

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET
TECHNOLOGIES**

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Implication des canaux ioniques dans l'impact des facteurs environnementaux sur la progression des cancers prostatiques

Thèse dirigée par le Professeur Morad Roudbaraki

présentée et soutenue publiquement par

Sandra Derouiche

le Mercredi 19 Décembre 2012

Membres du jury :

Pr. Franck Broly, CHRU de Lille

Pr. Christophe Vandier, INSERM U1069, Tours

Pr. Lydie Sparfel, INSERM U1085, Rennes

Dr. Laurence Gamet-Payraastre, INRA/INP/UPS UMR 1331, Toulouse

Dr. Martine Aggerbeck, INSERM UMR-S 747, Paris

Pr. Natalia PREVARSKAYA, Université Lille 1

Pr. Morad ROUDBARAKI, Université Lille 1

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Thèse réalisée au sein du Laboratoire de Physiologie Cellulaire INSERM U1003

Villeneuve d'Ascq

Résumé

Des données récentes montrent que l'exposition aux facteurs environnementaux appelés « perturbateurs endocriniens (PE) » peut avoir un impact sur la santé en perturbant le système endocrinien. Il a été montré que ces facteurs pouvaient avoir un rôle dans l'étiologie des cancers de la prostate et dans l'induction de la croissance des cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Il est bien établi que l'homéostasie calcique et l'activité des canaux ioniques sont impliquées dans la carcinogenèse prostatique par modulation de la prolifération, de la différenciation, de la migration et de l'apoptose dans les cellules cancéreuses prostatiques. Les facteurs environnementaux pourraient ainsi favoriser la cancérogénèse en modulant la signalisation calcique *via* une modulation de l'expression et/ou de l'activité des canaux ioniques. Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet des PE sur la signalisation calcique dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ce travail nous a permis de mettre en évidence plusieurs canaux ioniques comme cibles de deux facteurs environnementaux : le bisphénol A (BPA) et le Triclosan (TCS).

En effet, nous avons montré tout d'abord que le BPA pouvait induire la migration des cellules cancéreuses épithéliales prostatiques, par le biais de la modulation de l'expression protéique des canaux ioniques impliqués dans le phénomène de Store-Operated Calcium Entry (SOCE), notamment le canal calcique Orai1. Ensuite, nous avons montré que le TCS induisait une entrée de calcium importante dans les cellules stromales de cancers prostatiques humains, connues pour sécréter des facteurs mitogènes au bénéfice des cellules épithéliales. Les études pharmacologiques et l'utilisation d'ARNs interférents ont permis d'identifier le canal activé par le TCS, le canal TRPA1. Les études par immunofluorescence ont montré que ce canal était préférentiellement exprimé dans les cellules stromales de cancers prostatiques. Par ailleurs, l'augmentation de calcium induite par le TCS serait corrélée avec une sécrétion plus importante de VEGF, un facteur mitogène qui pourrait favoriser la croissance des cellules épithéliales ou endothéliales. Ces données suggèrent donc un impact non négligeable de facteurs environnementaux sur les interactions tumeur-stroma impliquées dans la progression des cancers prostatiques humains. Au niveau des cellules épithéliales cancéreuses, nous avons également mis en évidence un remodelage de l'expression des canaux ioniques dans les cellules cancéreuses prostatiques et une résistance à l'apoptose de ces cellules sous l'effet du TCS.

La mise en évidence de ces effets du BPA et du TCS sur les canaux calciques exprimés dans les cancers prostatiques pourrait permettre d'envisager de nouvelles thérapies ou thérapies complémentaires ciblant ces canaux, et/ou de mettre en place des mesures

préventives dans le traitement des cancers de la prostate qui prennent en compte l'impact de ces facteurs environnementaux.

Summary

Data show that exposure to environment factors called "endocrine disruptors (ED)" have an impact on health by interfering with the endocrine system. These factors were shown to have a potential role in the etiology of prostate cancers and in the induction of human prostate cancer cells growth.

It is well established that calcium homeostasis and ion channels activity are involved in prostate carcinogenesis by modulating the proliferation, differentiation, migration and apoptosis in prostate cancer cells. Environmental factors could thus favor the carcinogenesis by changing the calcium signaling *via* a modulation of the expression and/or the activity of the ion channels. In this context, we studied the effects of environmental factors on calcium signaling in human prostate cancer cells. This work allowed us to highlight several ion channels as target of two environmental factors: Bisphenol A (BPA) and Triclosan (TCS).

Indeed, we first showed that BPA could induce the migration of prostate cancer cells, through the modulation of ion channels protein expression involved in Store-Operated Calcium Entry (SOCE), notably the Orai1 channel. We then showed that TCS induced an important calcium entry in human prostate cancer stromal cells known to secrete mitogenic factors for epithelial cells. Pharmacological studies and the use of RNA interfering allowed us to identify the channel activated by the TCS, the TRPA1 channel. Immunofluorescences studies have shown that this channel was preferentially expressed in prostate cancer stromal cells. Furthermore, the TCS- induced calcium increase was correlated with a higher secretion of VEGF, a mitogenic factor that may promote the epithelial or endothelial cells growth. These data suggest a non-negligible impact of environmental factors on the tumour-stroma interactions involved in the progression of human prostate cancers. At the level of cancer epithelial cells, we have also highlighted a remodeling of ion channels expression in prostate cancer cells and a resistance to apoptosis of these cells under the influence of TCS.

The highlight of these effects of BPA and TCS on the calcium channels expressed in cancer could allow considering new and/or complementary therapies targeting these channel, and/or preventive measures in the treatment of prostate cancers which take into account the impact of these environmental factors.

À mes grand-parents,

À mes parents,

À ma sœur.

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

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

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

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

Mesdames le Dr. L. Gamet-Payraastre et le Dr. M. Aggerbeck, je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez accepter mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury.

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

Monsieur le Pr. M. Roudbaraki, je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour ces quatre années de thèse où j'ai pu progresser grâce à votre encadrement, votre grande disponibilité et votre enthousiasme. Votre patience, votre compréhension et votre soutien m'ont permis de prendre confiance en moi et je vous en remercie.

De plus, je tiens à remercier sincèrement tous les membres du laboratoire de Physiologie cellulaire et plus particulièrement ceux qui m'ont apporté leur aide, leurs conseils et leurs encouragements : Pascal, Mirto, Loïc, Anne-So, Gab, Etienne, Christian, Michèle, Alessandra et Elodie. Grâce à la bonne humeur générale que vous instaurez, ce fût un plaisir de travailler avec vous et de vous cotoyer.

Je tiens également à adresser un merci particulier à ma petite sœur et mon petit frère du labo, Marine et Alex, qui sont vite passés du statut de collègue à ami (enfin surtout Marine). Je vous remercie pour tous ces bons moments passés ensemble (je me souviendrais toujours

d'une certaine soirée pour le moins risquée, de nos « expériences » botaniques et de blagues mémorables), pour nos chamailleries qui animaient nos longues journées de manip et pour votre soutien quotidien.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour m'avoir encouragée et « supportée » durant cette thèse, ainsi que la société pharmaceutique UPSA qui m'a accompagnée dans les moments les plus « douloureux ».

