regulate Orai1 expression. To further study this potential regulation, we have also used the MatInspector 7.7.3 program (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) to analyze the putative AR binding sites on *Orai1* promoter (see the appropriate section of the discussion).

### Discussion

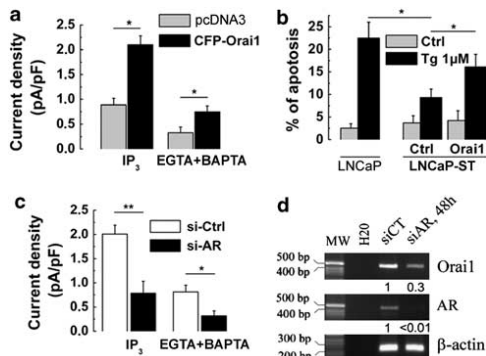
The appearance of apoptotic resistance in cancer cells is a crucial step for the development and progression of human



**Figure 4** Loss of Orai1 function protects LNCaP cells against thapsigargin (Tg)-induced apoptosis. (a) Quantification of IP<sub>3</sub>- and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in control LNCaP cells (pcDNA3, black columns, 1.8  $\pm$  0.15 pA/pF,  $n = 18$  and 0.8  $\pm$  0.15 pA/pF,  $n = 14$ , respectively) and LNCaP cells transfected with YFP-Orai1 L273S (dark gray columns, 0.41  $\pm$  0.18 pA/pF,  $n = 18$  and 0.34  $\pm$  0.12 pA/pF,  $n = 16$ , respectively) or YFP-Orai1 R91W (gray columns, 0.46  $\pm$  0.12 pA/pF,  $n = 18$  and 0.25  $\pm$  0.08 pA/pF,  $n = 16$ , respectively). (b) Quantification of the baseline apoptosis (pcDNA3, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg (1  $\mu$ M, 24 h, black columns) in control LNCaP cells (Ctrl) and LNCaP cells transfected with Orai1-L273S or Orai1-R91W mutants (quantified using Hoechst technique). (c) Quantification of IP<sub>3</sub>- and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in control LNCaP cells (Ctrl, gray columns, 2.1  $\pm$  0.18 pA/pF,  $n = 19$  and 1.9  $\pm$  2.8 pA/pF,  $n = 32$ , respectively) and LNCaP cells co-transfected with YFP-STIM1 and CFP-Orai1 (black columns, 0.75  $\pm$  0.12 pA/pF,  $n = 16$  and 3.1  $\pm$  0.75 pA/pF,  $n = 33$ , respectively). (d) Quantification of the baseline apoptosis (pcDNA3, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg (1  $\mu$ M, 24 h, black columns) in control LNCaP cells (pcDNA3) and LNCaP cells co-transfected with YFP-STIM1 and CFP-Orai1 (quantified using Hoechst technique). (e) Representative images of LNCaP cell co-transfected with YFP-STIM1 (left) and CFP-Orai1 (middle) and their overlay (right). A white bar in the left panel represents 5  $\mu$ m distance. Throughout the figure, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences with  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively

PCa to the hormone-refractory androgen-independent phenotype. In the present study, we report three major findings that will allow the understanding of the mechanisms for the acquisition of apoptosis resistance by PCa cells: (i) the decrease of the endogenous  $I_{SOC}$  is a characteristic feature of the androgen-independent phenotype, caused by the downregulation of the Orai1 channel; (ii) the downregulation of both Orai1 expression and  $I_{SOC}$  is used by the PCa cells to develop the apoptosis resistance crucial for PCa development and its progression to the hormone-refractory stage; (iii) Orai1 is a common link between Ca<sup>2+</sup> and apoptosis, irrespective of the nature of the apoptosis-triggering stimuli.

The involvement of Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanisms in the induction and regulation of apoptosis is now well established.



**Figure 5** Rescue of Orai1 in androgen-deprived prostate cancer cells abolishes apoptosis resistance. (a) Quantification of  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in control LNCaP-ST cells (pcDNA3, gray columns,  $0.89 \pm 0.13$  pA/pF,  $n = 13$  and  $0.33 \pm 0.11$  pA/pF,  $n = 14$ , respectively) and LNCaP-ST cells transfected with CFP-Orai1 (black columns,  $2.1 \pm 0.18$  pA/pF,  $n = 21$  and  $0.75 \pm 0.12$  pA/pF,  $n = 23$ , respectively). (b) Quantification of the baseline apoptosis (pcDNA3, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg ( $1 \mu M$ , 24 h, black columns) in control LNCaP cells and in LNCaP-ST cells with or without Orai1 rescued by transfection with CFP-Orai1 (quantified using the Hoechst technique). (c) Quantification of  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in LNCaP following 48 h of transfection with control siRNA (si-Ctrl, white columns,  $2.01 \pm 0.19$  pA/pF,  $n = 19$  and  $0.78 \pm 0.25$  pA/pF,  $n = 18$ , respectively) and anti-AR siRNA (si-AR, black columns,  $0.81 \pm 0.14$  pA/pF,  $n = 21$  and  $0.32 \pm 0.10$  pA/pF,  $n = 15$ , respectively). (d) Representative RT-PCRs showing changes in Orai1 and androgen receptor (AR) mRNA expression in LNCaP cells following 48 h of transfection with anti-AR siRNA (si-AR) compared with the cells transfected with control si-RNA (CT); numbers represent relative amounts of Orai1 and AR mRNA compared with  $\beta$ -actin mRNA. Throughout the figure, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences with  $P < 0.05$  and  $P < 0.02$ , respectively

Alterations in the ER storage capacity and SOC activity seem to have a major role in the establishment of an androgen-independent apoptosis-resistant phenotype of PCa cells. Indeed, as we have shown in our previous works on androgen-independent, apoptosis-resistant phenotypes of LNCaP PCa cells (such as androgen-deprived LNCaP cells, LNCaP cells overexpressing the anti-apoptotic Bcl-2 protein and neuroendocrine-differentiated LNCaP cells), increased resistance to Tg- and TNF- $\alpha$ -induced apoptosis is characterized by (i) the reduced basal  $Ca^{2+}$  filling of the ER pool and (ii) reduced store-operated  $Ca^{2+}$  entry.<sup>5,13</sup> The primary trigger for apoptosis in androgen-dependent cells is ER store depletion and a sustained  $Ca^{2+}$  influx may not even be required.<sup>8</sup> Interestingly, for androgen-independent cells, ER store depletion *per se* is not sufficient to induce cell death without the lethal  $Ca^{2+}$  influx from SOCE.<sup>2,9,14</sup> Therefore, the identification of the molecular nature of SOC and their activation/regulation mechanisms are of great importance for controlling androgen-independent PCa cell apoptosis.

During recent years, a new molecular candidate for SOC termed Orai1 has been identified and characterized. Orai1 mediates CRAC currents and SOCE in a large variety of cells and is involved in a wide range of cell functions, including endothelial cell proliferation,<sup>15</sup> lymphocyte proliferation,<sup>16</sup> mast cell activation,<sup>13</sup> as well as skeletal muscle development

and a contractile function.<sup>17</sup> However, despite the suggested pivotal role of SOCs in the apoptosis resistance of PCa cells, the involvement of Orai1 in prostate-specific SOC, as well as in  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis of PCa cells, has never been studied.

In the present study, we have shown that Orai1, an ion channel in the PM, and STIM1, as a signal transducer from the ER, represent the major molecular components of SOCE in PCa epithelial cells: the siRNA-mediated knockout of any of them strongly diminishes  $I_{SOC}$  in LNCaP cells. However, as only Orai1 expression was found to decrease in LNCaP cells following androgen deprivation, we hypothesized that the downregulation of  $I_{SOC}$ , which follows the transition of PCa cells to androgen independence and apoptosis resistance, is associated, at least in part, with the reduction of Orai1 levels.

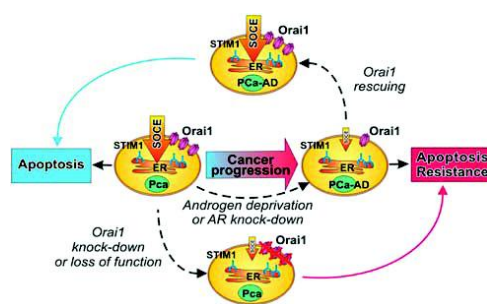
Androgen ablation therapy in prostate adenocarcinoma induces an involution of prostate tissue mainly through the enhancement of cellular apoptosis.<sup>18</sup> However, a subset of malignant cells emerges as a new population of apoptosis-resistant cells. The enrichment of the prostate with such cell phenotypes eventually causes virtually all tumors to relapse into an androgen-independent, more aggressively growing type.<sup>18</sup>

Androgens have an essential role in prostate carcinogenesis and androgen independency of the most malignant androgen-independent phenotype, which is known to arise from loss of the AR (e.g., Bonkhoff<sup>19</sup>). Therefore, we assumed that the decrease in Orai1 expression and  $I_{SOC}$  density following the induction of LNCaP cell differentiation by androgen withdrawal occurs because *orai1* gene expression might be regulated by the functional AR. Our data showed that AR silencing in LNCaP cells leads to a dramatic decrease in Orai1 expression as well as in  $I_{SOC}$  density. The structure of the promoter of such a classic androgen-dependent gene as the prostate-specific antigen usually includes an androgen-responsive element (ARE) close to the transcriptional start site and other AREs located several kilobase pairs upstream within the enhancers.<sup>20</sup> In order to estimate a possible *orai1* gene regulation by AR, we studied the human *Orai1* promoter sequence. The genomic sequence corresponding to 6200 bp upstream and 100 bp downstream of hOrai1 ATG was used for the transcription factor analysis. The MatInspector 7.7.3 program was used to analyze the putative AR binding sites.<sup>21</sup> The *orai1* promoter sequence was analyzed for the presence of AREs using a prostate-specific matrix, which is associated with transcription factors that are expressed and transcriptionally active in this tissue. We identified several AREs: three of them located at -3700, -4105 and -4700 bp from the *Orai1* ATG codon with more than 80% of matrix similarity. These results may suggest that *Orai1* is probably an androgen-responsive gene in the prostate. Moreover, given that Orai1 represents a key component of prostate-specific SOC, we hypothesized that the decrease of functional SOCs during PCa progression to the aggressive androgen-independent stage results from downregulation of the functional AR and ultimately the deregulation of *Orai1*.

The transition to the androgen-independent phenotype not only influences Orai1 expression and the SOCE, but, more importantly, the acquisition of apoptosis resistance also.

We have found that susceptibility of the cells to the induction of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis was always in direct correlation with Orai1 expression and  $I_{SOC}$  density: the lower the current density (i.e., low Orai1 expression), the higher the apoptosis resistance is (i.e., low apoptosis rate). This correlation existed independently of the experimental tools used to reduce Orai1 expression and activity: the androgen-dependence status of the LNCaP cells (i.e., androgen deprivation or AR silencing), the targeted downregulation of Orai1 (anti-Orai1 siRNA) or Orai1 mutants. Interestingly, the pro-apoptotic effects of Orai1 were independent of the apoptosis-inducing stimuli. Orai1 downregulation is likely to diminish the sustained cytosolic  $Ca^{2+}$  increase and protect PCa cells from apoptosis. We first used a classical  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis inducer, Tg. Tg is a very powerful tool and as such was even recently proposed to be used as a 'smart bomb' to target androgen-independent PCa.<sup>22</sup> Our data demonstrate that Tg-evoked apoptosis was predominantly mediated via Orai1 activation and the efficient knockdown of the latter may be an important means to protect the cell from eventual death. To distinguish between direct and indirect  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis, we used another apoptosis inducer,  $TNF\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine that deregulates  $Ca^{2+}$  homeostasis by inducing ER stress. According to our previous observations,  $TNF\alpha$  is an effective pro-apoptotic agent of PCa epithelial cells.<sup>9</sup> Indeed,  $TNF\alpha$  induced apoptosis of the LNCaP cells; however, even this non-direct  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism was significantly blocked by the Orai1 knockdown, suggesting that Orai1-mediated  $Ca^{2+}$  entry has a major role in apoptosis, especially in its early phase. Furthermore, we used two other strong apoptosis inducers: cisplatin and oxaliplatin. These alkylating agents react *in vivo* by binding to and causing crosslinking of DNA, which ultimately triggers apoptosis (for a review, see Gonzalez *et al.*<sup>23</sup>). Cisplatin-induced DNA damage seems to be a long and complex process of cell death and because cisplatin is a nonspecific drug that reacts not only with DNA but also with proteins, there is a possibility that an easier process of initiation, such as damage to cytoplasmic proteins, may take place.<sup>23</sup> Moreover, inhibition of the proteasome induces ER stress and also activates the unfolded protein response, thereby triggering apoptosis.<sup>24</sup> Cisplatin has also been shown to stimulate ER stress and increase ER dilation, intracellular  $Ca^{2+}$  levels, and cell death.<sup>25</sup> This eventually links cisplatin with ER stress and increased intracellular  $Ca^{2+}$  levels, which may be successfully inhibited by Orai1 knockdown with the consecutive downregulation of  $I_{SOC}$  and apoptosis in general. In fact, we have previously shown that ER stress induces  $Ca^{2+}$  entry,<sup>26</sup> and we observed that 24-h pretreatment with either cisplatin or oxaliplatin increases the cytoplasmic [ $Ca^{2+}$ ].

Finally, recent studies, concerning Orai1 activation, have shown that the overexpression of both Orai1 and STIM1 induces a 20-fold increase in the  $I_{SOC}$ , resulting in a 'monster CRAC'.<sup>27</sup> The gain of SOC function in the androgen-dependent LNCaP cells in response to the overexpression of Orai1 and STIM1 was manifested by the appearance of a high-amplitude  $I_{SOC}$ , which led to the marked enhancement of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis. Moreover, the rescue of the  $I_{SOC}$  function by Orai1 overexpression in androgen-deprived apoptosis-resistant LNCaP cells is able to restore the



**Figure 6** Schematic diagram summarizing the principal findings of this study. The progression to androgen-independent PCa is associated with the appearance of new cell phenotypes characterized by decreased SOCE due to the downregulation of Orai1, which results in enhanced resistance to  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis. This natural process, which occurred in the *in vivo* tumors, can be mimicked by the artificial silencing of Orai1 expression or inhibition of Orai1 function with dominant-negative mutants. On the other hand, rescuing Orai1 in androgen-independent PCa cell phenotypes can restore the normal rate of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis, thus providing the means for the perspective therapies of advanced PCa

apoptosis rate close to that of androgen-dependent PCa cells. This result is especially impressive, as it is relevant to the development of perspective therapies for advanced, androgen-independent PCas.