Sommaire

Glossaire	11
Introduction	15
I. Physiopathologie de la prostate humaine	16
A – La glande prostatique	16
1) Anatomie	16
2) Rôles physiologiques de la prostate	18
a – Rôle sécrétoire	18
b – Rôle mécanique	19
3) Régulation hormonale de la prostate	19
a – Effets génomiques	20
b – Effets non génomiques	21
B – Les pathologies de la prostate	22
1) La prostatite	22
2) L'adénome prostatique ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate	22
3) Le cancer de la prostate	23
a – Histoire naturelle du cancer de la prostate	24
b – Evolution du cancer de la prostate	25
c – Hormones et cancer	25
d – Métastases	29
e – Classifications oncologiques	30
f – Etiologie et épidémiologie du cancer de la prostate	32
4) Diagnostic	34
a – Examen clinique	34
b – Examen biologique	34
c – Prélèvement tissulaire prostatique	36
5) Traitements	37
II. Histologie de la prostate humaine et interactions épithélio-mésenchymateuses	41
A – Histologie	41
1) Le tissu glandulaire	41
2) Le stroma	43
B – Interactions épithélium-stroma	44
1) Le stroma réactif	44
2) La transition épithélio-mésenchymateuse	46
III. Les Perturbateurs Endocriniens (PE)	48
A – Caractéristiques des perturbateurs endocriniens	48
1) Définition	48
2) Voie d'exposition	49
3) Mécanismes d'action	50

4) Caractéristiques atypiques	51
a – Dynamique de dose-réponse inhabituelle	51
b – Latence des effets des PE	52
c – Effets combinés	53
5) Pathologies associées à l'exposition aux PE	53
B – Le Bisphénol A	54
1) Identité et propriétés physico-chimiques	54
2) Utilisation et voie d'exposition	55
a – Voie orale	56
b – Voies respiratoire et cutanée	57
c – Détection dans l'organisme	57
3) Toxicité	58
a – Activité hormonale	58
b – Effets nocifs sur la santé	59
C – Le Triclosan	61
1) Identité et propriétés physico-chimiques	61
2) Utilisation et voie d'exposition	62
a – Voie orale	63
b – Voies cutanée	63
c – Détection dans l'organisme	63
3) Toxicité	64
a – Activité hormonale	64
b – Effets nocifs sur la santé	64
4) Son analogue : le Triclocarban	66
D – Perturbateurs endocriniens et signalisation calcique	66
IV. Les canaux ioniques et le cancer	69
A – Rôle du calcium dans la physiologie cellulaire	69
1) Les canaux ioniques à l'origine des signaux calciques	69
2) Caractéristiques des signaux calciques	70
a – Régulation spatio-temporelle	70
b – Génèse et maintien des oscillations calciques	72
3) Calcium et transcription	74
a – Modulation de la localisation des facteurs de transcription	74
b – Modulation de l'activité des facteurs de transcription	75
c – Modulation directe de l'expression des gènes par le calcium	76
4) Processus physiologique calcium dépendants	76
B – Les canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie calcique des cellules cancéreuses prostatiques	79
1) Les canaux calciques	79
a – Les canaux calciques voltage-dépendants	79
b – Les canaux calciques voltage-indépendants	80
b.1 <i>Les canaux calciques chimio-dépendants : ROC et SOC</i>	80

b.2 <i>Les canaux TRP: Généralités</i>	81
b.3 <i>Diversité moléculaire et fonctionnelle des canaux TRP</i>	81
b.4 <i>Le canal TRPA1</i>	83
b.5 <i>Les protéines STIM et Orai</i>	86
2) Les canaux potassiques	89
3) Les canaux ioniques et le cancer	91
Problématique et Objectifs	93
Matériel et Méthodes	96
I. Culture cellulaire	97
A – Lignées cellulaires	97
1) Cultures primaire	97
2) Lignées cancéreuses et transformées	97
B – Conditions de culture	98
1) Préparation du sérum déstéroïdé	99
2) Conservation des cellules (Congélation/Décongélation)	99
II. Mesure de la viabilité cellulaire et de l'apoptose	99
A – Test de viabilité cellulaire	99
B – Mesure de l'apoptose : coloration au Hoechst	100
C – Mesure de l'apoptose : visualisation de l'échelle d'ADN	100
III. Mesure de la migration cellulaire	101
A – Test de cicatrisation	101
B – Test de migration en Chambres de Boyden/Transwell®	101
IV. Mesure de la sécrétion de VEGF	102
V. Transfections transitoire et stable	103
A – Lipofection	103
B – Nucléofection	104
VI. Etudes d'expression des ARN messagers (ARNm)	104
A – Extraction des ARNm	104
B – Traitement à la Désoxyribonucléase I (DNase I)	105
C – Rétrotranscription et Polymerase Chain Reaction (PCR)	105
VII. Immunodétection	106
A – Extraction des protéines	106
B – Western Blot	106
C – Immunofluorescence	107

VIII. Imagerie de fluorescence quantitative du calcium cytoplasmique libre	108
A – Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2	108
B – Système optique	109
C – Calibration des signaux de fluorescence	110
D – Milieu d’enregistrement	110
E – Charge des cellules en Fura-2	110
IX. Enregistrements électrophysiologiques : technique de Patch Clamp	111
Résultats	113
<u>1^{er} article</u> : “Bisphenol A stimulates human prostate cancer cells migration via remodelling of calcium signalling”	114
<u>2^{ème} article</u> : “Triclosan induces calcium signalling and preventes apoptosis in human prostate cancer stromal cells”	135
<u>3^{ème} article</u> : “Environmental factor Triclosan activates TRPA1 channel and VEGF secretion in human prostate cancer stromal cells”	158
Discussion	177
Perspectives	193
Conclusion	196
Annexes	199
Publications	204
Bibliographie	206

Glossaire

5 α -DHT	5 α -Dihydrotestostérone
[Ca ²⁺]	Concentration calcique
[Ca ²⁺] _i	Concentration calcique intracellulaire
AAP	Anti-Androgène Périphérique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMPC	Adenosine 3K,5K-cyclophosphate camp
AnkR	Répétitions Ankyrine
ARE	Androgen Response Element
ARN	Acide Ribonucléique
AR	Androgen Receptor
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BK _{Ca}	Large conductance calcium-activated potassium channel
BPA	Bisphénol A
BPA-G	Bisphénol A-Glucuronide
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
CBP	CREB-binding protein
CgA	Chromogranine A
CRACM	Calcium Release-Activated Channel Modulator
CREB	cAMP response element binding
CRPC	Castration-Resistant Prostate Cancer
DAG	Diacylglycérol
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
DES	Diéthylstilbestrol
DREAM	Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator
ECC	Entrée Capacitive de Calcium
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ER	Estrogen Receptor
ERE	Estrogen Response element
FGF	Fibroblast Growth Factor
GPR30	G Protein coupled Receptor-30
HC	HC-030031
HEK	Human Embryonic Kidney
HGF	Hepathocyte Growth Factor

HIF1- α	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
hPEC	human Primary Epithelial Cells
hPrSC	human Prostate cancer Stromal Cells
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IKCa	Intermediate conductance calcium-activated potassium channel
IP ₃	Inositol TriPhosphate
IP ₃ R	Inositol TrisPhosphate Receptor
K ⁺	Potassium
K _{2P}	2 Pore domains potassium channel
K _{ATP}	ATP-dependent potassium channel
K _{Ca}	Calcium-activated potassium channel
K _{ir}	Inward-rectifying potassium channel
K _v	Voltage-dependent potassium channel
LH	Luteinizing Hormone
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
Mg ²⁺	Magnésium
MTS	Sel de Tetrazolium
MW	Molecular Weight
NF-AT	Nuclear Factor of Activated T Cells
NMDA	N-Méthyl D-Aspartate
NSE	Neuron Specific Enolase
Orai-1	Transmembrane protein 142A, CRACM1
pb	paire de bases
PAP	Phosphatase Acide Prostatique
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC-3	Human, Caucasian, prostate, adenocarcinoma, grade IV
PCa	Prostate Cancer
PCB	Polyphényl polychloriné
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PE	Perturbateur Endocrinien
PET	Polyéthylène Terephthalate
PI ₃ K	Phosphatidyl Inositol 3 kinase
PIP ₃	Phosphatidyl Inositol Tri-Phosphate
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C

PLC	Phospholipase C
PMS	Phenozine Methosulfate
PRL	Prolactine
PSA	Prostate Specific Antigen
PVC	Polyvinyl Chloride
RE	Réticulum Endoplasmique
REST	RE-1 Silencing Transcription Factor
ROC	Receptor Operated Channel
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RyR	Ryanodine Receptor
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SERCA	Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPase
SERM	Selective ER Modulator
siRNA	small interfering RNA
SOC	Store Operated Calcium channel
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
STIM	Stromal Interacting Molecule
SVF	Sérum de Veau Fétal
TCC	Triclocarban
TCS	Triclosan
TG	Thapsigargine
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole
TRP	Transient Receptor Potential
TRPA	Transient Receptor Potential Ankyrin
TRPC	Transient Receptor Potential Canonical
TRPM	Transient Receptor Potential Melastatin
TRPML	Transient Receptor Potential Mucolipin
TRPP	Transient Receptor Potential Polycystin
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
UV	Ultra Violet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VOC	Voltage Operated Channel

Introduction

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme. Malgré une détection précoce et des améliorations au niveau des interventions chirurgicales et des traitements thérapeutiques, cette pathologie reste la 3^{ème} cause de mortalité par cancer chez l'homme. La prostate est une glande dont le développement et le fonctionnement sont sous dépendance des hormones androgènes, c'est pourquoi l'une des principales stratégies thérapeutiques consiste à empêcher l'action des androgènes sur cet organe. Malheureusement les stades avancés de ce cancer, dits androgéno-indépendants, deviennent insensibles à ces chimiothérapies et ont un très mauvais pronostic de survie. Il semblerait donc que d'autres facteurs, autres que les hormones androgènes, interviennent dans la cancérogénèse de la prostate, et les identifier et comprendre leurs mécanismes d'action pourrait permettre d'envisager le développement de nouvelles thérapies pharmacologiques afin de prévenir l'apparition des stades agressifs du cancer de la prostate ou de limiter leur évolution. Notre environnement pourrait être la source de ces facteurs aggravants du cancer de la prostate. En effet, depuis quelques années une inquiétude croissante porte sur l'impact sur la santé humaine d'une certaine catégorie de facteurs environnementaux : les perturbateurs endocriniens. Décrypter l'impact de ces facteurs environnementaux sur la progression des cancers prostatiques pourrait permettre d'évaluer leur potentiel néfaste et d'envisager de nouvelles solutions pour prévenir l'évolution de la maladie.

I - Physiopathologie de la prostate humaine

A - La glande prostatique

1) Anatomie

La prostate est la glande accessoire la plus volumineuse du système reproducteur masculin. Cette glande de nature exocrine qui participe à l'élaboration du liquide séminal, a la forme et la taille d'une noix et pèse environ 20 g chez un adulte jeune. Elle est située dans le pelvis, juste en avant du rectum et en dessous de la vessie, et entoure la partie proximale de l'urètre, le canal par lequel les urines sont excrétées de la vessie (Figure 1).

Les travaux pionniers de Mc Neal réalisés en 1981 (McNeal, 1981) ont permis de constituer un modèle anatomique de la prostate : celui-ci fait la distinction entre 5 zones prostatiques différentes, à la fois sur le plan anatomique et sur le plan physiopathologique (Figure 2):

- **la zone périphérique** qui constitue la partie postérieure de la prostate et qui est en contact avec le rectum. Elle représente environ 70 % du volume de la glande et se compose de tissu sécrétoire. Elle est le lieu privilégié d'émergence des cancers : c'est dans cette zone que naissent 70% des cancers de la prostate.

- **la zone de transition** qui représente 5 % de la masse totale de la prostate et qui se constitue de deux lobes nichés autour de l'urètre. C'est la zone où se développent exclusivement les

hyperplasies bénignes prostatiques, et il s'y développe également 20 à 25 % des cancers prostatiques.

- **la zone centrale** qui représente le quart du volume glandulaire, est au contact de l'urètre et entoure les canaux éjaculateurs. Cette zone est le siège de 5 à 10 % des cancers prostatiques.

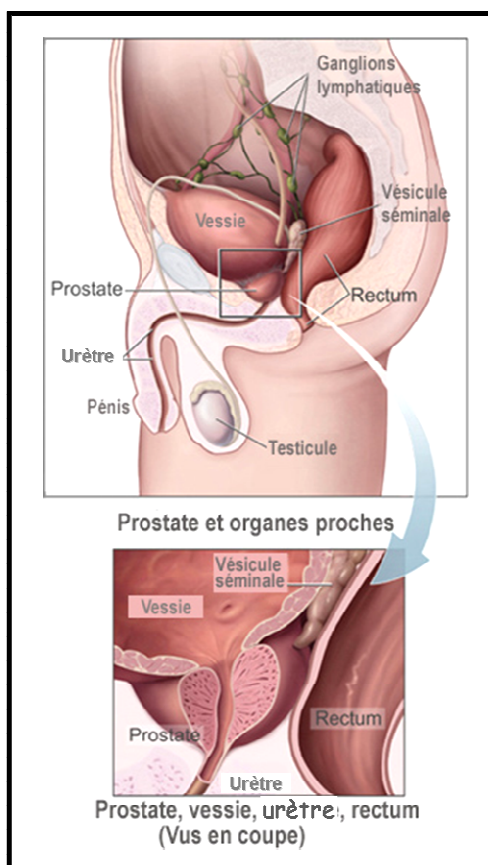


Figure 1 : Localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale chez l'homme (coupe sagittale) et son agrandissement.

- **le stroma fibro-musculaire antérieur**, tissu non glandulaire composé de fibres musculaires lisses qui constitue la face antérieure de la prostate. Ce tissu peut être également le siège de pathologies telles que le léiomyome ou le rhabdomyosarcome.

- **la zone des glandes péri-prostatiques ou péri-urétrales**, qui se situe le long de la paroi musculaire lisse de l'urètre et représente 1 % du tissu glandulaire.

Enfin, ces différentes zones de la prostate sont étroitement fusionnées au sein d'une gaine commune appelée capsule de Gleason. Celle-ci constitue une extension du stroma fibro-musculaire antérieure et sépare la glande des autres organes avoisinants. Elle représente une zone de faiblesse pouvant faciliter la propagation extra-prostatique du cancer.

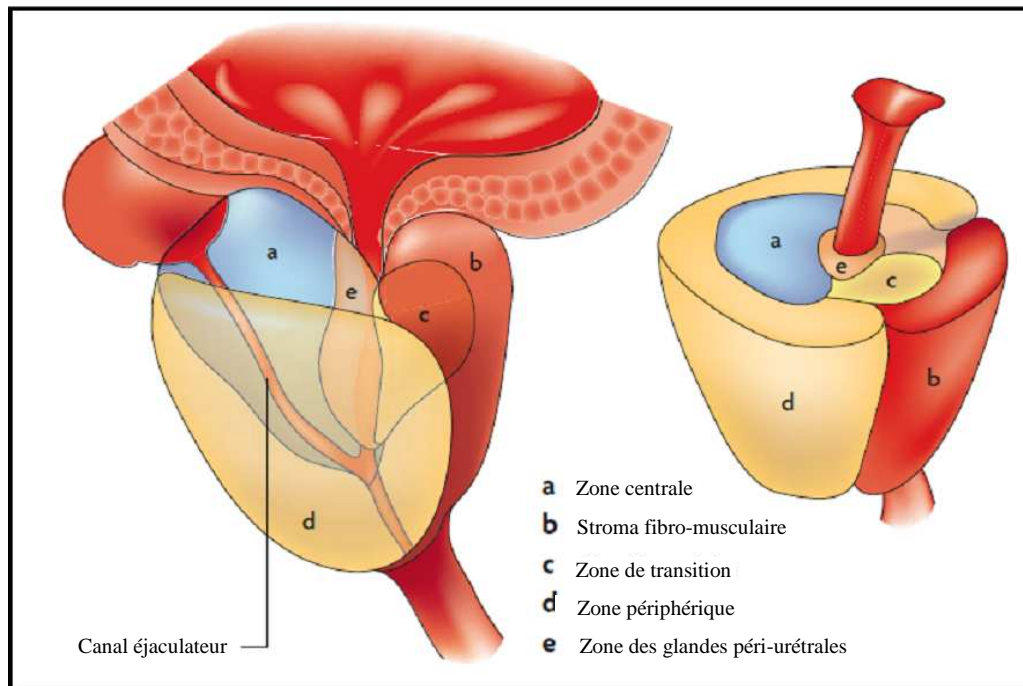


Figure 2 : Anatomie zonale selon Mc Neal en coupes sagittale et transversale, d'après (De Marzo, *et al.*, 2007). La zone centrale (a) se situe sous la vessie et entoure les canaux éjaculateurs, le Stroma fibro-musculaire (b) forme la partie antérieure de la prostate, la Zone de transition (c) entoure l'urètre, la Zone périphérique (d) constitue la partie postérieure de la prostate et la Zone des glandes péri-urétrales (e) est au contact direct de l'urètre.