Thus, we have shown the involvement of Orai1 as a principal molecular component of native SOCs in the  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis of PCa cells. Our results conclude that the transition to the androgen-independent PCa phenotype is associated with the loss of Orai1 expression leading to the downregulation of SOCE, which precludes cytosolic  $Ca^{2+}$  increases that are sufficient enough to induce apoptosis via well-known mitochondrial and cytosolic mechanisms. In addition, reduced SOCE may contribute to the chronic underfilling of ER  $Ca^{2+}$  stores, which represent the new state of equilibrium for androgen-independent PCa cells,<sup>2</sup> further enhancing their apoptosis resistance (Figure 6).

Our data are consistent with the notion that SOCE and Orai1 are important players in apoptosis induction. However, it seems that apoptosis is not the only process directly related to SOCE. A recent study revealed that Orai1/STIM1 and SOCE are also essential for breast tumor cell migration, invasion and metastasis.<sup>28</sup> It also has been shown that the SOCE and STIM1/Orai1 are involved in migration, proliferation,<sup>29</sup> and cell cycle progression.<sup>30</sup> Thus, Orai1/STIM1 and SOCE seem to have important roles in the wide spectrum of  $Ca^{2+}$ -dependent cancer-related behaviors, and are expected to have a significant impact on future research.

#### Materials and Methods

**Cell culture.** The androgen-dependent human PCa cell line LNCaP was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and maintained in culture in RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France), 5 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France), and kanamycin 100  $\mu$ g/ml. Charcoal-stripped fetal calf serum (10%) was added to phenol red-free RPMI medium together with kanamycin and L-glutamine (as above) to

**Table 1** List of primers used for Q-PCR assays (1–5) and siRNA sequences targeting hOrai1 (6) or hSTIM1 (7)

No.	Name (accession no.)	Forward (5'...-3')	Backward (5'...-3')	Expected product size (bp)
1.	hSTIM1 (NM_003156)	<i>TGTGGAGCTGCCTCAGTATG</i>	<i>CTTCAGCACAGTCCCTGTCA</i>	112
2.	hOrai1 (NM_032790)	<i>ATGGTGGCAATGGTGGAG</i>	<i>CTGATCATGAGCGCAAACAG</i>	115
3.	HPRT (NM_000194)	<i>GGCGTCGTGATTAGTGATGAT</i>	<i>CGAGCAAGACGTTCAAGTCCT</i>	134
4.	hOrai1 (NM_032790)	<i>CTTCAGTGCCTGCACCACAG</i>	<i>CCTGGAAGCTGTCGGTCAGTC</i>	450
5.	$\beta$ -Actin (NM_001101)	<i>CAGAGCAAGAGGACATCCT</i>	<i>GTTGAAGGTCTCAAACATGATC</i>	209
6.	hOrai1 siRNA	<i>5'-UGAGCAACGUGCACAUCU (dTdT)-3'</i>		
7.	hSTIM1 siRNA	<i>5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)-3'</i>		

Sequences for the Q-PCR are indicated in italic script.

create steroid-deprived conditions. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The medium was replaced every 48 h. For the experiments, cells were seeded in six-well plates for PCR and western blotting, 35-mm culture for the patch-clamp experiments, and onto glass coverslips for the confocal microscopy.

**Electrophysiology and solutions.** Macroscopic currents were recorded from LNCaP cells in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht/Pfalz, Germany), as previously described.<sup>25</sup>

The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4 (adjusted with TEA-OH), osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-mannitol. The patch pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid), and 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.4 with CsOH and osmolarity 295 mOsm/kg adjusted with D-mannitol). The necessary supplements in the desired concentrations were added to the experimental solutions directly from the appropriate stock solutions, dissolved in water, ethanol or dimethylsulfoxide. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). In the course of the patch-clamp recording, drugs and solutions were applied to the cells through the multilane microperfusion system with common outflow (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA) placed in close proximity (~200  $\mu$ m) to the studied cell. The experiments were carried out at room temperature.

**Western blotting.** LNCaP cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. The lysates were centrifuged at 15 000  $\times$  g and 4°C for 20 min, mixed with a sample buffer containing 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue, and boiled for 5 min at 95°C. The total protein samples were subjected to 8–10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry western blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The membrane was blocked in a 5% milk TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) overnight, and then probed using a specific rabbit polyclonal anti-Orai1 antibody (1:200, ProScience, Poway, CA, USA) anti-mouse monoclonal anti-STIM1 antibody (1:250, BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) and anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co., Fremont, CA, USA, 1/1000) antibodies. The bands on the membrane were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnologies Inc., Fremont, CA, USA). A densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories).

**RT-PCR.** RT-PCR experiments were performed as previously described.<sup>31</sup> DNA amplification conditions included the initial denaturation step of 7 min at 95°C, and 36 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Primers used are listed in Table 1.

**siRNA transfection.** LNCaP cells were transfected with 50 nM of siRNA against Orai1, STIM1, and AR (Dharmacon Inc., Fremont, CA, USA) using 6  $\mu$ l Hyperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtabouef, France), following the manufacturer's instructions (see Table 1 for the siRNA sequences).

**Nucleofection.** The transfection of LNCaP with different plasmids was carried out using Nucleofector (Amaxa GmbH, Köln, Germany) according to the

manufacturer's instructions. In brief, 2  $\mu$ g of the plasmid was transfected into 2 million trypsinized cells, which were then plated onto six-well dishes, 35-mm dishes or onto glass coverslips for 48 h.

**Immunocytochemistry.** Cells grown on glass coverslips were washed once with PBS and fixed in 3.5% paraformaldehyde in PBS. Fluorescence analysis was carried out using a Carl Zeiss LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200M with 63  $\times$  1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature. Both channels were excited, collected separately, and then merged to examine colocalization using Carl Zeiss LSM Image Examiner software (Le Pecq, France).

**Apoptosis assay.** The level of apoptosis was estimated from the number of apoptotic nuclei revealed either by TUNEL assay (Roche Biochemicals, Burlington, NC, USA) or by Hoechst staining. The percentage of apoptotic cells was determined by counting at least five random fields for each condition done in triplicate for each *n* (the detailed procedure has been described previously).<sup>8</sup>

**Quantitative real-time PCR.** The quantitative real-time PCR of Orai1, STIM1, and HPRT mRNA transcript was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, Angers, 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 the RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results, we used the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen.<sup>32</sup>

**Cloning of Orai1 and STIM1 and the site-directed mutagenesis.** All of the procedures used to clone Orai1 and STIM1 and to create the two Orai1 mutants, the 'selectivity mutant' R91W and the 'colled-coil mutant' L273S, have been previously described in detail.<sup>12</sup>

**Data analysis.** For each type of experiment, data were accumulated from at least five measurements. Electrophysiological data were analyzed offline using HEKA (HEKA Electronic) and Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) software. The results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M., where appropriate. A Student's *t*-test was used for the statistical comparison of the differences, with *P* < 0.05 considered as significant. In the graphs, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences of *P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** 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.

- Scorrano L, Oakes SA, Oplerman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* 2003; 300: 135–139.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1326–1335.



3. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008; **27**: 6407–6418.
4. Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Hom M, Uhlen P, Orrenius S *et al*. An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1857–1864.
5. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2002; **53**: 118–123.
6. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streilman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res* 1995; **55**: 4438–4445.
7. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN *et al*. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1502–1512.
8. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F *et al*. Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 2000; **527** (Pt 1): 71–83.
9. Vanoverbergh K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL *et al*. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 321–330.
10. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH *et al*. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 2005; **437**: 902–905.
11. Liao Y, Erdeban C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Bimbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 4682–4687.
12. Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergmann J, Eder P *et al*. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 8014–8022.
13. Ng SW, di Capite J, Singaravelu K, Parekh AB. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 2008; **283**: 31348–31355.
14. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M *et al*. Bcl-2-dependent modulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 2002; **1**: 169–179.
15. Abdullaev F, Bludov YY, Dmtriev SV, Kevrekidis PG, Konotop VV. Generalized neighbor-interaction models induced by nonlinear lattices. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2006; **77** (Pt 2): 016604.
16. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signaling to transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 2007; **42**: 145–156.
17. Silber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V *et al*. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2006; **10**: 688–697.
18. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996; **28**: 251–265.
19. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 2001; **12**: S141–S144.
20. Nantemmet PV, Xu J, Yu Y, Hodor P, Holder D, Adamski S *et al*. Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1310–1322.
21. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Halmmeier M, Klingenhoff A *et al*. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; **21**: 2933–2942.
22. Denmeade SR, Isaacs JT. The SERCA pump as a therapeutic target: making a 'smart bomb' for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**: 14–22.
23. Gonzalez VM, Fuentes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; **59**: 657–663.
24. Di Sano F, Ferraro E, Tuffi R, Achsel T, Piacentini M, Cecconi F. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem* 2006; **281**: 2893–2900.
25. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner Jr K, Boise LH, Chiao PJ, Huang P *et al*. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 11510–11519.
26. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for IP<sub>3</sub>A2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* 2006; **20**: 1215–1217.
27. Peinelt C, Vig M, Koome DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M *et al*. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 771–773.
28. Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* 2008; **15**: 124–134.
29. Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Abdullaev IF, Bisailon JM, Singer HA *et al*. Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J* 2008; **23**: 2425–2437.
30. Smyth JT, Petranka JG, Boyles RR, DeHaven WI, Fukushima M, Johnson KL *et al*. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* 2008; **11**: 1465–1472.
31. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 2007; **26**: 7380–7385.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 2001; **25**: 402–406.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

## Article 3

### “Role of Cationic Channel TRPV2 in Promoting Prostate Cancer Migration and Progression to Androgen Resistance”

Michaël Monet\*, V'yacheslav Lehen'kyi\*, Florian Gackiere, Virginie Firlej, **Matthieu Vandenberghe**, Morad Roudbaraki, Dimitra Gkika, Albin Pourtier, Gabriel Bidaux, Christian Slomianny, Philippe Delcourt, François Rassendren, Jean-Pierre Bergerat, Jocelyn Ceraline, Florence Cabon, Sandrine Humez, et Natalia Prevarskaya

Cancer Research; 70(3) February 1, 2010

\* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail

Le caractère agressif du cancer de la prostate est caractérisé par la transition des cellules cancéreuse vers un phénotype indépendant des androgènes, elles deviennent alors résistantes à l'apoptose. Cela s'accompagne d'une augmentation de la prolifération et de la migration cellulaire (210). Cependant, la nature moléculaire des acteurs impliqués dans ces phénomènes sont peu connus. Parmi les éléments régulant la migration des cellules cancéreuses, le calcium semble jouer un rôle primordial (211). Depuis quelques années, les canaux de la famille TRP suscitent un intérêt particulier et sont associés à de nombreuses pathologies, et certains en particuliers à la cancérogenèse, comme TRPM1 pour le mélanome (212) ou TRPV6 et TRPM8 dans le cancer de la prostate (145, 213). D'autres travaux ont mis en évidence que le cana TRPV2 est, lui aussi, exprimé dans la prostate, mais son rôle dans la cancérogenèse est encore inconnu (214). Ce canal peut être régulé par des lysophospholipides impliqués, entre autres, dans la stimulation de la migration des cellules cancéreuses (215).

Le but de cette étude est d'identifier le rôle de TRPV2 dans le développement et la progression de la tumeur prostatique et s'il peut constituer un marqueur de mauvais pronostic pour les personnes atteintes du cancer de la prostate.



## **Conclusion**

**Nous avons donc montré que la transition des cellules cancéreuses prostatique vers un phénotype androgène-indépendant s'accompagne de la nouvelle expression du canal TRPV2. L'expression de ce canal permettrait alors de maintenir un taux de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique constant de par son activité constitutive. Ce canal participe, en fait, à la migration et l'invasion des cellules cancéreuses prostatiques contribuant à la métastase du cancer par l'intermédiaire des protéines MMP2, MMP9 et cathepsine B.**

## Role of Cationic Channel TRPV2 in Promoting Prostate Cancer Migration and Progression to Androgen Resistance

Michaël Monet<sup>1,2</sup>, Vyacheslav Lehen'kyi<sup>1,2</sup>, Florian Gackiere<sup>1,2</sup>, Virginie Firlej<sup>3</sup>, Matthieu Vandenberghe<sup>1,2</sup>, Morad Roudbaraki<sup>1,2</sup>, Dimitra Gkika<sup>1,2</sup>, Albin Poutier<sup>4</sup>, Gabriel Bidaux<sup>1,2</sup>, Christian Slomianny<sup>1,2</sup>, Philippe Delcourt<sup>1,2</sup>, François Rassendren<sup>5</sup>, Jean-Pierre Bergerat<sup>6</sup>, Jocelyn Ceraline<sup>7</sup>, Florence Cabon<sup>3</sup>, Sandrine Humez<sup>1,2,8</sup>, and Natalia Prevarskaya<sup>1,2</sup>

### Abstract

Castration resistance in prostate cancer (PCa) constitutes an advanced, aggressive disease with poor prognosis, associated with uncontrolled cell proliferation, resistance to apoptosis, and enhanced invasive potential. The molecular mechanisms involved in the transition of PCa to castration resistance are obscure. Here, we report that the nonselective cationic channel transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) is a distinctive feature of castration-resistant PCa. TRPV2 transcript levels were higher in patients with metastatic cancer (stage M1) compared with primary solid tumors (stages T2a and T2b). Previous studies of the TRPV2 channel indicated that it is primarily involved in cancer cell migration and not in cell growth. Introducing TRPV2 into androgen-dependent LNCaP cells enhanced cell migration along with expression of invasion markers matrix metalloproteinase (MMP) 9 and cathepsin B. Consistent with the likelihood that TRPV2 may affect cancer cell aggressiveness by influencing basal intracellular calcium levels, small interfering RNA-mediated silencing of TRPV2 reduced the growth and invasive properties of PC3 prostate tumors established in nude mice xenografts, and diminished expression of invasive enzymes MMP2, MMP9, and cathepsin B. Our findings establish a role for TRPV2 in PCa progression to the aggressive castration-resistant stage, prompting evaluation of TRPV2 as a potential prognostic marker and therapeutic target in the setting of advanced PCa. *Cancer Res*; 70(3); 1225–35. ©2010 AACR.

### Introduction

Androgen ablation is initially beneficial to nearly all men suffering from prostate cancer (PCa) because androgen-dependent PCa cells undergo apoptotic death induced by such treatment (1). Unfortunately, androgen ablation is only palliative and patients relapse into castration-resistant PCa with dramatic consequences (2). Indeed, androgen-independent PCa cells do not enter the programmed cell death pathway following androgen ablation (3). Thus, the major reason for the ability of PCa cells to metastasize and kill the patient is not related to their rate of proliferation but to their extensive ability to survive once they have been disseminated to a distant site (4). These cells represent an androgen-insensitive and apoptosis-resistant cell phenotype in the prostate (5), and their abundance correlates with tumor malignancy, loss of

sensitivity to androgens, and poor prognosis (6, 7). In addition, the emergence of castration-resistant phenotype is concomitant with an increase in overall tumor growth and progression associated with enhanced level of cell migration (8). However, the molecular and cellular mechanisms controlling hormone refractoriness, apoptosis resistance, and migration of these cells are only partially understood (9). Among the different mechanisms regulating cancer cell migration, those that involve calcium dependence have been supposed to play a primary role (10, 11). The family of transient receptor potential (TRP) cationic protein channels displaying extraordinarily diverse activation mechanisms (12) has recently received increasing attention, in particular, to their link to human diseases (13–15). Some of these TRP channels have been reported to be involved in cancerogenesis: TRPM1 in melanoma (13) and TRPV6 and TRPM8 in PCa

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U-800, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer; <sup>2</sup>Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France; <sup>3</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris-Sud, FRE2944, Epigenetics and Cancer, Institut André Lwoff, Villejuif, France; <sup>4</sup>UMR 8161 Institut de Biologie de Lille Centre National de la Recherche Scientifique/Université Lille 1 et 2/Institut Pasteur de Lille, Lille, France; <sup>5</sup>Département de Pharmacologie, Institut de Génétique Fonctionnelle, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5203, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U661, Université Montpellier I, Université Montpellier II, Montpellier Cedex, France; <sup>6</sup>Département d'Onco-Hématologie, Hôpitaux

Universitaires de Strasbourg; <sup>7</sup>Unité Physiopathologie et Médecine Translationnelle, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, Strasbourg, France; and <sup>8</sup>Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, Lens, France

**Notes:** M. Monet and V. Lehen'kyi contributed equally to this work.

**Corresponding Author:** Natalia Prevarskaya, Laboratory of Cell Physiology, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U800, Bâtiment SN3, USTL, 59650 Villeneuve d'Ascq, France. Phone: 33-3-20-33-64-23; Fax: 33-3-20-43-40-66; E-mail: natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2205

©2010 American Association for Cancer Research.

(15–17). Among them, the TRP vanilloid 2 (TRPV2) channel is the one for which the mechanisms of regulation or the role in carcinogenesis is not known thus far. Recent studies have shown that mRNA of TRPV2 is expressed in prostate (18). TRPV2 function may be regulated by some lysophospholipids identified and known to have a range of physiologic and pathologic effects, including stimulation of cancer cell migration (19–21). However, the question remains as to how TRPV2 is involved in tumor development and progression both *in vitro* and *in vivo* to an extremely aggressive castration-resistant stage and whether it could be a real hallmark of poor prognosis in patients suffering from PCA.

## Materials and Methods

**Cell culture.** The androgen-dependent human PCA cell line LNCaP and androgen-independent human PCA cell lines LNCaP C4-2, DU145, and PC3 were obtained from the American Type Culture Collection and maintained in culture in RPMI 1640 (Life Technologies) supplemented with 10% FCS (Seromed, Poly-Labo), 5 mmol/L L-glutamine (Sigma), and 100 µg/mL kanamycin.

Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Before fluorescence measurements, the cells were trypsinized and transferred onto glass coverslips. Cells were used 2 to 4 d after trypsinization. The medium was replaced every 48 h.

**Generation of shTRPV2 vectors.** Hybridized oligonucleotides were cloned into pSilencer 4.1-CMV-puro vector (Ambion) following the manufacturer's instructions and defined as shTRPV2 I (sense, 5'-GGTAAGACGTGCCTGATGA-3') and shTRPV2 II (sense, 5'-TAAGAGTCAACCTCAACTA-3').

**Nucleofection.** Transfection of LNCaP or PC3 cells with TRPV2-GFP or with shTRPV2 I or II was carried out using Nucleofector (Amaxa GmbH) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3 µg of vector were transfected into 2 millions of trypsinized cells, which then were plated into a T75 flask or onto the glass coverslips for 72 h.

**Small interfering RNA transfection.** LNCaP and LNCaP C4-2 cells were transfected with 50 nmol/L small interfering RNA (siRNA) against TRPV2 (siTRPV2; synthesized by Dharmacon, Inc.) using 6 µL TransIT-TKO transfection reagent (Mirus, Inc.) following the manufacturer's instructions (see Table 1 for the siRNA sequence).

**Ca<sup>2+</sup> measurements using Fura-2 acetoxyethyl ester.** Before fluorescence measurements, the cells were trypsinized and plated onto glass slips. The medium was replaced every 48 h. Cells were used 3 d after trypsinization. The culture medium was replaced by a HBSS solution containing 142 mmol/L NaCl, 5.6 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 0.34 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/L HEPES, and 5.6 mmol/L glucose. The osmolarity and pH of this solution were adjusted to 310 mOsm/L and 7.4, respectively. When a calcium-free medium was required, CaCl<sub>2</sub> was omitted and replaced by equimolar MgCl<sub>2</sub>. Dye loading was achieved by transferring the cells into a standard HBSS solu-

tion containing 1 mmol/L Fura-2 acetoxyethyl ester (Calbiochem) loaded (45 min) for 40 min at 37°C, as described previously (11), using a photomultiplier-based system (Photon Technologies) and a double-wavelength (340 and 380 nm) excitation protocol to quantify the absolute value of calcium concentration (22). All recordings were made at 37°C. The cells were continuously perfused with HBSS solution via a whole-chamber perfusion system. The flow rate of the whole-chamber perfusion system was set to 1 mL/min and the chamber volume was 500 mL. The basal Ca<sup>2+</sup> was measured using HBSS solutions containing 0 and 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>. The relative increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> was measured following consecutive switch from free Ca<sup>2+</sup> medium to 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup> medium.

**Reverse transcription-PCR.** Total mRNA was isolated from cells as previously described (23). DNA amplification conditions included an initial denaturation step of 7 min at 95°C; 36 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C; and finally 7 min at 72°C. Primers used are listed in Table 1.

**Antibody production.** Rabbit polyclonal antibody anti-TRPV2 was produced in the laboratory headed by Dr. Rassen-dren (Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5203, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U661, Montpellier, France). The polypeptide ASEE-NYVPVQLLQS corresponding to 740 to 763 amino acids of the COOH-terminal sequence of the human TRPV2 channel (NM\_016113) was injected into rabbit to produce a polyclonal anti-TRPV2 antibody.

**Fluorescence experiments.** LNCaP cells nucleofected with TRPV2-GFP were washed twice with PBS and subjected to fluorescence analysis using a Zeiss LSM 510 confocal microscope and analysis software (AIM 3.2, Zeiss), as previously described (23).

**Western blotting.** The experiments were carried out as described previously (19). Membranes were reblotted twice: first with the anti-NSE mouse monoclonal antibody (1:250; Dako) and then with the anti-β-actin mouse monoclonal antibody (1:500; NeoMarkers).

**Migration assay.** Cells were seeded onto the top of Transwell cell culture inserts with 8.0-µm pore size (Falcon) at a density of 30,000 per well (24-well format) in serum-free culture medium. Cells were stimulated to migrate across the filters by providing 10% FCS as a chemoattractant in the assay chambers beneath the inserts. After 2 h, almost two thirds of the cells were adherent to each filter in the inserts. After 26 h of incubation at 37°C, nonmigratory cells were removed from the top of the 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/L in PBS). Cells under each filter were counted on five random examination fields (×200) using a Leica DMIRB. Data are expressed as means of four wells ± SE.

**Cell proliferation assay.** Cells were plated at the initial density of 500 per well for PC3 cells and 2,500 per well for LNCaP cells in 96-well plates (Poly-Labo). After 48 h, cells were cultured in the treatment medium (day 0). From day 0, half of the medium was changed daily for each condition.

The CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corp.) was used to determine the number of viable cells (11).

**Cancer tissue sampling and total RNA extraction.** After informed consent, patients with clear localized T2a and T2b stages of PCa for whom a prostatectomy has been scheduled, as well as patients with metastatic PCa having a stage M1 who were previously subjected to androgen ablation therapy, have been included in a clinical research program (protocol ID: 2897) funded by the Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (Strasbourg, France). A total volume of 3 mL of bone marrow was aspirated at a scintigraphic-indicated metastatic site. Microscopic observations were made from an aliquot of each bone marrow aspirate to confirm the presence of metastatic PCa cells. Total RNAs were extracted from small pieces of localized tumor by the use of the RNeasy Midi kit (Qiagen) and from bone marrow aspirates by the use of the QIAamp RNA Blood kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Nine samples from both localized and metastatic PCa were used in our study.

**Quantitative real-time PCR.** Quantitative real-time PCR of TRPV2 mRNA transcript was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) on the Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequence of primers is indicated in Table 1. The 18S rRNA 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 described by Livak and Schmittgen (24).

**Animals, siRNA injection, and tumorigenicity assays.** Studies involving animals, including housing and care, method of euthanasia, and experimental protocols, were conducted in accordance with the local animal ethical committee in the Institut André Lwoff in Villejuif, France. Tumor cells ( $2 \times 10^6$  per mouse) were injected s.c. in 50% (v/v) Matrigel (BD Biosciences) to 6- to 8-wk-old male nude

mice. Once tumors were exponentially growing, mice were randomized for treatment (at least six animals per group) and received daily i.p. either siRNA control (siCTL) or siTRPV2 at a dose of 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$  diluted in PBS. Mice were sacrificed after 17 d of treatment, and tumors were dissected and weighed.

**Data analysis.** Results were expressed as mean  $\pm$  SE. Plots were produced using Origin 7.0 (MicroCal Software, Inc.). Each experiment was repeated at least three times. *n* indicates the number of the 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.

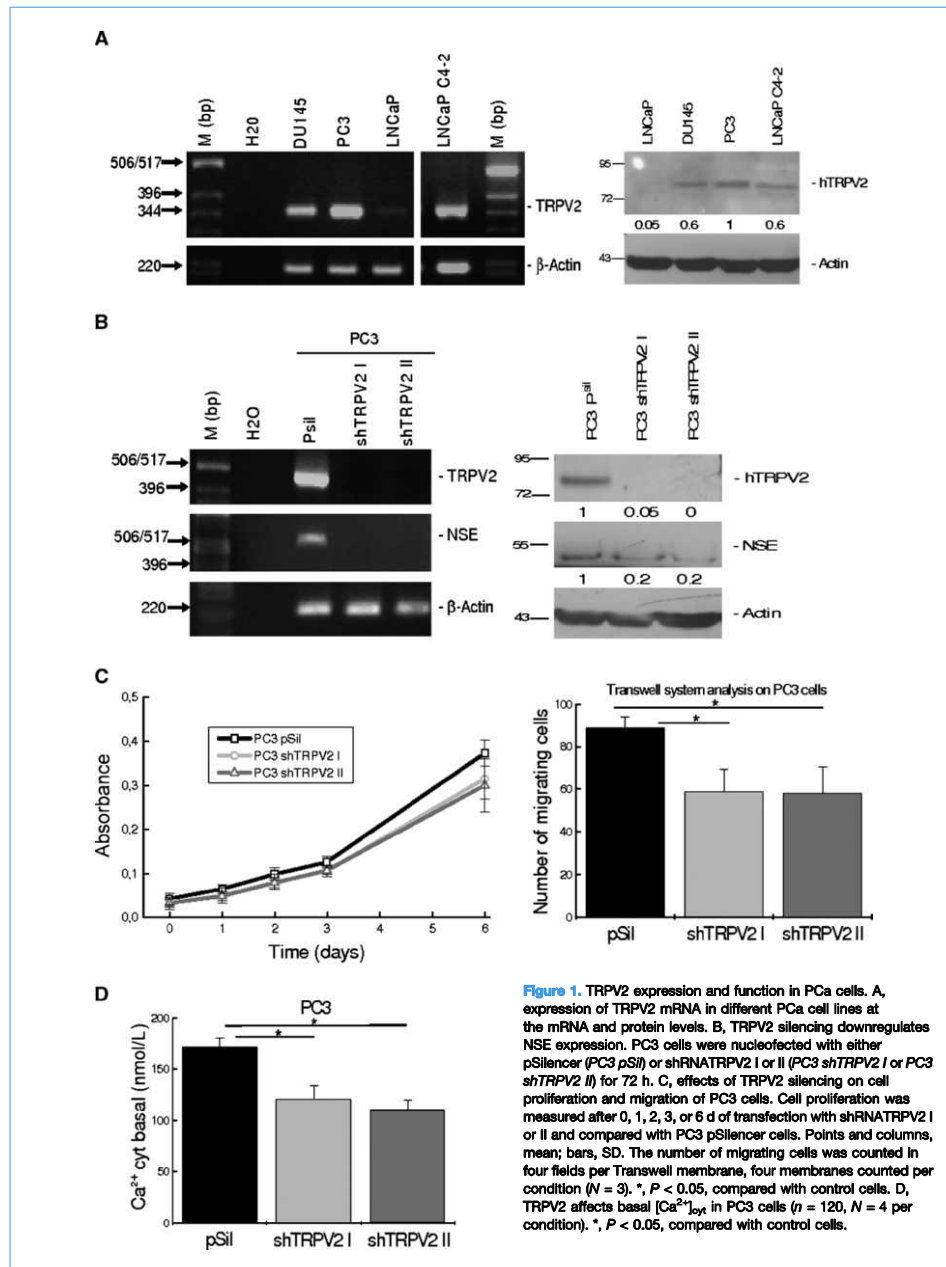
## Results

**TRPV2 channel expression and function in human PCa cell lines.** We have studied the expression of TRPV2 channel in the androgen-dependent human PCa cell line LNCaP, the androgen-independent human PCa cell line LNCaP C4-2 derived from androgen-dependent LNCaP cells, and the castration-resistant human PCa cell lines DU145 and PC3 (Fig. 1A).