2) Rôles physiologiques de la prostate

a. Rôle sécrétoire

Les cellules glandulaires prostatiques sécrètent (par voie apocrine et mérocrine) un liquide épais et blanchâtre, appelé liquide prostatique, de manière continue à raison de 0,5 à 2 cm³/jr. Ce liquide est collecté par les canaux excréteurs pour être émis dans l'urètre où il joue probablement un rôle protecteur antibactérien du tractus génital mâle (Gillenwater, *et al.*, 2001). Cette sécrétion s'intensifie en période pré-éjaculatoire, le liquide prostatique constituant alors une partie du liquide séminal (15 à 30 %) qui facilite la pénétration des spermatozoïdes au niveau du col de l'utérus tout en optimisant leur motilité et leur survie. La fonction sécrétoire de la prostate est à la fois sous contrôle endocrine et neuronal, le volume et la composition des sécrétions prostatiques étant sous contrôle endocrine. La production et l'expulsion du liquide prostatique sont quant à eux contrôlés par le plexus pelvien (Gillenwater, *et al.*, 2001).

Le liquide prostatique contient de nombreux composants organiques et inorganiques : des ions tels que le zinc, le magnésium, le calcium et du citrate, des phospholipides, du cholestérol, des enzymes (phosphatases acides, protéases, fibrinogénase et fibrinolyse), des amines biogènes tels que la spermine et la spermidine, ou encore l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA). Certains de ces produits de sécrétion sont utilisés ou envisagés comme marqueurs du cancer de la prostate, tels que le PSA, le citrate ou la spermine (Serkova, *et al.*,

2008). Le PSA, caractérisé en 1971 dans le plasma séminal humain, est le marqueur exclusif de la prostate le plus couramment utilisé pour le diagnostic du cancer de la prostate. Cette glycoprotéine de 33-34 kDa est une sérine protéase qui joue un rôle dans la liquéfaction du liquide séminal, elle y est présente à de fortes concentrations allant de 0,5 à 5 g/L (Stephan, *et al.*, 2002). Une perturbation de l'architecture glandulaire prostatique résulte souvent en un transfert du PSA dans la circulation sanguine, ce qui en fait un antigène disponible et facilement dosable, et une élévation du taux de PSA est corrélée à une augmentation du volume glandulaire prostatique, c'est pourquoi le PSA est actuellement le meilleur marqueur des pathologies prostatiques (Babaian, *et al.*, 1992).

Enfin, il est à noter que la prostate participe également, en tant que glande exocrine, à l'élaboration et à la sécrétion des hormones stéroïdes et peptidiques.

b. Rôle mécanique

L'urètre dans sa partie prostatique est entouré de deux sphincters : un sphincter supérieur lisse et un sphincter inférieur strié. Ces sphincters confèrent à la prostate un double rôle mécanique dans les processus mictionnels (la miction étant l'action d'uriner) et éjaculatoires. Le système de sphincters permet tout d'abord, en association avec la vessie, de stocker les urines et d'assurer la continence. Cette fonction est assurée notamment grâce aux innervations végétatives et somatiques : le sphincter lisse permet la phase de remplissage du réservoir vésical via le système sympathique et l'évacuation des urines via le système parasympathique en association avec le relâchement du sphincter strié.

De plus, les sphincters et les fibres musculaires lisses de la prostate interviennent également au niveau des fonctions de reproduction, lors de l'éjaculation. Le sphincter lisse reste contracté pour empêcher l'éjaculation rétrograde dans la vessie, alors que le sphincter strié se relâche (les innervations étant les mêmes que pour la miction). La prostate intervient donc dans les processus de miction et de reproduction, grâce à un double contrôle glandulaire et musculaire : la gravité des conséquences d'un dérèglement anatomique et fonctionnel de la prostate tel que l'on peut l'observer en cas d'hyperplasie bénigne ou de cancer est donc facilement compréhensible.

3) Régulation hormonale de la prostate

Depuis les travaux de Huggins et Hodges en 1941 (Huggins and Hodges, 2002), il est fermement établi que les androgènes régulent la croissance normale et les activités fonctionnelles de la prostate humaine. Ces auteurs ont montré l'importance des androgènes dans le développement des cancers de la prostate et qu'une suppression des hormones mâles correspondait à une amélioration de la maladie. Les hormones mâles sont indispensables à la

prolifération, la différenciation et la survie des cellules prostatiques. Chez l'homme, la testostérone est le principal androgène circulant. Elle est synthétisée principalement au niveau des cellules de Leydig des testicules, puis est sécrétée dans le sang où elle est liée à une protéine plasmatique, la SHBG (Sex Hormone Binding Protein), pour pouvoir atteindre ses organes cibles. Dans la prostate, la testostérone fonctionne comme une prohormone : elle est convertie par l'enzyme intracellulaire 5 α -réductase des cellules épithéliales et stromales en 5 α -DiHydroTestostérone (5 α -DHT), le ratio de testostérone pour la 5 α -DHT passant à 1:10 au lieu de 10:1 dans le sérum (Crawford, 2009). On sait maintenant depuis quelques années que les androgènes, aussi bien la testostérone que la 5 α -DHT, ont un mécanisme de régulation complexe faisant appel à une signalisation génomique et non génomique.

a. Effets génomiques

Le mode d'action le plus connu et reconnu des androgènes s'exerce par un effet génomique. En effet, la testostérone et la 5 α -DHT exercent principalement leurs effets biologiques *via* la liaison à un récepteur spécifique, le Récepteur aux Androgènes (Androgen Receptor, AR), la 5 α -DHT ayant une affinité 10 fois plus importante pour le récepteur que la testostérone. L'AR est une molécule cytosolique qui appartient à la famille des Récepteurs nucléaires, et dont le mode d'action principal est celui d'un facteur de transcription, les androgènes pouvant ainsi réguler l'expression de nombreux gènes (Figure 3). L'AR possède une forte affinité pour une séquence nucléotidique spécifique appelée « Androgen Response Element » (ARE), séquence qui est située dans les régions de régulation des gènes cibles des androgènes (Lamont and Tindall, 2010).

Les gènes androgéno-dépendants (dont le promoteur est directement régulé par le Récepteur aux Androgènes) possèdent souvent plusieurs ARE répartis sur leur promoteur proximal et/ou leur promoteur distal. Il a ainsi été montré que les androgènes contrôlaient l'expression du PSA et de la Phosphatase Acide Prostatique (PAP) mais également l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose comme le Récepteur à l'IGF-1, la calréticuline, la protéine p53 et la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Lamont and Tindall, 2010, Ngan, *et al.*, 2009). Il a été également montré que les androgènes pouvaient moduler le métabolisme des lipides et la biosynthèse des stéroïdes, comme par exemple en induisant l'expression de l'acétyl-CoA acyltransférase, enzyme clé de la β -oxydation des acides gras (Ngan, *et al.*, 2009). Le transcriptome régi par le récepteur aux androgènes est évalué à l'heure actuelle aux alentours de 10000 à 23000 ARNs, mais si l'on prend en compte d'autres type de transcrits comme les microARNs, il serait encore bien plus grand (Dehm and Tindall, 2006).