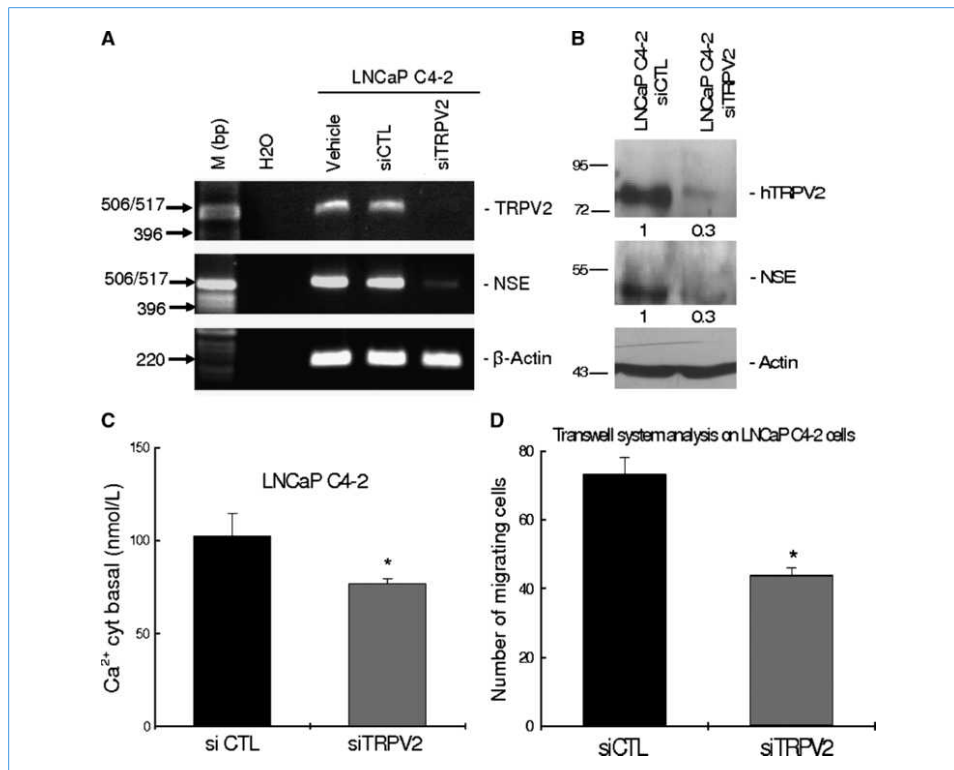
Short hairpin RNA (shRNA) TRPV2 I and II (PC3 shV2 I and II) were nucleofected into PC3 cells to specifically inhibit the expression of TRPV2 (Fig. 1B). TRPV2 knockdown with shTRPV2 I or II in PC3 cells led to significant suppression of both mRNA and protein of TRPV2 and NSE (Fig. 1B). We have shown that the proliferation rate of PC3 cells treated with shTRPV2 I or II evaluated during 6 days is not statistically different as compared with PC3 pSilencer-treated cells (*N* = 4; Fig. 1C). However, the cell migration is decreased in PC3 cells treated with shTRPV2 I or II ( $59 \pm 11$  cells for PC3 shTRPV2 I and  $58 \pm 12$  cells for PC3 shTRPV2 II, *n* = 4, *N* = 4; Fig. 1C) than in PC3 pSilencer cells ( $89 \pm 5$  cells, *n* = 4, *N* = 4). The basal  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  in PC3 treated with shTRPV2 I or II is lower ( $120 \pm 13$  nmol/L and  $110 \pm 9$  nmol/L, *n* = 120,

**Table 1.** List of primers used for RT-PCR amplifications and a siRNA-TRPV2 sequence

	5'-forward-3'	5'-reverse-3'	Product size (bp)	Accession number
TRPV2 (a)	CGGACTCGGAATACACAGAGG	TCCCAGTCTTGGTGCAAGCG	351	NM_016113.3
TRPV2 (b)	AAAGGGAACAGGTGCCAGTCA	TCCCAGTCTTGGTGCAAGCG	475	NM_016113.3
NSE	TGAGGGATGGAGACAAACAG	CTTGTCGATGGCTTCCCTCAC	553	NM_001975.2
GAPDH	TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGAAGTGTGGTCTATGA	237	NM_002046.3
$\beta$ -Actin	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	210	NM_001101
siRNA-TRPV2: 5'-UAAGAGUCAACCUCAACUdTdT-3'				
Primers for quantitative PCR				
TRPV2	CGAAGCCGAAAAGGAAGAC	TCCAGCACACAGGCATCTAC	99	NM_016113
MMP2	GGAAAGCCAGGATCCATTTT	ATGCCGCCTTTAACTGGAG	103	NM_004530
MMP9	TTGGTCCACCTGGTCAACT	ACGACGTCTCCAGTACCGA	95	NM_004994
Cathepsin B	CCAACACCAGCAGGCAG	CTGGGCTGCAGGCTCTC	99	NM_001908
18S	CAGCTTCCGGGAAACCAAAGTC	AATTAAGCCGCAGGCTCCACTC	111	NR_003286



**Figure 1.** TRPV2 expression and function in PCa cells. **A**, expression of TRPV2 mRNA in different PCa cell lines at the mRNA and protein levels. **B**, TRPV2 silencing downregulates NSE expression. PC3 cells were nucleofected with either pSilencer (PC3 pSil) or shRNATRNPV2 I or II (PC3 shTRPV2 I or PC3 shTRPV2 II) for 72 h. **C**, effects of TRPV2 silencing on cell proliferation and migration of PC3 cells. Cell proliferation was measured after 0, 1, 2, 3, or 6 d of transfection with shRNATRNPV2 I or II and compared with PC3 pSilencer cells. Points and columns, mean; bars, SD. The number of migrating cells was counted in four fields per Transwell membrane, four membranes counted per condition ( $N = 3$ ). \*,  $P < 0.05$ , compared with control cells. **D**, TRPV2 affects basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in PC3 cells ( $n = 120$ ,  $N = 4$  per condition). \*,  $P < 0.05$ , compared with control cells.



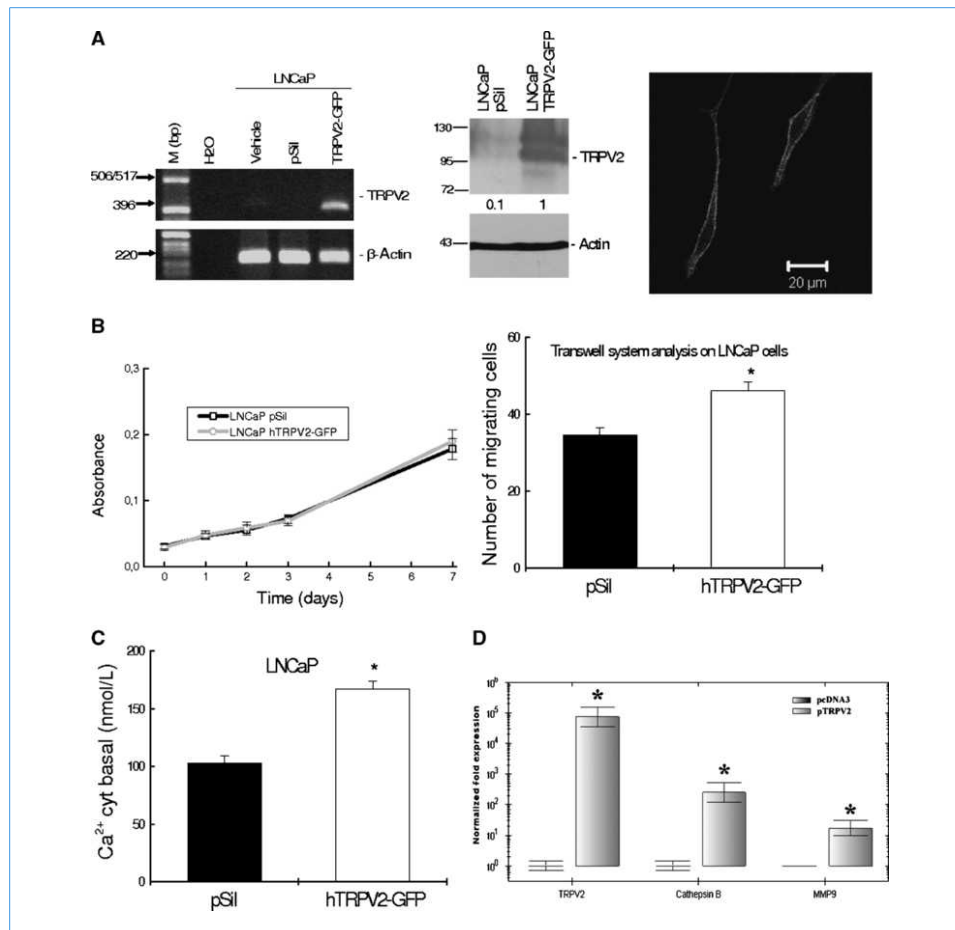
**Figure 2.** TRPV2 contributes to the oncogenic potential of LNCaP C4-2 cells. A, TRPV2 silencing downregulates NSE expression. LNCaP C4-2 cells were transfected with either 50 nmol/L siTRPV2 or siCTL for 72 h or untreated (vehicle) used as a control. B, expression of TRPV2 and NSE proteins in LNCaP C4-2 cells. LNCaP C4-2 cells were transfected with either 50 nmol/L siTRPV2 or siCTL for 72 h. C, TRPV2 affects basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in LNCaP C4-2 cells ( $n = 120$ ,  $N = 4$  per condition). \*,  $P < 0.05$ , compared with control cells. D, TRPV2 silencing by siTRPV2 decreases LNCaP C4-2 cell migration ( $N = 3$ ). \*,  $P < 0.05$ , compared with control cells.

$N = 4$ , respectively) than control pSilencer-transfected cells ( $172 \pm 9$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) in the presence of  $Ca^{2+}$  in the medium (Fig. 1D). This difference was abolished when the cells were kept in  $Ca^{2+}$ -free medium (data not shown).

**TRPV2 channel contributes to hormone refractoriness of LNCaP C4-2 cells.** Semiquantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) was used to show that LNCaP C4-2 cells express TRPV2 mRNA in the control (transfected with a vehicle) or with 50 nmol/L siCTL for 72 hours (Fig. 2A). To specifically silence TRPV2 mRNA, we transfected LNCaP C4-2 cells with 50 nmol/L siTRPV2 for 72 hours. We have also shown that in LNCaP C4-2 cells treated with siTRPV2, the NSE expression is downregulated (Fig. 2A). A Western blot experiment was used to confirm that transfection with 50 nmol/L siTRPV2 for 72 hours drastically diminished the

expression of TRPV2 and NSE proteins as compared with siCTL (Fig. 2B). The basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  is lower in LNCaP C4-2 cells transfected with siTRPV2 ( $77 \pm 2$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) than in LNCaP C4-2 cells transfected with siCTL ( $102 \pm 12$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) in the presence of  $Ca^{2+}$  in the medium (Fig. 2C). Our results also show that LNCaP C4-2 cell migration is drastically decreased in LNCaP C4-2 cells transfected with siTRPV2 ( $44 \pm 2$  cells,  $n = 4$ ,  $N = 4$ ) than in LNCaP C4-2 cells transfected with siCTL ( $73 \pm 5$  cells,  $n = 4$ ,  $N = 4$ ; Fig. 2D).

**The role of TRPV2 channel in PCa aggressiveness.** As we have shown, mRNA and protein of TRPV2 are not expressed in human PCa cell line LNCaP (Fig. 3A); however, LNCaP cells nucleofected with TRPV2-GFP (LNCaP TRPV2-GFP) expressed TRPV2 mRNA as compared with the cells



**Figure 3.** The effects of TRPV2 overexpression in androgen-dependent LNCaP cells. **A**, expression of TRPV2 in LNCaP cells nucleofected with either pSilencer (LNCaP pSil) or TRPV2-GFP for 72 h at the mRNA and protein level using Western blotting and confocal imaging; **B**, effects of TRPV2 overexpression on LNCaP cell proliferation and migration ( $N = 3$ ). Points and columns, mean; bars, SD. **C**, TRPV2-GFP transfection affects basal  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  in LNCaP cells ( $n = 120$ ,  $N = 4$  per condition). **D**, quantitative real-time PCR for LNCaP cells nucleofected with pTRPV2 plasmid as compared with pcDNA3 plasmid. The expression of TRPV2, MMP2, and cathepsin B is normalized to 18S gene expression. Columns, mean; bars, SD. \*,  $P < 0.05$ , compared with control cells.

nucleofected with a control plasmid pSilencer (LNCaP pSilencer). We have shown that the growth of LNCaP cells is not affected by the presence of TRPV2 channels ( $N = 4$ ; Fig. 3B) measured during 7 days. The cell migration is strongly increased in LNCaP TRPV2-GFP cells ( $46 \pm 2$  cells,  $n = 4$ ,  $N = 4$ ) than in LNCaP pSilencer cells ( $34 \pm 2$  cells,  $n = 4$ ,  $N = 4$ ; Fig. 2D). Basal  $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$  is higher in LNCaP TRPV2-GFP cells ( $167 \pm 7$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) than in LNCaP pSilencer

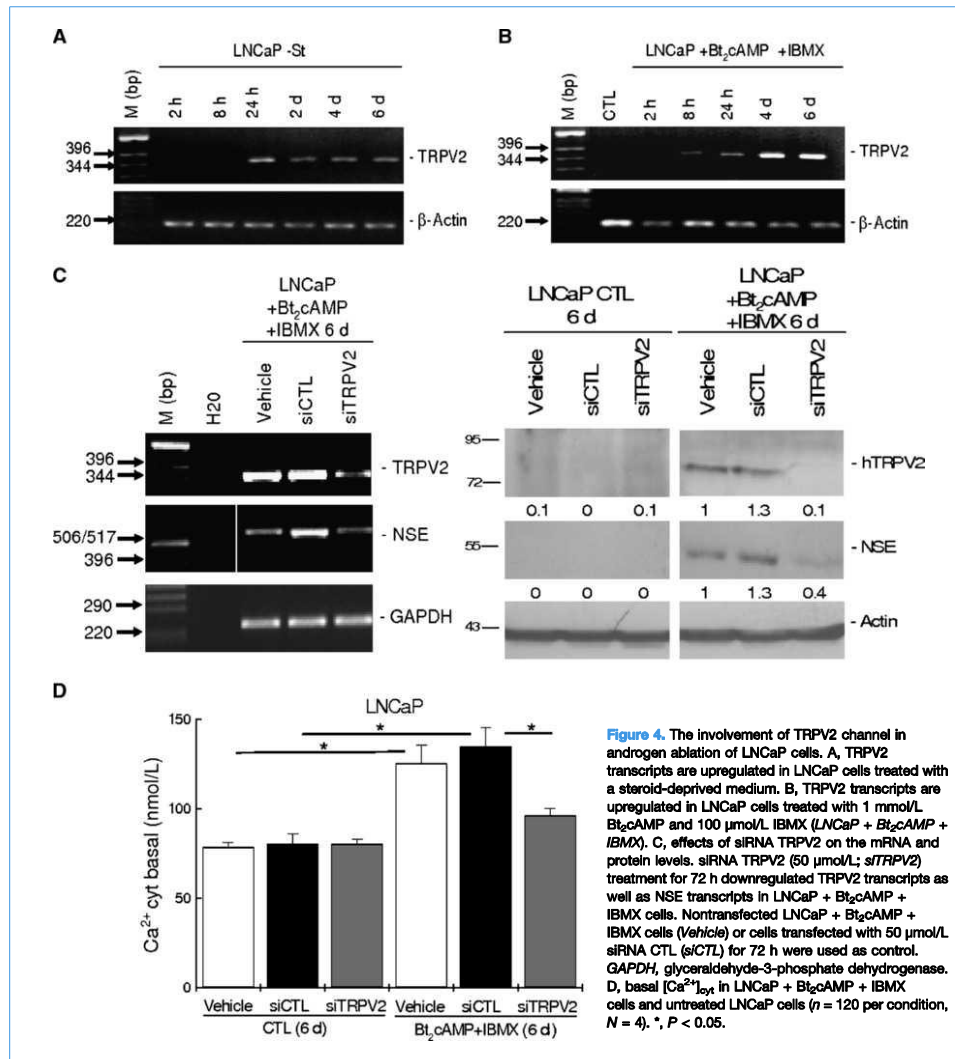
( $103 \pm 6$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) in the presence of  $Ca^{2+}$  in the medium (Fig. 3C). Such markers of invasion as cathepsin B and matrix metalloproteinase (MMP) 9 were shown to be induced on the expression of TRPV2 in these cells (Fig. 3D).

**Induction of TRPV2 expression during transition to castration-resistant phenotype.** A semiquantitative PCR experiment showed that, under conditions of androgen deprivation, the expression of TRPV2 mRNA is detected



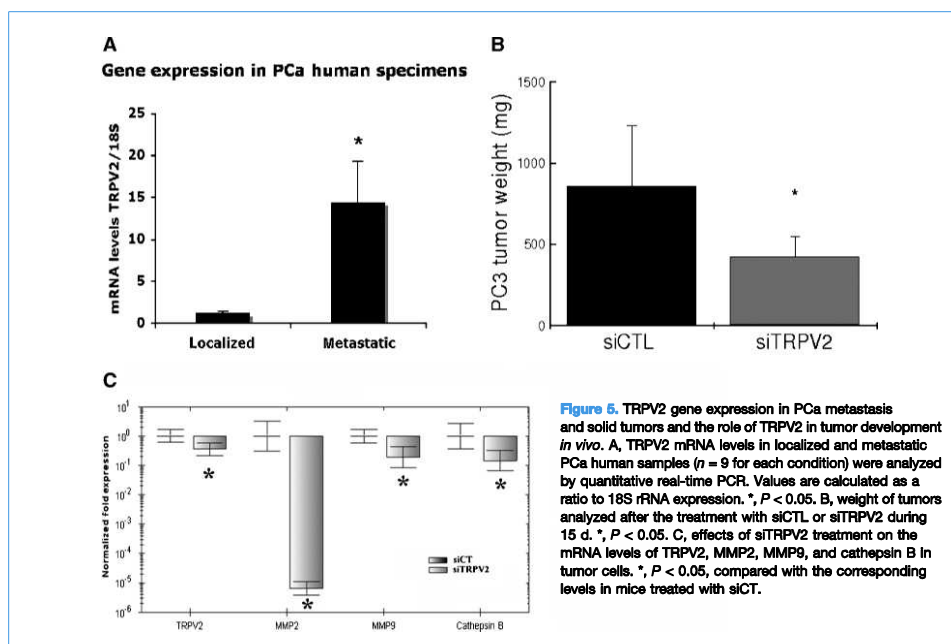
starting from 24 hours (Fig. 4A) and that this expression lasts for several days of the treatment. We have shown that the addition of  $Bt_2cAMP$  and IBMX to the culture medium induces TRPV2 mRNA expression in LNCaP cells after only 8 hours of treatment (Fig. 4B). Further, the siTRPV2 transfection into these cells reduces TRPV2 and NSE mRNA expression in LNCaP treated with 1 mmol/L  $Bt_2cAMP$  and 100  $\mu$ mol/L

IBMX for 6 days (Fig. 4C). We observed that both TRPV2 channel and NSE proteins were expressed (Fig. 4C), being absent in LNCaP CTL. siTRPV2 transfection of LNCaP cells treated with  $Bt_2cAMP$  and IBMX showed the consequent knockdown of both TRPV2 and NSE proteins. The basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  is higher in LNCaP cells (vehicle) treated with  $Bt_2cAMP$  and IBMX than in LNCaP CTL cells (vehicle; 125



**Figure 4.** The involvement of TRPV2 channel in androgen ablation of LNCaP cells. A, TRPV2 transcripts are upregulated in LNCaP cells treated with a steroid-deprived medium. B, TRPV2 transcripts are upregulated in LNCaP cells treated with 1 mmol/L  $Bt_2cAMP$  and 100  $\mu$ mol/L IBMX (LNCaP +  $Bt_2cAMP$  + IBMX). C, effects of siRNA TRPV2 on the mRNA and protein levels. siRNA TRPV2 (50  $\mu$ mol/L; siTRPV2) treatment for 72 h downregulated TRPV2 transcripts as well as NSE transcripts in LNCaP +  $Bt_2cAMP$  + IBMX cells. Nontransfected LNCaP +  $Bt_2cAMP$  + IBMX cells (Vehicle) or cells transfected with 50  $\mu$ mol/L siRNA CTL (siCTL) for 72 h were used as control. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. D, basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  in LNCaP +  $Bt_2cAMP$  + IBMX cells and untreated LNCaP cells ( $n = 120$  per condition,  $N = 4$ ). \*,  $P < 0.05$ .





**Figure 5.** TRPV2 gene expression in PCa metastasis and solid tumors and the role of TRPV2 in tumor development *in vivo*. **A**, TRPV2 mRNA levels in localized and metastatic PCa human samples ( $n = 9$  for each condition) were analyzed by quantitative real-time PCR. Values are calculated as a ratio to 18S rRNA expression. \*,  $P < 0.05$ . **B**, weight of tumors analyzed after the treatment with siCTL or siTRPV2 during 15 d. \*,  $P < 0.05$ . **C**, effects of siTRPV2 treatment on the mRNA levels of TRPV2, MMP2, MMP9, and cathepsin B in tumor cells. \*,  $P < 0.05$ , compared with the corresponding levels in mice treated with siCTL.

$\pm 10$  nmol/L and  $78 \pm 3$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$  per condition, respectively) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium (Fig. 4D). Cell transfection with siCTL does not significantly modify the basal  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  ( $135 \pm 10$  nmol/L for LNCaP treated with  $\text{Bt}_2\text{cAMP}$  and IBMX and  $80 \pm 6$  nmol/L for LNCaP CTL, respectively,  $n = 120$ ,  $N = 4$  per condition) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium. It should be noted that transfection of LNCaP cells with siTRPV2 had no effect on basal  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  ( $80 \pm 3$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium. However, in LNCaP treated with  $\text{Bt}_2\text{cAMP}$  and IBMX, the transfection with siTRPV2 significantly decreased the  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  ( $96 \pm 4$  nmol/L,  $n = 120$ ,  $N = 4$ ) in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  in the medium as compared with LNCaP treated with  $\text{Bt}_2\text{cAMP}$  and IBMX and transfected with siCTL.

**TRPV2 gene expression increases in PCa metastasis and is involved in tumor development in vivo.** A quantitative real-time PCR showed that mRNA expression is  $\sim 12$  times higher in metastatic PCa samples than in localized PCa samples ( $n = 9$  for each condition; Fig. 5A). The most pertinent question was whether TRPV2 silencing could inhibit tumor development *in vivo*. Previously, a RNA interference *in vivo* has been used to show that the androgen receptor is still required for the development of castration-resistant prostate tumors (25). Similarly, the model of mice bearing xenografted PC3 cell–provoked tumors has been created. Then, the mice were treated on a daily basis during 17 days with either siCTL

or siTRPV2 at a dose of  $120 \mu\text{g}/\text{kg}$  diluted in PBS. The weight of tumors was significantly smaller in mice treated with siTRPV2 than in siCTL-treated animals (Fig. 5B). To search for the mechanisms that might account for the profound effect of TRPV2 knockdown on the tumors, such markers of invasion as MMP2, MMP9, and cathepsin B were shown to be substantially downregulated on the TRPV2 knockdown *in vivo* (Fig. 5C).

## Discussion

In the present study, we report three major findings that allow the understanding of human PCa development and progression to castration-resistant phenotype. We have shown for the first time that (a) the PCa tumor progression to castration-resistant phenotype is characterized by the expression *de novo* of a cationic nonselective TRPV2 channel, which may be served as a reliable prognostic marker of the most aggressive castration-resistant stage; (b) the role of TRPV2 in cancer cells derived from castration-resistant tumors is to maintain an elevated level of cytosolic calcium due to the constitutive activity of the channel; (c) the main feature of the PCa metastatic cells—their ability to migrate and invade the adjacent tissues—could be mediated by TRPV2 activity via the direct regulation of such proteins as

MMP2, MMP9, and cathepsin B used by the cancer cell to invade.

The fact that the hormone refractoriness of PCa is featured by the emergence of malignant cell phenotypes characterized by uncontrolled proliferation, resistance to apoptosis, and enhanced potential to invade has led us to the search of some specific molecular intermediators helping PCa cells to escape a natural regulation by hormones. In the context of the present work, we report a nonselective cationic channel TRPV2 as a unique and distinguished feature of castration-resistant PCa. As the evidence, TRPV2 is ultimately expressed in metastatic castration-resistant PCa samples rather than in localized hormone-responsive PCa tumors. Indeed, until now, TRPV2 channel has never been associated with the development and progression of PCa. Unlike some other TRP channels (e.g., TRPM8 channel), the expression of TRPV2 channel does not require the presence and/or activation of an androgen receptor (26). Therefore, it seems likely that TRPV2 expression being confined to the castration-resistant phenotype, which is no longer under AR control, may be used by the cancer cell to increase its oncogenic potential.

It has been previously shown that TRPV2 channels were constitutively activated in TRPV2-overexpressing cell systems and induced an increase in basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  (27). Our results show that the basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  is higher in hormone-resistant PCa cell lines, which express TRPV2, as compared with androgen-dependent LNCaP cell line, which does not express TRPV2. This increase in calcium is ultimately mediated by TRPV2 because, on the one hand, this high level may be achieved by TRPV2 transfection into LNCaP cells and, on the other hand, shRNA of TRPV2 prevents calcium increase. Thus, by increasing basal  $[Ca^{2+}]_{cyt}$ , which is apparently temporally and spatially regulated in the cancer cell, TRPV2 channels contribute to the progression to castration-resistant phenotype.

The transition of PCa cells to hormone-insensitive phenotype is a common feature of human prostate carcinoma (28, 29) and the appearance of neuroendocrine markers is considered to be associated with a poor prognosis and reduced long-term survival (30). We have shown that TRPV2 expression is associated with the NSE expression in PC3 and LNCaP C4-2 cells. It has been already shown that other neuroendocrine cell markers, PGP9.5 and chromogranin A, are expressed in PCa derived from metastatic (lymph node and bone) adenocarcinomas, suggesting that these cells had undergone specific PCa neuroendocrine differentiation (31). This is usually accompanied by the loss of a nuclear androgen receptor (5) or, in the case of LNCaP C4-2, by the loss of androgen sensitivity (32). Both steroid deprivation and  $Bt_2cAMP$  and IBMX treatments were used to restore in the experimental conditions the consequences of androgen ablation therapy in men *in vivo*. Interestingly, both treatments resulted in the expression of TRPV2 channels in androgen-deprived LNCaP cells, in increase in cytosolic calcium levels, and in overexpression of NSE. The latter has already been used as a marker because serum NSE in metastatic PCa patients who underwent endocrine therapy is sig-

nificantly higher than that in nonmetastatic patients (33). Our data were confirmed by the clinical *in vivo* studies using the biopsies of the patients subjected to hormone ablation therapy and who finally developed a castration-resistant metastatic PCa.

TRPV2 was suggested to be a physiologic sensor of hot temperatures (34). It is also expressed in nonneuronal cells, such as prostate cells (19, 35), or in human blood cells, suggesting that, in addition to its role as a noxious heat sensor (34), this channel may encompass other cellular functions (36). One of such function of TRPV2 in cancer cells is the control of cell migration. As we have shown, TRPV2 is primarily involved in PCa cell migration and not in cell proliferation. TRPV2 silencing drastically decreased the migration of the cancer cells derived from castration-resistant tumors and that TRPV2 overexpression increased cell migration of androgen-dependent LNCaP cells. Such a promigrative role of TRPV2 has been also previously shown on macrophage cells (37). To have an insight into the possible molecular mechanisms responsible for TRPV2-induced enhanced potential to invade, such markers of invasion as MMP2, MMP9, and cathepsin B (38–40) were studied. We have shown that the expression of the above enzymes directly participating in the process of invasion is strongly dependent on TRPV2 expression. Indeed, the transfection of TRPV2 channel into androgen-dependent LNCaP cells induces the expression of MMP9 and cathepsin B, and at the same time, the siRNA knockdown *in vivo* leads to progressive downregulation of these markers in the xenografted tumors.