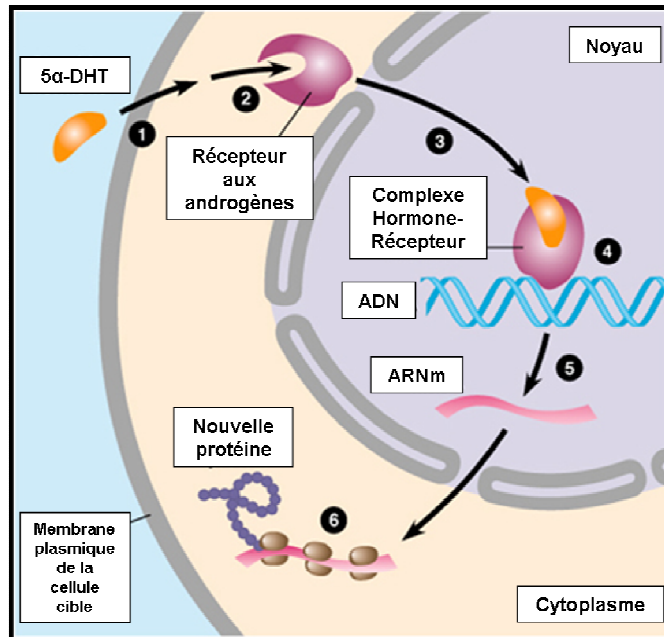


Figure 3 : Schéma du mécanisme d'action du Récepteur aux Androgènes. Les hormones androgènes passent la membrane plasmique de la cellule cible (1) et se fixent sur l'AR cytoplasmique (2). Le complexe Hormone-Récepteur est alors transloqué dans le noyau (3) où il s'homodimérise et se fixe sur une séquence spécifique d'ADN, appelée ARE, dans le promoteur du gène cible (4). Cette fixation entraîne l'activation ou l'inhibition de la transcription (5) et de la traduction qui s'en suit (6).

Même si l'on arrive un jour à identifier toutes les cibles régulées par les androgènes, il n'est pas dit que nous comprendrions le mécanisme de régulation d'expression de chacun de ces gènes. En effet, il existe de nombreuses voies de régulation de l'activité de l'AR qui vont donc impacter sur l'expression de ses gènes cibles. Le récepteur aux androgènes est connu pour avoir de nombreux co-régulateurs : 130 potentiels co-régulateurs ont été à ce jour dénombrés, qui appartiennent à différentes catégories et peuvent ainsi remodeler la chromatine, moduler l'ARN polymérase, moduler la conformation du récepteur ou sa localisation, la liaison du ligand ou encore la stabilité du complexe Hormone-Récepteur (Devlin and Mudryj, 2009, Heinlein and Chang, 2002). Un changement de ratio de ces co-activateurs et co-répresseurs, comme par exemple au cours de l'oncogénèse de la prostate, peut entraîner une régulation différentielle des gènes cibles du récepteur aux androgènes (Mestayer, *et al.*, 2003). Enfin, le récepteur aux androgènes peut bien évidemment être aussi modulé au niveau transcriptionnel ou au niveau post-traductionnel.

b. Effets non génomiques

Dans les années 1940, un nouveau mode d'action des stéroïdes a été mis en évidence : l'effet non génomique. Il est défini depuis comme un effet rapide, de quelques secondes à quelques minutes, pour lequel il n'y a pas de synthèse d'ARN messager (il ne peut donc pas être affecté par les inhibiteurs de la synthèse d'ARNm et de protéines) et qui se produit pour des concentrations physiologiques du stéroïde (Losel, *et al.*, 2003). Concernant les

androgènes, il a été montré que ces effets non génomiques pouvaient passer par la liaison directe des androgènes sur un site spécifique au niveau de la molécule cible, par une forme membranaire de l'AR classique, par un autre récepteur aux androgènes membranaire qui serait couplé à une protéine G ou encore par des changements de la fluidité membranaire (Michels and Hoppe, 2008). Ces événements induisent alors des cascades de phosphorylation intracytoplasmiques ou des modulations directes de canaux ioniques et de transporteurs (Michels and Hoppe, 2008). Peterziel et coll. ont ainsi montré que la 5 α -DHT entraînait une rapide activation des protéines ERK1/2 *via* le récepteur aux androgènes dans les cellules cancéreuses prostatiques (Peterziel, *et al.*, 1999). Il a été également mis en évidence que l'AR pouvait interagir directement avec le récepteur à l'EGF (EGF-R) et empêcher ainsi son autophosphorylation, induisant une modulation de la voie de l'EGF qui réduirait le caractère invasif des cellules cancéreuses prostatiques (Bonaccorsi, *et al.*, 2004).

B – Les pathologies de la prostate

La prostate est le siège de trois affections principales : la prostatite, l'adénome ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP) et l'adénocarcinome. Ces pathologies prostatiques peuvent atteindre l'homme jeune mais touche surtout l'homme à partir de 40-50 ans.

1) La prostatite

La prostatite est une inflammation causée dans la grande majorité des cas par des agents infectieux (bactéries et mycoplasmes), le microorganisme le plus souvent mis en cause étant *E. coli*. La prostatite peut être aiguë (apparition soudaine de fièvre, frissons et troubles urinaires importants) ou chronique (infections récurrentes des voies urinaires), et se traite dans les deux cas par des antibiotiques (Zerbib and Conquy, 2001).

2) L'adénome prostatique ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate

Avec l'âge, l'homme développe souvent une hyperplasie prostatique (augmentation du volume prostatique due à une augmentation du nombre des cellules prostatiques) appelée adénome prostatique ou encore Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP) qui désigne une tumeur bénigne de la prostate (70 % des hommes présentent une HBP histologique après 60 ans). En dehors de l'âge, d'autres facteurs semblent intervenir dans son apparition : l'influence des androgènes (les hommes castrés ou présentant un déficit en 5 α -réductase ne développent jamais d'adénome prostatique), l'origine raciale (seulement 5 à 10 % des hommes d'origine asiatique de plus de 60 ans présentent une HBP) et des gènes de prédisposition à l'HBP existeraient, des formes familiales ayant été mises en évidence (Gillenwater, *et al.*, 2001, Sanda, *et al.*, 1994). L'HBP se développe exclusivement dans la

zone de transition qui entoure l'urètre. L'adénome provoque l'apparition d'un tissu fibreux et glandulaire qui entraîne le grossissement et/ou la rigidité de la glande. Cette transformation de la glande prostatique provoque une irritation ainsi qu'une obstruction de l'urètre entraînant une gêne symptomatique lors de la miction (Figure 4).

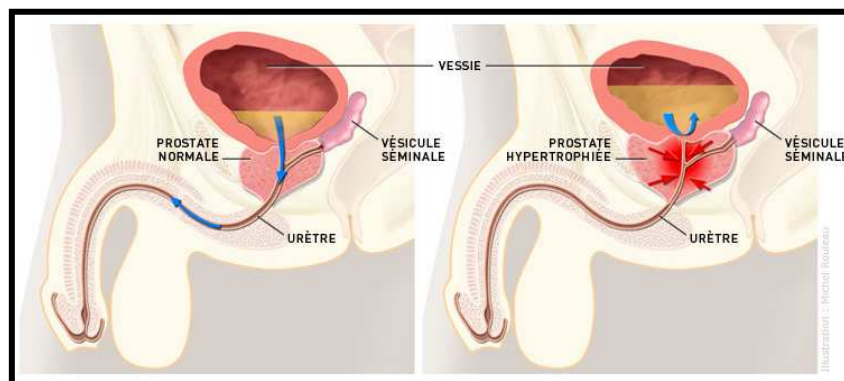


Figure 4 : Impact d'une hyperplasie bénigne de la prostate sur le système urinaire.