Moreover, our data obtained *in vivo* using a nude mice xenograft model show that TRPV2 silencing in mice bearing TRPV2-expressing PC3 cell tumors significantly decreased the tumor weight, suggesting that tumors void of TRPV2 channel are likely to undergo necrosis. The fact that siRNA against particular target does not inhibit cancer cell proliferation or is implicated in cell survival *in vitro*, preserving its strong antitumor effects *in vivo*, comes from the specific suppression of this cancer cell migration. Indeed, the continuous cell division inside of the tumor without any possibility to invade the host in addition to restriction on oxygen and nutrition element supply leads eventually to tissue necrosis (see ref. 41 for review).

Thus, the involvement of TRPV2 in the invasion process by enhancing cell migration is evident for more aggressive PCa cells and therefore seems vital for the PCa tumor in general.

In conclusion, we have discovered a new feature of castration-resistant PCa characterized by *de novo* expression of a nonselective cationic TRPV2 channel. The latter has been shown to manifest its activity via maintaining an elevated intracellular calcium concentration. As a result of TRPV2 function, it contributes to enhanced cancer cell migration by induction of key proteases—MMP2, MMP9, cathepsin B—and is necessary for castration-resistant tumor development and progression, as we have shown *in vivo*. Thus, TRPV2 channel could be a prospective prognostic marker and potential therapeutic target for future interventions to increase the life expectancy of the patients.

## Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## Acknowledgments

We thank Thierry Capiod, Etienne Dewailly, and Gilbert Lepage for helpful advices.

## Grant Support

Ministère de l'Éducation Nationale, Association pour la Recherche sur le Cancer, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Ligne Nationale Contre le Cancer.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received 6/16/09; revised 11/19/09; accepted 11/20/09; published OnlineFirst 1/26/10.

## References

- Kyprianou N, English HF, Isaacs JT. Programmed cell death during regression of PC-82 human prostate cancer following androgen ablation. *Cancer Res* 1990;50:3748-53.
- Crawford ED. Combined androgen blockade. *Urology* 1989;34:22-6, discussion 46-56.
- Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996;26:251-65.
- Berges RR, Vukanovic J, Epstein JI, et al. Implication of cell kinetic changes during the progression of human prostatic cancer. *Clin Cancer Res* 1995;1:473-80.
- Krijnen JL, Janssen PJ, Ruizeveld de Winter JA, van Krimpen H, Schroder FH, van der Kwast TH. Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry* 1993;100:393-8.
- Cussenot O, Villette JM, Cochand-Priollet B, Berthon P. Evaluation and clinical value of neuroendocrine differentiation in human prostatic tumors. *Prostate Suppl* 1998;8:43-51.
- Jongsma J, Oomen MH, Noordzij MA, et al. Kinetics of neuroendocrine differentiation in an androgen-dependent human prostate xenograft model. *Am J Pathol* 1999;154:543-51.
- Grohholz R, Griebel M, Sauer CG, Michel MS, Trojan L, Bleyl U. Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 2005;36:562-70.
- Vashchenko N, Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities. *Eur Urol* 2005;47:147-55.
- Amorino GP, Parsons SJ. Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14:287-300.
- Humez S, Monet M, Legrand G, Lepage G, Delcourt P, Prevarskaya N. Epidermal growth factor-induced neuroendocrine differentiation and apoptotic resistance of androgen-independent human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:181-95.
- Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels (GRAC), 2nd edition (2007 revision). *Br J Pharmacol* 2007;150 Suppl 1: S1-168.
- Duncan LM, Deeds J, Hunter J, et al. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 1998;58:1515-20.
- Prawitt D, Enklaar T, Klemm G, et al. Identification and characterization of MTR1, a novel gene with homology to melastatin (MLSN1) and the trp gene family located in the BWS-WT2 critical region on chromosome 11p15.5 and showing allele-specific expression. *Hum Mol Genet* 2000;9:203-16.
- 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;61:3760-9.
- Peng JB, Zhuang L, Berger UV, et al. CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282:729-34.
- Lehen'kyl V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 2007;26:7380-5.
- Wang HP, Fu XY, Wang XH. Distribution profiles of transient receptor potential melastatin-related and vanilloid-related channels in prostatic tissue in rat. *Asian J Androl* 2007;9:634-40.
- Monet M, Glikka D, Lehen'kyl V, et al. Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:528-39.
- Park KS, Lee HY, Lee SY, et al. Lysophosphatidylethanolamine stimulates chemotactic migration and cellular invasion in SK-OV3 human ovarian cancer cells: involvement of pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptor. *FEBS Lett* 2007;581:4411-6.
- Pebay A, Bonder CS, Pitson SM. Stem cell regulation by lysophospholipids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;84:83-97.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-50.
- Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, et al. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatin family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:39423-35.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-ΔΔC<sub>T</sub>) method. *Methods* 2001;25:402-8.
- Compagno D, Merle C, Morin A, et al. siRNA-directed *in vivo* silencing of androgen receptor inhibits the growth of castration-resistant prostate carcinomas. *PLoS One* 2007;2:e1006.
- Bidaux G, Roudbaraki M, Merle C, et al. Evidence for specific TRPM8 expression in human prostate secretory epithelial cells: functional androgen receptor requirement. *Endocr Relat Cancer* 2005;12:367-82.
- Penna A, Juvin V, Chemin J, Compan V, Monet M, Rassendren FA. PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane. *Cell Calcium* 2006;39:495-507.
- Abrahamsson PA. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Prostate* 1999;39:135-48.
- di Sant'Agnese PA, Cockett AT. Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 1996;78:357-61.
- Cohen MK, Arber DA, Coffield KS, Keegan GT, McClintock J, Speights VO, Jr. Neuroendocrine differentiation in prostatic adenocarcinoma and its relationship to tumor progression. *Cancer* 1994;74:1899-903.
- Leiblich A, Cross SS, Catto JW, Pesce G, Hamdy FC, Rehman I. Human prostate cancer cells express neuroendocrine cell markers PGP 9.5 and chromogranin A. *Prostate* 2007;67:1761-9.
- 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;57:406-12.
- Kamiya N, Akakura K, Suzuki H, Ishikida S, Komiya A, Ueda T, Ito H.

- Pretreatment serum level of neuron specific enolase (NSE) as a prognostic factor in metastatic prostate cancer patients treated with endocrine therapy. *Eur Urol* 2003;44:309–14, discussion 314.
34. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 1999;396:436–41.
  35. Kowase T, Nakazato Y, Yoko OH, Morikawa A, Kojima I. Immunohistochemical localization of growth factor-regulated channel (GRC) in human tissues. *Endocr J* 2002;49:349–55.
  36. Saunders CI, Kunde DA, Crawford A, Geraghty DP. Expression of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and 2 (TRPV2) in human peripheral blood. *Mol Immunol* 2007;44:1429–35.
  37. Nagasawa M, Nakagawa Y, Tanaka S, Kojima I. Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages. *J Cell Physiol* 2007;210:692–702.
  38. Overall CM, Dean RA. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:69–75.
  39. van Kempen LC, Coussens LM. MMP9 potentiates pulmonary metastasis formation. *Cancer Cell* 2002;2:251–2.
  40. Podgorski I, Sloane BF. Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp* 2003:263–76.
  41. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci* 2007;120:379–83.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. A. B. Wysocki, Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *The Nursing clinics of North America* **34**, 777 (Dec, 1999).
2. L. Pedersen, G. B. Jemec, Mechanical properties and barrier function of healthy human skin. *Acta dermato-venereologica* **86**, 308 (2006).
3. D. Schmitt, [Cutaneous immune system]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales* **188**, 207 (1994).
4. J. Kanitakis, Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European journal of dermatology : EJD* **12**, 390 (Jul-Aug, 2002).
5. L. T. Smith, K. A. Holbrook, Embryogenesis of the dermis in human skin. *Pediatric dermatology* **3**, 271 (Sep, 1986).
6. K. A. Holbrook, P. H. Byers, S. R. Pinnell, The structure and function of dermal connective tissue in normal individuals and patients with inherited connective tissue disorders. *Scanning electron microscopy*, 1731 (1982).
7. A. B. Wysocki, A review of the skin and its appendages. *Advances in wound care : the journal for prevention and healing* **8**, 53 (Mar-Apr, 1995).
8. R. E. Burgeson, A. M. Christiano, The dermal-epidermal junction. *Current opinion in cell biology* **9**, 651 (Oct, 1997).
9. R. A. Briggaman, C. E. Wheeler, Jr., The epidermal-dermal junction. *The Journal of investigative dermatology* **65**, 71 (Jul, 1975).
10. W. G. Carter, E. A. Wayner, T. S. Bouchard, P. Kaur, The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *The Journal of cell biology* **110**, 1387 (Apr, 1990).
11. L. Borradori, A. Sonnenberg, Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *The Journal of investigative dermatology* **112**, 411 (Apr, 1999).
12. C. Margadant, E. Frijns, K. Wilhelmssen, A. Sonnenberg, Regulation of hemidesmosome disassembly by growth factor receptors. *Current opinion in cell biology* **20**, 589 (Oct, 2008).
13. M. Prunieras, M. Regnier, S. Fougere, D. Woodley, Keratinocytes synthesize basal-lamina proteins in culture. *The Journal of investigative dermatology* **81**, 74s (Jul, 1983).
14. M. E. Ming, H. A. Daryanani, L. P. Roberts, H. P. Baden, J. C. Kvedar, Binding of keratin intermediate filaments (K10) to the cornified envelope in mouse epidermis:

- implications for barrier function. *The Journal of investigative dermatology* **103**, 780 (Dec, 1994).
15. R. S. Bressler, C. H. Bressler, Functional anatomy of the skin. *Clinics in podiatric medicine and surgery* **6**, 229 (Apr, 1989).
  16. T. Hirobe, Structure and function of melanocytes: microscopic morphology and cell biology of mouse melanocytes in the epidermis and hair follicle. *Histology and histopathology* **10**, 223 (Jan, 1995).
  17. K. U. Schallreuter, A review of recent advances on the regulation of pigmentation in the human epidermis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **45**, 943 (Nov, 1999).
  18. J. W. Streilein, P. R. Bergstresser, Langerhans cells: antigen presenting cells of the epidermis. *Immunobiology* **168**, 285 (Dec, 1984).
  19. J. K. Salmon, C. A. Armstrong, J. C. Ansel, The skin as an immune organ. *The Western journal of medicine* **160**, 146 (Feb, 1994).
  20. I. Moll *et al.*, Human Merkel cells--aspects of cell biology, distribution and functions. *European journal of cell biology* **84**, 259 (Mar, 2005).
  21. Z. Halata, M. Grim, K. I. Bauman, Friedrich Sigmund Merkel and his "Merkel cell", morphology, development, and physiology: review and new results. *The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology* **271**, 225 (Mar, 2003).
  22. P. Corcuff, C. Bertrand, J. L. Leveque, Morphometry of human epidermis in vivo by real-time confocal microscopy. *Archives of dermatological research* **285**, 475 (1993).
  23. E. Fuchs, Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Princess Takamatsu symposia* **24**, 290 (1994).
  24. J. L. Brissette, N. M. Kumar, N. B. Gilula, J. E. Hall, G. P. Dotto, Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 6453 (Jul 5, 1994).
  25. B. Risek, F. G. Klier, N. B. Gilula, Developmental regulation and structural organization of connexins in epidermal gap junctions. *Developmental biology* **164**, 183 (Jul, 1994).
  26. D. Salomon, J. H. Saurat, P. Meda, Cell-to-cell communication within intact human skin. *The Journal of clinical investigation* **82**, 248 (Jul, 1988).

27. C. Jamora, E. Fuchs, Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature cell biology* **4**, E101 (Apr, 2002).
28. A. Al-Amoudi, A. S. Frangakis, Structural studies on desmosomes. *Biochemical Society transactions* **36**, 181 (Apr, 2008).
29. E. Delva, D. K. Tucker, A. P. Kowalczyk, The desmosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **1**, a002543 (Aug, 2009).
30. Y. Aoyama, Y. Yamamoto, F. Yamaguchi, Y. Kitajima, Low to high Ca<sup>2+</sup> -switch causes phosphorylation and association of desmocollin 3 with plakoglobin and desmoglein 3 in cultured keratinocytes. *Experimental dermatology* **18**, 404 (Apr, 2009).
31. M. Amagai, Adhesion molecules. I: Keratinocyte-keratinocyte interactions; cadherins and pemphigus. *The Journal of investigative dermatology* **104**, 146 (Jan, 1995).
32. M. Amagai, Desmoglein as a target in autoimmunity and infection. *Journal of the American Academy of Dermatology* **48**, 244 (Feb, 2003).
33. A. A. Dlugosz, S. H. Yuspa, Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *The Journal of cell biology* **120**, 217 (Jan, 1993).
34. K. A. Holbrook, Biologic structure and function: perspectives on morphologic approaches to the study of the granular layer keratinocyte. *The Journal of investigative dermatology* **92**, 84S (Apr, 1989).
35. K. C. Madison, Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **121**, 231 (Aug, 2003).
36. E. Candi, R. Schmidt, G. Melino, The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 328 (Apr, 2005).
37. M. Haftek, M. H. Teillon, D. Schmitt, Stratum corneum, corneodesmosomes and ex vivo percutaneous penetration. *Microscopy research and technique* **43**, 242 (Nov 1, 1998).
38. L. M. Milstone, Epidermal desquamation. *Journal of dermatological science* **36**, 131 (Dec, 2004).
39. T. T. Sun, R. Eichner, W. G. Nelson, A. Vidrich, J. Woodcock-Mitchell, Keratin expression during normal epidermal differentiation. *Current problems in dermatology* **11**, 277 (1983).



40. D. Skerrow, C. J. Skerrow, Tonofilament differentiation in human epidermis, isolation and polypeptide chain composition of keratinocyte subpopulations. *Experimental cell research* **143**, 27 (Jan, 1983).
41. V. V. Terskikh, A. V. Vasil'ev, [Apoptosis and differentiation of epidermal keratinocytes]. *Ontogenez* **36**, 85 (Mar-Apr, 2005).
42. P. Fleckman, B. A. Dale, K. A. Holbrook, Profilaggrin, a high-molecular-weight precursor of filaggrin in human epidermis and cultured keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **85**, 507 (Dec, 1985).
43. M. Manabe, M. Sanchez, T. T. Sun, B. A. Dale, Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation; research in biological diversity* **48**, 43 (Sep, 1991).
44. P. W. Wertz, Lipids and barrier function of the skin. *Acta dermato-venereologica. Supplementum* **208**, 7 (2000).
45. R. L. Eckert, M. T. Sturniolo, A. M. Broome, M. Ruse, E. A. Rorke, Transglutaminase function in epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **124**, 481 (Mar, 2005).
46. T. Egelrud, M. Regnier, B. Sondell, B. Shroot, R. Schmidt, Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in reconstructed human epidermis and its suppression by retinoic acid. *Acta dermato-venereologica* **73**, 181 (Jun, 1993).
47. H. Hennings, K. A. Holbrook, Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Experimental cell research* **143**, 127 (Jan, 1983).
48. S. Pillai, D. D. Bikle, M. L. Mancianti, P. Cline, M. Hincenbergs, Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *Journal of cellular physiology* **143**, 294 (May, 1990).
49. S. H. Yuspa, A. E. Kilkenny, P. M. Steinert, D. R. Roop, Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *The Journal of cell biology* **109**, 1207 (Sep, 1989).
50. V. M. Braga, K. J. Hodivala, F. M. Watt, Calcium-induced changes in distribution and solubility of cadherins, integrins and their associated cytoplasmic proteins in human keratinocytes. *Cell adhesion and communication* **3**, 201 (Aug, 1995).

51. M. F. Denning *et al.*, Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 149 (Feb, 1995).
52. D. Hohl, U. Lichti, D. Breitkreutz, P. M. Steinert, D. R. Roop, Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *The Journal of investigative dermatology* **96**, 414 (Apr, 1991).
53. R. H. Rice, H. Green, Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* **18**, 681 (Nov, 1979).
54. S. M. Thacher, R. H. Rice, Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* **40**, 685 (Mar, 1985).
55. H. Hennings, P. Steinert, M. M. Buxman, Calcium induction of transglutaminase and the formation of epsilon(gamma-glutamyl) lysine cross-links in cultured mouse epidermal cells. *Biochemical and biophysical research communications* **102**, 739 (Sep 30, 1981).
56. S. M. Thacher, Purification of keratinocyte transglutaminase and its expression during squamous differentiation. *The Journal of investigative dermatology* **92**, 578 (Apr, 1989).
57. D. F. Gibson, A. V. Ratnam, D. D. Bikle, Evidence for separate control mechanisms at the message, protein, and enzyme activation levels for transglutaminase during calcium-induced differentiation of normal and transformed human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **106**, 154 (Jan, 1996).
58. D. C. Ng, S. Shafae, D. Lee, D. D. Bikle, Requirement of an AP-1 site in the calcium response region of the involucrin promoter. *The Journal of biological chemistry* **275**, 24080 (Aug 4, 2000).
59. R. R. Polakowska, B. A. Graf, V. Falciano, P. LaCelle, Transcription regulatory elements of the first intron control human transglutaminase type I gene expression in epidermal keratinocytes. *Journal of cellular biochemistry* **73**, 355 (Jun 1, 1999).
60. G. K. Menon, S. Grayson, P. M. Elias, Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *The Journal of investigative dermatology* **84**, 508 (Jun, 1985).

61. G. K. Menon, P. M. Elias, K. R. Feingold, Integrity of the permeability barrier is crucial for maintenance of the epidermal calcium gradient. *The British journal of dermatology* **130**, 139 (Feb, 1994).
62. P. M. Elias *et al.*, Modulations in epidermal calcium regulate the expression of differentiation-specific markers. *The Journal of investigative dermatology* **119**, 1128 (Nov, 2002).
63. G. R. Sharpe, J. I. Gillespie, J. R. Greenwell, An increase in intracellular free calcium is an early event during differentiation of cultured human keratinocytes. *FEBS letters* **254**, 25 (Aug 28, 1989).
64. M. M. Suter, F. M. Cramer, J. P. Slattery, P. J. Millard, F. A. Gonzalez, Extracellular ATP and some of its analogs induce transient rises in cytosolic free calcium in individual canine keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **97**, 223 (Aug, 1991).
65. E. M. Brown *et al.*, Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575 (Dec 9, 1993).
66. D. D. Bikle, A. Ratnam, T. Mauro, J. Harris, S. Pillai, Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *The Journal of clinical investigation* **97**, 1085 (Feb 15, 1996).
67. Y. Oda, C. L. Tu, S. Pillai, D. D. Bikle, The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* **273**, 23344 (Sep 4, 1998).
68. C. L. Tu, W. Chang, D. D. Bikle, The role of the calcium sensing receptor in regulating intracellular calcium handling in human epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **127**, 1074 (May, 2007).
69. K. Punnonen *et al.*, Keratinocyte differentiation is associated with changes in the expression and regulation of phospholipase C isoenzymes. *The Journal of investigative dermatology* **101**, 719 (Nov, 1993).
70. Z. Xie, D. D. Bikle, Phospholipase C-gamma1 is required for calcium-induced keratinocyte differentiation. *The Journal of biological chemistry* **274**, 20421 (Jul 16, 1999).
71. T. M. Mauro, R. R. Isseroff, R. Lasarow, P. A. Pappone, Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *The Journal of membrane biology* **132**, 201 (Mar, 1993).

72. T. M. Mauro, P. A. Pappone, R. R. Isseroff, Extracellular calcium affects the membrane currents of cultured human keratinocytes. *Journal of cellular physiology* **143**, 13 (Apr, 1990).
73. S. Cai, S. Fatherazi, R. B. Presland, C. M. Belton, K. T. Izutsu, TRPC channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *Journal of dermatological science* **40**, 21 (Oct, 2005).
74. S. Pillai, D. D. Bikle, P. M. Elias, Vitamin D and epidermal differentiation: evidence for a role of endogenously produced vitamin D metabolites in keratinocyte differentiation. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* **1**, 149 (1988).
75. D. D. Bikle *et al.*, The vitamin D response element of the involucrin gene mediates its regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *The Journal of investigative dermatology* **119**, 1109 (Nov, 2002).
76. Y. C. Li *et al.*, Targeted ablation of the vitamin D receptor: an animal model of vitamin D-dependent rickets type II with alopecia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 9831 (Sep 2, 1997).
77. S. Pillai, D. D. Bikle, P. M. Elias, 1,25-Dihydroxyvitamin D production and receptor binding in human keratinocytes varies with differentiation. *The Journal of biological chemistry* **263**, 5390 (Apr 15, 1988).
78. M. J. Su, D. D. Bikle, M. L. Mancianti, S. Pillai, 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> potentiates the keratinocyte response to calcium. *The Journal of biological chemistry* **269**, 14723 (May 20, 1994).
79. T. Yoshizawa *et al.*, Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nature genetics* **16**, 391 (Aug, 1997).
80. D. D. Bikle *et al.*, Mice lacking 25OHD 1alpha-hydroxylase demonstrate decreased epidermal differentiation and barrier function. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **89-90**, 347 (May, 2004).
81. D. D. Bikle, H. Elalieh, S. Chang, Z. Xie, J. P. Sundberg, Development and progression of alopecia in the vitamin D receptor null mouse. *Journal of cellular physiology* **207**, 340 (May, 2006).

82. A. V. Ratnam, D. D. Bikle, J. K. Cho, 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> enhances the calcium response of keratinocytes. *Journal of cellular physiology* **178**, 188 (Feb, 1999).
83. Z. Xie, D. D. Bikle, The role of phospholipase C-gamma1 in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) regulated keratinocyte differentiation. *Steroids* **66**, 339 (Mar-May, 2001).
84. V. Lehen'kyi *et al.*, TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* **282**, 22582 (Aug 3, 2007).
85. T. Lechler, E. Fuchs, Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* **437**, 275 (Sep 8, 2005).
86. E. Fuchs, Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**, 834 (Feb 22, 2007).
87. I. M. Leigh *et al.*, Keratins (K16 and K17) as markers of keratinocyte hyperproliferation in psoriasis in vivo and in vitro. *The British journal of dermatology* **133**, 501 (Oct, 1995).
88. R. Gniadecki, Regulation of keratinocyte proliferation. *General pharmacology* **30**, 619 (May, 1998).
89. Y. Shirakata, Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *Journal of dermatological science* **59**, 73 (Aug, 2010).
90. W. K. Lee *et al.*, Purinoceptor-mediated calcium mobilization and proliferation in HaCaT keratinocytes. *Journal of dermatological science* **25**, 97 (Feb, 2001).
91. B. Beck *et al.*, TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **126**, 1982 (Sep, 2006).
92. N. Azorin *et al.*, ATP signalling is crucial for the response of human keratinocytes to mechanical stimulation by hypo-osmotic shock. *Experimental dermatology* **20**, 401 (May, 2011).
93. U. Wollina, R. Klinger, R. Wetzker, R. Reissmann, B. Knopf, Immunohistochemical localization of calmodulin in normal and psoriatic epidermis. *Archives of dermatological research* **280**, 497 (1989).
94. T. Mizumoto *et al.*, Calmodulin activities are significantly increased in both uninvolved and involved epidermis in psoriasis. *The Journal of investigative dermatology* **85**, 450 (Nov, 1985).

95. M. Praskova, S. Kalenderova, L. Miteva, Y. Poumay, V. Mitev, Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) inhibitor KN-62 suppresses the activity of mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-myc activation and human keratinocyte proliferation. *Archives of dermatological research* **294**, 198 (Jul, 2002).
96. C. Kolly, M. M. Suter, E. J. Muller, Proliferation, cell cycle exit, and onset of terminal differentiation in cultured keratinocytes: pre-programmed pathways in control of C-Myc and Notch1 prevail over extracellular calcium signals. *The Journal of investigative dermatology* **124**, 1014 (May, 2005).
97. J. E. Oh *et al.*, Decreased expression of alpha3 and beta1 integrin subunits is responsible for differentiation-associated changes in cells behavior in terminally differentiated human oral keratinocytes. *Cell communication & adhesion* **9**, 173 (Jul-Aug, 2002).
98. D. J. Sieg, C. R. Hauck, D. D. Schlaepfer, Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of cell science* **112** ( Pt 16), 2677 (Aug, 1999).
99. F. M. Watt, Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation. *The EMBO journal* **21**, 3919 (Aug 1, 2002).
100. J. Dowling, Q. C. Yu, E. Fuchs, Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *The Journal of cell biology* **134**, 559 (Jul, 1996).
101. E. Georges-Labouesse *et al.*, Absence of integrin alpha 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nature genetics* **13**, 370 (Jul, 1996).
102. C. Brakebusch *et al.*, Skin and hair follicle integrity is crucially dependent on beta 1 integrin expression on keratinocytes. *The EMBO journal* **19**, 3990 (Aug 1, 2000).
103. C. M. DiPersio, K. M. Hodivala-Dilke, R. Jaenisch, J. A. Kreidberg, R. O. Hynes, alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *The Journal of cell biology* **137**, 729 (May 5, 1997).
104. D. P. Choma, K. Pumiglia, C. M. DiPersio, Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *Journal of cell science* **117**, 3947 (Aug 1, 2004).
105. M. A. Wozniak, K. Modzelewska, L. Kwong, P. J. Keely, Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et biophysica acta* **1692**, 103 (Jul 5, 2004).

106. A. Huttenlocher *et al.*, Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *The Journal of biological chemistry* **272**, 32719 (Dec 26, 1997).
107. K. T. Chan, D. A. Bennin, A. Huttenlocher, Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *The Journal of biological chemistry* **285**, 11418 (Apr 9, 2010).
108. J. Cornillon, L. Campos, D. Guyotat, [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Medecine sciences : M/S* **19**, 743 (Jun-Jul, 2003).
109. S. M. Frisch, R. A. Screaton, Anoikis mechanisms. *Current opinion in cell biology* **13**, 555 (Oct, 2001).
110. S. K. Hanks, L. Ryzhova, N. Y. Shin, J. Brabek, Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **8**, d982 (May 1, 2003).
111. L. Satish, H. C. Blair, A. Glading, A. Wells, Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. *Molecular and cellular biology* **25**, 1922 (Mar, 2005).
112. P. Martin, Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75 (Apr 4, 1997).
113. T. Velnar, T. Bailey, V. Smrkolj, The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of international medical research* **37**, 1528 (Sep-Oct, 2009).
114. M. Schaffer, A. Barbul, Lymphocyte function in wound healing and following injury. *The British journal of surgery* **85**, 444 (Apr, 1998).
115. A. B. Lansdown, Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* **10**, 271 (Sep-Oct, 2002).
116. R. J. Williams, Calcium. *Methods Mol Biol* **172**, 21 (2002).
117. M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **1**, 11 (Oct, 2000).
118. C. Plieth, Calcium: just another regulator in the machinery of life? *Annals of botany* **96**, 1 (Jul, 2005).
119. M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman, Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* **287**, 1604 (Mar 3, 2000).