L'HBP provoque différents symptômes regroupés sous le terme de « prostatisme » :

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

Les manifestations cliniques sont extrêmement variables d'un individu à l'autre allant de l'absence totale de signes cliniques malgré un volume prostatique élevé pour certains, à une dégradation significative de la qualité de vie avec un faible volume prostatique pour d'autres. L'HBP peut même dans certains cas aboutir à des complications sévères comme une rétention aiguë d'urine (impossibilité de vider sa vessie), voire la destruction des reins (hydronéphrose, insuffisance rénale). L'hyperplasie bénigne de la prostate peut nécessiter un traitement médical (chimiothérapie consistant à bloquer l'AR et/ou à inhiber la 5 α -réductase) ou chirurgical, selon les symptômes de rétention urinaire présentés. Dans les cas les plus bénins, on peut se contenter de surveiller cette affection sans la traiter si elle n'affecte pas la qualité de vie chez l'homme qui en est atteint.

3) Le cancer de la Prostate

Le terme de « cancer » définit une pathologie caractérisée par la présence d'une ou plusieurs tumeur(s) maligne(s), il englobe donc plus d'une centaine de maladies, la quasi-totalité des tissus de l'organisme pouvant être atteinte. Chaque cancer présente des caractéristiques qui lui sont propres, mais les mécanismes qui engendrent ces tumeurs sont communs.

a. Histoire naturelle du cancer de la prostate

La majorité des tumeurs de la prostate se forment dans la zone périphérique mais elles peuvent aussi se développer dans le tissu de la zone centrale. Le cancer de la prostate (PCa) se développe le plus souvent à partir de l'épithélium glandulaire, on le nomme alors adénocarcinome puisqu'il a pour origine les glandes de l'épithélium (acini). Dans de très rares cas, des tumeurs peuvent aussi apparaître dans le stroma fibromusculaire, on parle alors de sarcome stromal, léiomyosarcome ou encore de rhabdomyosarcome selon la nature des cellules atteintes (Vandenbos, *et al.*, 2004).

On considère que le cancer de la prostate apparaît selon un processus lent et continu : dans un premier temps la prostate saine subit des lésions au niveau de foyers épithéliaux atrophiques (cellules épithéliales dont la prolifération accrue entraîne une atrophie) qui s'accompagnent en général d'une inflammation et sont ainsi désignées sous le terme d'Atrophie Inflammatoire Proliférative (Figure 5) (De Marzo, *et al.*, 2007). Les cellules prolifératives atrophiques commencent à acquérir des modifications génétiques et morphologiques formant des lésions précancéreuses appelées PIN (pour Prostatic Intraepithelial Neoplasia en anglais, Néoplasie Intra-épithéliale Prostatique). La prolifération continue de ces cellules génétiquement instables contribue alors au développement du carcinome prostatique.

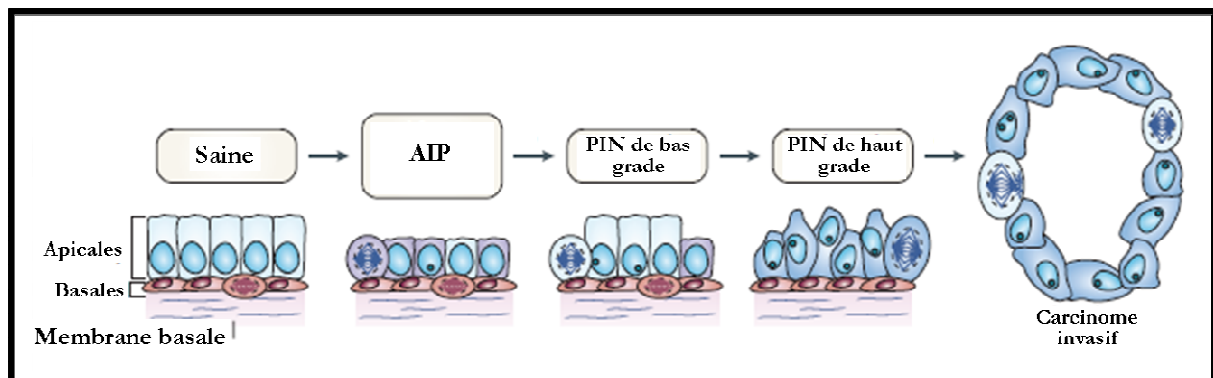


Figure 5 : Modèle cellulaire de la progression néoplasique prostatique (De Marzo, *et al.*, 2007). AIP = Atrophie Inflammatoire Proliférative, PIN = Néoplasie Intra-épithéliale prostatique.

Lorsque le cancer reste confiné à l'intérieur de la capsule de la prostate, on considère que la maladie est « localisée » et peut donc être traitée par chirurgie ou plus rarement par radiothérapie. Dès que le cancer s'étend au-delà de la capsule de Gleason, les options thérapeutiques sont différentes (Figure 6).

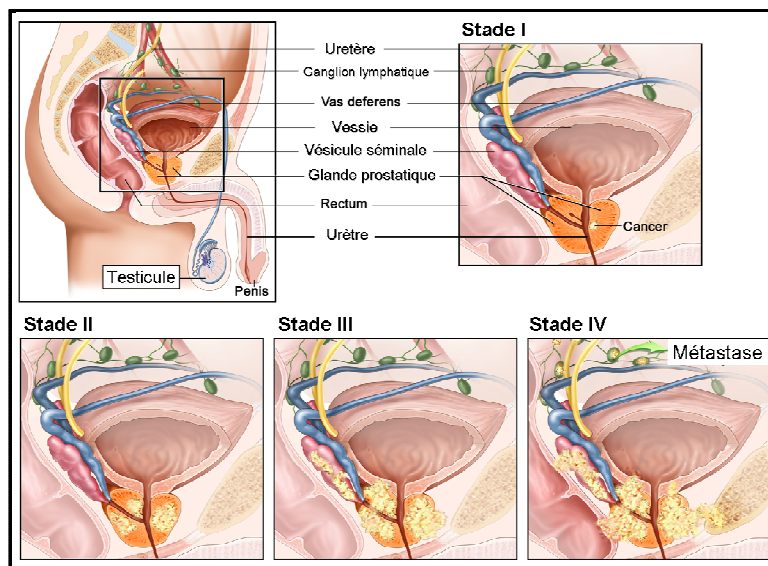


Figure 6 : Evolution anatomique du cancer de la prostate au sein de la sphère uro-génitale suivant les différents stades de la maladie (I à IV).

b. Evolution du cancer de la prostate

Dans la majorité des cas, le PCa n'évolue pas ou peu dans les 10 à 15 premières années après le diagnostic et reste « silencieux » cliniquement (Cooperberg, *et al.*, 2005). Par la suite, l'évolution de la tumeur localisée est variable. Les tumeurs de bas grade (faiblement différenciées) ont tendance à avoir une évolution lente sans manifestation clinique alors que les tumeurs de haut grade deviennent rapidement agressives et peuvent alors s'étendre aux ganglions lymphatiques et autres organes. Lorsque les tumeurs ont envahi d'autres organes, on parle de métastase. Les ganglions lymphatiques pelviens puis les os de la colonne vertébrale sont les premiers sites de dissémination des tumeurs prostatiques. Si les métastases au niveau des ganglions lymphatiques pelviens sont parfois microscopiques et difficilement détectables, il est possible de révéler leur présence par un dosage du PSA dont le taux est fortement augmenté.

c. Hormones et cancer

Les travaux de Huggins et Hodges (Huggins and Hodges, 2002) ayant mis en évidence l'importance des androgènes dans le développement des cancers de la prostate, différentes approches thérapeutiques basées sur leurs travaux se sont mises en place notamment la thérapie par castration chirurgicale ou par blocage androgénique. En effet dans ses premiers stades, la croissance du cancer de la prostate est sous dépendance des androgènes et, son évolution étant lente, approximativement 80 à 90 % des cancers de la prostate sont hormono-dépendants (Heinlein and Chang, 2004). C'est pourquoi la première voie de thérapie consiste à faire diminuer le taux d'androgènes circulants afin de limiter le développement du PCa : ce traitement de première intention consiste en un blocage androgénique complet ou une

castration (chimique ou chirurgicale) seule, suivie en cas d'échec par l'ajout d'un Anti-Androgène Périphérique (AAP) (Alexandre and Rixe, 2007). Il survient ensuite une perte de la sensibilité au traitement en moyenne 18 mois après le début de l'hormonothérapie, on parle alors de maladie « hormono-indépendante » ou comme elle est appelée depuis peu « castration-résistante » (CRPC) (Wolff and Mason, 2012). On peut cependant obtenir une nouvelle réponse par modification de la dose de l'AAP utilisé en première intention (augmentation de la dose, puis arrêt de celui-ci) ou par hormonothérapie de seconde ligne.