120. J. M. Cancela, F. Van Coppenolle, A. Galione, A. V. Tepikin, O. H. Petersen, Transformation of local Ca<sup>2+</sup> spikes to global Ca<sup>2+</sup> transients: the combinatorial roles of multiple Ca<sup>2+</sup> releasing messengers. *The EMBO journal* **21**, 909 (Mar 1, 2002).
121. R. E. Dolmetsch, K. Xu, R. S. Lewis, Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* **392**, 933 (Apr 30, 1998).
122. P. Pinton *et al.*, The Ca<sup>2+</sup> concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *The EMBO journal* **20**, 2690 (Jun 1, 2001).
123. E. Carafoli, E. Garcia-Martin, D. Guerini, The plasma membrane calcium pump: recent developments and future perspectives. *Experientia* **52**, 1091 (Dec 15, 1996).
124. M. Hilge, J. Aelen, A. Perrakis, G. W. Vuister, Structural basis for Ca<sup>2+</sup> regulation in the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1099**, 7 (Mar, 2007).
125. D. J. Cosens, A. Manning, Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* **224**, 285 (Oct 18, 1969).
126. C. Montell, TRP trapped in fly signaling web. *Current opinion in neurobiology* **8**, 389 (Jun, 1998).
127. C. Montell, L. Birnbaumer, V. Flockerzi, The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* **108**, 595 (Mar 8, 2002).
128. E. Vazquez, M. A. Valverde, A review of TRP channels splicing. *Seminars in cell & developmental biology* **17**, 607 (Dec, 2006).
129. S. F. Pedersen, G. Owsianik, B. Nilius, TRP channels: an overview. *Cell calcium* **38**, 233 (Sep-Oct, 2005).
130. J. Lee, S. K. Cha, T. J. Sun, C. L. Huang, PIP<sub>2</sub> activates TRPV5 and releases its inhibition by intracellular Mg<sup>2+</sup>. *The Journal of general physiology* **126**, 439 (Nov, 2005).
131. R. C. Hardie, TRP channels and lipids: from *Drosophila* to mammalian physiology. *The Journal of physiology* **578**, 9 (Jan 1, 2007).
132. J. Oberwinkler, A. Lis, K. M. Giehl, V. Flockerzi, S. E. Philipp, Alternative splicing switches the divalent cation selectivity of TRPM3 channels. *The Journal of biological chemistry* **280**, 22540 (Jun 10, 2005).
133. M. Arniges, J. M. Fernandez-Fernandez, N. Albrecht, M. Schaefer, M. A. Valverde, Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in



- multimerization and trafficking. *The Journal of biological chemistry* **281**, 1580 (Jan 20, 2006).
134. X. Z. Xu, F. Moebius, D. L. Gill, C. Montell, Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10692 (Sep 11, 2001).
  135. S. F. van de Graaf, Q. Chang, A. R. Mensenkamp, J. G. Hoenderop, R. J. Bindels, Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Molecular and cellular biology* **26**, 303 (Jan, 2006).
  136. J. Huang, X. Zhang, P. A. McNaughton, Modulation of temperature-sensitive TRP channels. *Seminars in cell & developmental biology* **17**, 638 (Dec, 2006).
  137. D. D. McKemy, Temperature sensing across species. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **454**, 777 (Aug, 2007).
  138. H. Lee, M. J. Caterina, TRPV channels as thermosensory receptors in epithelial cells. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **451**, 160 (Oct, 2005).
  139. S. Stander *et al.*, Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Experimental dermatology* **13**, 129 (Mar, 2004).
  140. H. E. Axelsson *et al.*, Transient receptor potential vanilloid 1, vanilloid 2 and melastatin 8 immunoreactive nerve fibers in human skin from individuals with and without Norrbottnian congenital insensitivity to pain. *Neuroscience* **162**, 1322 (Sep 15, 2009).
  141. A. M. Peier *et al.*, A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* **296**, 2046 (Jun 14, 2002).
  142. S. Mandadi *et al.*, TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **458**, 1093 (Oct, 2009).
  143. M. K. Chung, H. Lee, A. Mizuno, M. Suzuki, M. J. Caterina, TRPV3 and TRPV4 mediate warmth-evoked currents in primary mouse keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* **279**, 21569 (May 14, 2004).
  144. T. Sokabe, T. Fukumi-Tominaga, S. Yonemura, A. Mizuno, M. Tominaga, The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *The Journal of biological chemistry* **285**, 18749 (Jun 11, 2010).

145. L. Tsavaler, M. H. Shapero, S. Morkowski, R. Laus, 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 research* **61**, 3760 (May 1, 2001).
146. M. Denda, M. Tsutsumi, S. Denda, Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis. *Experimental dermatology* **19**, 791 (Sep, 2010).
147. S. E. Jordt *et al.*, Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature* **427**, 260 (Jan 15, 2004).
148. T. Biro, L. Kovacs, An "ice-cold" TR(i)P to skin biology: the role of TRPA1 in human epidermal keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **129**, 2096 (Sep, 2009).
149. M. Bodding, U. Wissenbach, V. Flockerzi, The recombinant human TRPV6 channel functions as Ca<sup>2+</sup> sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 36656 (Sep 27, 2002).
150. S. D. Bianco *et al.*, Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **22**, 274 (Feb, 2007).
151. S. Taparia, J. C. Fleet, J. B. Peng, X. D. Wang, R. J. Wood, 1,25-Dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D--mediated regulation of TRPV6 (a putative epithelial calcium channel) mRNA expression in Caco-2 cells. *European journal of nutrition* **45**, 196 (Jun, 2006).
152. F. Vanden Abeele, M. Roudbaraki, Y. Shuba, R. Skryma, N. Prevarskaya, Store-operated Ca<sup>2+</sup> current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca<sup>2+</sup> transporter type 1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 15381 (Apr 25, 2003).
153. I. S. Ambudkar, H. L. Ong, X. Liu, B. C. Bandyopadhyay, K. T. Cheng, TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell calcium* **42**, 213 (Aug, 2007).
154. X. Wang, J. L. Pluznick, P. Wei, B. J. Padanilam, S. C. Sansom, TRPC4 forms store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in mouse mesangial cells. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**, C357 (Aug, 2004).

155. B. Beck *et al.*, TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. *Cell calcium* **43**, 492 (May, 2008).
156. J. W. Putney, Jr., Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *The Journal of cell biology* **169**, 381 (May 9, 2005).
157. G. N. Huang *et al.*, STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nature cell biology* **8**, 1003 (Sep, 2006).
158. C. W. Taylor, Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: A STIMulating stOrai. *Trends in biochemical sciences* **31**, 597 (Nov, 2006).
159. W. Zeng *et al.*, STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction. *Molecular cell* **32**, 439 (Nov 7, 2008).
160. S. Feske, M. Prakriya, A. Rao, R. S. Lewis, A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients. *The Journal of experimental medicine* **202**, 651 (Sep 5, 2005).
161. S. Feske *et al.*, A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**, 179 (May 11, 2006).
162. G. J. Barritt, T. L. Litjens, J. Castro, E. Aromataris, G. Y. Rychkov, Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels and microdomains of Ca<sup>2+</sup> in liver cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **36**, 77 (Jan, 2009).
163. B. Darbellay *et al.*, STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* **284**, 5370 (Feb 20, 2009).
164. Y. Maruyama *et al.*, Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* **284**, 13676 (May 15, 2009).
165. Y. Zhou, S. Ramachandran, M. Oh-Hora, A. Rao, P. G. Hogan, Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 4896 (Mar 16, 2010).
166. J. P. Yuan *et al.*, SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nature cell biology* **11**, 337 (Mar, 2009).
167. K. P. Lee *et al.*, An endoplasmic reticulum/plasma membrane junction: STIM1/Orai1/TRPCs. *FEBS letters* **584**, 2022 (May 17, 2010).
168. Y. Gwack *et al.*, Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Molecular and cellular biology* **28**, 5209 (Sep, 2008).

169. M. Prakriya *et al.*, Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* **443**, 230 (Sep 14, 2006).
170. I. F. Abdullaev *et al.*, Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res* **103**, 1289 (Nov 21, 2008).
171. J. J. Zou, Y. D. Gao, S. Geng, J. Yang, Role of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca(2) entry in airway smooth muscle cell proliferation. *J Appl Physiol* **110**, 1256 (May, 2011).
172. J. B. Peng *et al.*, Human calcium transport protein CaT1. *Biochemical and biophysical research communications* **278**, 326 (Nov 19, 2000).
173. S. Hoffjan, S. Stemmler, On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *The British journal of dermatology* **157**, 441 (Sep, 2007).
174. A. Giannetti, [The hydrotherapy centre in Avene-les-bains. A controlled study in atopic dermatitis]. *Annales de dermatologie et de venerologie* **132**, 6S12 (Oct, 2005).
175. J. Laroze, [Avene-les-Bains, a skin health resort]. *Concours medical* **75**, 1085 (Mar 21, 1953).
176. P. Pigatto, [The efficacy of Avene thermal spring water in light to moderate atopic dermatitis]. *Annales de dermatologie et de venerologie* **132**, 6S16 (Oct, 2005).
177. S. F. van de Graaf *et al.*, Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *The EMBO journal* **22**, 1478 (Apr 1, 2003).
178. L. Cezanne *et al.*, Effects of the Avene spring water on the dynamics of lipids in the membranes of cultured fibroblasts. *Skin pharmacology : the official journal of the Skin Pharmacology Society* **6**, 231 (1993).
179. V. A. Barr *et al.*, Dynamic movement of the calcium sensor STIM1 and the calcium channel Orai1 in activated T-cells: puncta and distal caps. *Molecular biology of the cell* **19**, 2802 (Jul, 2008).
180. S. Sours-Brothers, M. Ding, S. Graham, R. Ma, Interaction between TRPC1/TRPC4 assembly and STIM1 contributes to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in mesangial cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **234**, 673 (Jun, 2009).

181. C. Wang *et al.*, Inhibition of SOC/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway is involved in the anti-proliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells. *Respiratory research* **10**, 123 (2009).
182. Z. Wang *et al.*, GPR48-Induced keratinocyte proliferation occurs through HB-EGF mediated EGFR transactivation. *FEBS letters* **584**, 4057 (Sep 24, 2010).
183. H. Yang *et al.*, EGF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells. *The Journal of membrane biology* **194**, 47 (Jul 1, 2003).
184. H. Liu, J. D. Hughes, S. Rollins, B. Chen, E. Perkins, Suppression of calcium entry via ORAI1 inhibits proliferation and induces apoptosis in glioblastoma cells. *Experimental and molecular pathology*, (Sep 9, 2011).
185. X. Guo, C. Zhou, N. Sun, The neuropeptide catestatin promotes vascular smooth muscle cell proliferation through the Ca<sup>2+</sup>-calcineurin-NFAT signaling pathway. *Biochemical and biophysical research communications* **407**, 807 (Apr 22, 2011).
186. D. Eichelberg, A. Fuchs, Calmodulin-antagonism inhibits human keratinocyte proliferation. *Archives of dermatological research* **280**, 323 (1988).
187. G. P. Dotto, Calcineurin signaling as a negative determinant of keratinocyte cancer stem cell potential and carcinogenesis. *Cancer research* **71**, 2029 (Mar 15, 2011).
188. J. G. Elferink, G. J. Boonen, B. M. de Koster, The role of calcium in neutrophil migration: the effect of calcium and calcium-antagonists in electroporated neutrophils. *Biochemical and biophysical research communications* **182**, 864 (Jan 31, 1992).
189. R. R. Pauly *et al.*, Role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the regulation of vascular smooth muscle cell migration. *Circulation* **91**, 1107 (Feb 15, 1995).
190. Z. Saidak *et al.*, Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Experimental cell research* **315**, 2072 (Jul 15, 2009).
191. J. M. Bisailon *et al.*, Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *American journal of physiology. Cell physiology* **298**, C993 (May, 2010).
192. S. Yang, J. J. Zhang, X. Y. Huang, Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer cell* **15**, 124 (Feb 3, 2009).
193. M. Schober *et al.*, Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *The Journal of cell biology* **176**, 667 (Feb 26, 2007).

194. S. Raghavan, A. Vaezi, E. Fuchs, A role for alphabeta1 integrins in focal adhesion function and polarized cytoskeletal dynamics. *Developmental cell* **5**, 415 (Sep, 2003).
195. S. H. Kim, Antagonistic effect of EGF on FAK phosphorylation/dephosphorylation in a cell. *Cell biochemistry and function* **26**, 539 (Sep-Oct, 2008).
196. N. A. Jeske, A. M. Patwardhan, M. A. Henry, S. B. Milam, Fibronectin stimulates TRPV1 translocation in primary sensory neurons. *Journal of neurochemistry* **108**, 591 (Feb, 2009).
197. X. Wu *et al.*, Potentiation of large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channels by alpha5beta1 integrin activation in arteriolar smooth muscle. *The Journal of physiology* **586**, 1699 (Mar 15, 2008).
198. C. Mammucari *et al.*, Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Developmental cell* **8**, 665 (May, 2005).
199. F. Vanden Abeele *et al.*, Two types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *The Journal of biological chemistry* **279**, 30326 (Jul 16, 2004).
200. Z. Y. Zhang, L. J. Pan, Z. M. Zhang, Functional interactions among STIM1, Orai1 and TRPC1 on the activation of SOCs in HL-7702 cells. *Amino acids* **39**, 195 (Jun, 2010).
201. S. L. Karvonen *et al.*, Psoriasis and altered calcium metabolism: downregulated capacitative calcium influx and defective calcium-mediated cell signaling in cultured psoriatic keratinocytes. *The Journal of investigative dermatology* **114**, 693 (Apr, 2000).
202. A. Gilhar *et al.*, Ageing of human epidermis: the role of apoptosis, Fas and telomerase. *The British journal of dermatology* **150**, 56 (Jan, 2004).
203. V. Lehen'kyi, M. Flourakis, R. Skryma, N. Prevarskaya, TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca<sup>2+</sup>/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380 (Nov 15, 2007).
204. W. Zhang, T. Na, J. B. Peng, WNK3 positively regulates epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 via a kinase-dependent pathway. *American journal of physiology. Renal physiology* **295**, F1472 (Nov, 2008).
205. L. Scorrano *et al.*, BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135 (Apr 4, 2003).

206. T. Fixemer, K. Remberger, H. Bonkhoff, Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* **53**, 118 (Oct 1, 2002).
207. I. F. Tannock *et al.*, Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *The New England journal of medicine* **351**, 1502 (Oct 7, 2004).
208. K. Vanoverberghe *et al.*, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell death and differentiation* **11**, 321 (Mar, 2004).
209. R. Skryma *et al.*, Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *The Journal of physiology* **527 Pt 1**, 71 (Aug 15, 2000).
210. R. Grobholz *et al.*, Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Human pathology* **36**, 562 (May, 2005).
211. G. P. Amorino, S. J. Parsons, Neuroendocrine cells in prostate cancer. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* **14**, 287 (2004).
212. L. M. Duncan *et al.*, Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer research* **58**, 1515 (Apr 1, 1998).
213. J. B. Peng *et al.*, CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochemical and biophysical research communications* **282**, 729 (Apr 6, 2001).
214. H. P. Wang, X. Y. Pu, X. H. Wang, Distribution profiles of transient receptor potential melastatin-related and vanilloid-related channels in prostatic tissue in rat. *Asian journal of andrology* **9**, 634 (Sep, 2007).
215. M. Monet *et al.*, Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation. *Biochimica et biophysica acta* **1793**, 528 (Mar, 2009).