On considère de manière générale que la maladie devient « hormono-résistante », lorsqu'il y a échec du traitement anti-androgénique de seconde ligne, associé à une modification de la physiologie inter ou intra-cellulaire de la prostate qui lui confère la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes et qui a été induite par le traitement anti-androgénique (Séronie-Vivien and Rambeaud, 2006). Et contrairement à ce qui était pensé auparavant, l'hormonorésistance n'est pas la conséquence d'une perte d'expression de l'AR, celui-ci semblant même être surexprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques hormono-résistantes par rapport aux cellules hormono-sensibles (Chen, *et al.*, 2004, Linja, *et al.*, 2001) et cette surexpression entraînant alors une réactivation du programme d'expression génique dépendant de l'AR préalablement inactivé par l'hormonothérapie (Holzbeierlein, *et al.*, 2004).

Le caractère quasi systématique de la transition de l'hormonodépendance vers l'hormonorésistance est actuellement le cœur de nombreuses interrogations chez les urologues et oncologues, confrontés à la difficulté d'obtenir une période d'hormonodépendance la plus longue possible. En effet, la médiane de survie des patients après apparition de l'échappement thérapeutique n'est que de 12 à 18 mois, même si la chimiothérapie a récemment permis d'allonger quelque peu cette durée de vie (Séronie-Vivien, 2005). Deux théories sont actuellement proposées pour expliquer l'acquisition des adaptations moléculaires conférant l'hormonorésistance (Séronie-Vivien and Rambeaud, 2006). La théorie clonale avance l'existence d'un contingent de cellules androgéno-indépendantes avant même qu'il y ait eu hormonothérapie. Ces cellules sont sélectionnées par la privation androgénique et leur prolifération est à l'origine de l'échappement au traitement hormonal. La théorie adaptative quant à elle suppose que les cellules androgéno-dépendantes, une fois confrontées à la carence androgénique, acquièrent des modifications génomiques leur permettant de survivre et de proliférer malgré la carence. Ces deux théories ne s'excluent pas et il est fort possible qu'elles existent simultanément.

Plusieurs mécanismes ont été également proposés pour expliquer la transition vers un cancer castration-résistant, qui peuvent être regroupés en trois événements concomitants : une

activation paradoxale du récepteur aux androgènes, l'inactivation de l'apoptose et la différenciation neuro-endocrine (Figure 7).

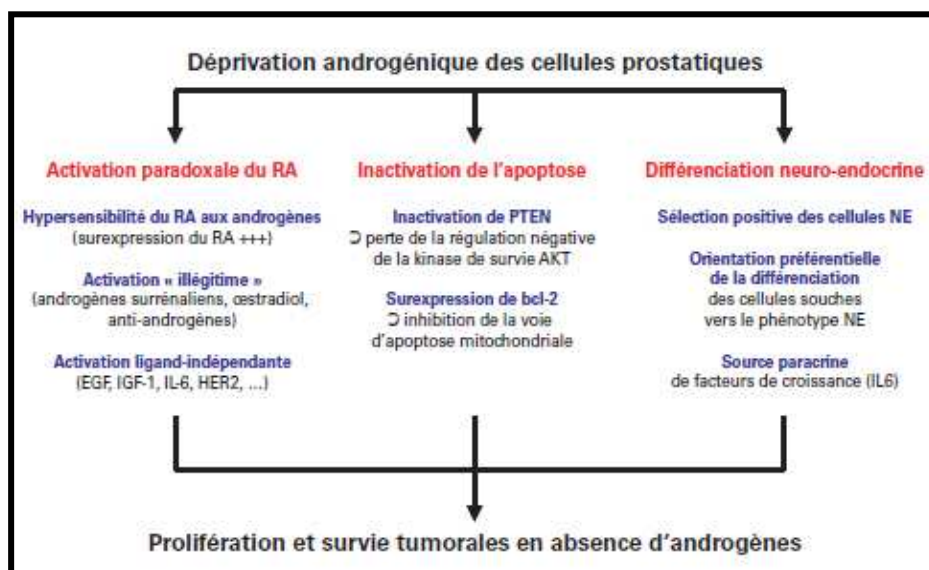


Figure 7 : Mécanismes potentiels impliqués dans la transition vers l'hormonorésistance des cancers de la prostate (Séronie-Vivien, 2005). RA = Récepteur aux Androgènes, NE = Neuroendocrine.

- Activation paradoxale du Récepteur aux androgènes :

Différentes altérations moléculaires et fonctionnelles du récepteur aux androgènes sont à l'origine du processus de résistance aux thérapies hormonales (Séronie-Vivien and Rambeaud, 2006).

- Une surexpression quantitative de l'AR par amplification de son gène (cas de 30% des tumeurs hormono-résistantes) ou par régulation transcriptionnelle, stabilisation de la protéine ou majoration de sa translocation nucléaire. Il peut également y avoir une modulation qualitative de l'action de l'AR par altération de ses cofacteurs. Cette surexpression ou suractivité de l'AR se traduit par une hypersensibilité aux androgènes circulants résiduels.
- Un élargissement du panel des ligands agonistes de l'AR. Ce phénomène est lié soit à la surexpression des co-activateurs, soit à la mutation du Récepteur aux androgènes dans son domaine de liaison du ligand. Ces mutations de l'AR apparaissent pour 10 à 30% des cancers hormono-résistants sans que l'on sache si cela est dû à une sélection clonale ou à des mutations induites. La mutation la plus étudiée et la plus fréquemment observée est Thr876Ala (Heinlein and Chang, 2004, Séronie-Vivien and Rambeaud, 2006).
- Une activation de l'AR de manière ligand indépendante. Ce mécanisme passe par une phosphorylation de l'AR dont les premiers messagers sont les facteurs de croissance (IGF-1, KGF, EGF), des cytokines (IL-6) ou des effecteurs des

kinases intracellulaires (HER 2, Akt, MAP-Kinase, PKA). Ils peuvent être d'origines endocrine, paracrine (produits par le stroma prostatique, l'os, la matrice extracellulaire, les cellules neuro-endocrines) ou autocrine (produits par les cellules tumorales elles-mêmes). Ces composés sont capables d'activer seuls l'AR mais ils agissent également en synergie avec les androgènes lorsque ceux-ci sont présents à des taux très bas.

- Inactivation de l'apoptose :

L'apoptose est une mort cellulaire programmée, déclenchée par des stimuli tels que la sénescence, des altérations de l'ADN trop importantes pour pouvoir être réparées ou la carence en facteurs de croissance. C'est un processus physiologique régulé par des mécanismes moléculaires complexes faisant notamment appel aux protéines de la famille des caspases. Certaines molécules de cette machinerie apoptotique semblent être impliquées dans la transition vers l'hormonorésistance du cancer de la prostate (Figure 8).

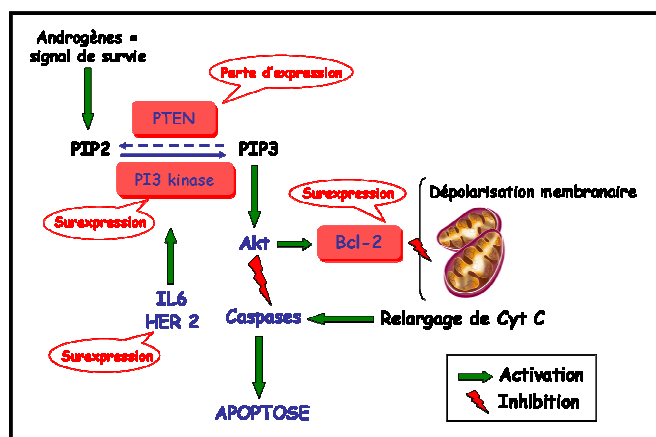


Figure 8 : Mécanismes de résistance à l'apoptose induite par le blocage androgénique, d'après (Séronie-Vivien, 2005). PIP2 = Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP3 = Phosphatidylinositol tri-phosphate.

Physiologiquement, les androgènes induisent des signaux de survie qui font appel à la production de phosphatidylinositol tri-phosphate (PIP3) à partir du PIP2 par l'enzyme PI3 Kinase. Le PIP3 va alors constituer le messenger intracellulaire du signal anti-apoptotique en activant la kinase Akt. Celle-ci va ensuite inhiber les caspases responsables de l'apoptose de façon directe et indirecte, en activant la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui empêche le phénomène de dépoliarisation membranaire des mitochondries (à l'origine de l'activation des caspases *via* le relargage de cytochrome C dans le cytosol). Les mécanismes de résistance à l'apoptose mis en évidence sont une perte d'expression de PTEN (phosphatase catalysant la dégradation du PIP3 en PIP2), la surexpression de la PI3 Kinase aboutissant à une augmentation du signal de survie, PIP3 ou une surexpression de Bcl-2 qui inhibe ainsi le

signal d'apoptose d'origine mitochondriale (Séronie-Vivien and Rambeaud, 2006, Shen and Abate-Shen, 2007).

- Différenciation neuro-endocrine :

Parmi les différents types cellulaires composant le tissu prostatique sain, il existe une catégorie largement minoritaire : les cellules neuroendocrines. Leur proportion semble augmenter avec l'apparition du cancer et les densités les plus importantes de ces cellules neuro-endocrines ont été observées dans des tumeurs prostatiques hormono-résistantes après thérapie anti-androgénique (Hirano, *et al.*, 2004). L'enrichissement en cellules neuroendocrines du cancer de la prostate est associé à un très mauvais pronostic, ces cellules étant insensibles aux traitements chimiothérapeutiques standards et aux radiothérapies.

Plusieurs phénomènes pourraient être à l'origine de cette différenciation neuroendocrine. Des études récentes montrent que les traitements anti-androgéniques augmentent le nombre de cellules neuroendocrines dans les tumeurs (Abrahamsson, 1999). Les traitements ne feraient donc que sélectionner des cellules neuroendocrines androgéno-indépendantes aux dépens des cellules androgéno-dépendantes. Il a été également suggéré que l'acquisition des caractéristiques neuroendocrines s'effectuait au cours de la progression tumorale. Ainsi, suite à une transformation maligne, une cellule épithéliale ou basale développerait des caractéristiques neuroendocrines et serait alors régulée par des mécanismes androgéno-indépendants. Souvent les cancers prostatiques présentant une différenciation neuroendocrine sont caractérisés par la présence de foyers de cellules neuroendocrines au sein de cellules malignes non neuroendocrines. Enfin, une étude récente a caractérisé les mécanismes moléculaires à l'origine du processus de différenciation neuroendocrine : la Sérine-Thréonine kinase Akt contrôlerait le déclenchement de la différenciation neuroendocrine en phosphorylant la Ribonucléoprotéine K (RNP K), le Récepteur aux Androgènes et la β -caténine (Ciarlo, *et al.*, 2012). Ces phosphorylations induisent la dégradation protéasomale de l'AR et la translocation nucléaire de la β -caténine et de la RNP K, induisant ainsi la régulation transcriptionnelle d'autres cibles.

d. Métastases

Les métastases sont définies par le processus par lequel des cellules malignes migrent par voie lymphatique ou par voie sanguine depuis la tumeur primaire vers un autre site distant pour établir une tumeur secondaire (Arya, *et al.*, 2006). C'est un processus complexe qui se déroule selon l'enchaînement de différentes étapes : la dissociation des cellules cancéreuses de la tumeur « primaire » d'origine, la migration des cellules vers les tissus adjacents, l'adhésion à la surface de l'endothélium, l'invasion cellulaire à travers la surface endothéliale,

l'invasion cellulaire dans un nouvel environnement puis la prolifération cellulaire donnant lieu à une tumeur « secondaire ». Le cancer de la prostate est caractérisé par un tropisme important pour le tissu osseux. En effet, 95 % des patients qui décèdent du cancer de la prostate sont porteurs de métastases osseuses et, dans la plupart des cas, ce sont les complications liées à ces métastases (fractures, compression médullaire, envahissement et épuisement de la moëlle osseuse) qui ont entraîné leur décès. Les os sont ainsi, avec les ganglions lymphatiques pelviens et lombo-aortiques, le site le plus fréquent de dissémination métastatique. D'autres localisations, comme le foie, le poumon et le cerveau sont également possibles mais ne s'observent qu'exceptionnellement.

e. Classification oncologique

Le cancer de la prostate ayant souvent une origine multifocale (Cheng, *et al.*, 1998), il est en générale difficile d'évaluer son grade oncologique. C'est pourquoi plusieurs systèmes de classification ont été imaginés et sont actuellement utilisés pour grader les cancers de la prostate en fonction de leur avancement oncologique : le système TNM (pour Tumor, Node and Metastasis) qui évalue la taille et la localisation de la tumeur, le système de Whitmore et Jewett (moins détaillé et de moins en moins utilisé, qui emploie les lettres de A à D pour grader le cancer) et le score de Gleason qui prend en compte l'état de différenciation du tissu cancéreux.

- le système TNM :

Il fut développé en 1977 par Ammon et coll. (Ammon, *et al.*, 1977) mais ne fut adopté par l'Union Internationale Contre le Cancer qu'en 1992. Il est régulièrement révisé et corrigé, la dernière version datant de 2010 (Cheng, *et al.*, 2012). Il évalue la taille de la tumeur et sa propagation extra-capsulaire (T), dans les ganglions lymphatiques (N) et dans les métastases lointaines (M), les représentations de ces valeurs sont listées dans le [Tableau 1](#).

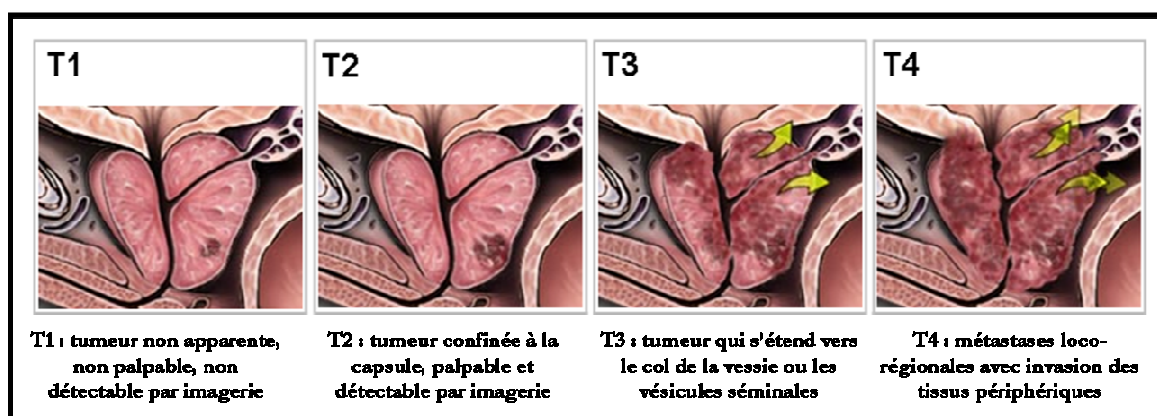


Figure 9 : Représentation des tumeurs de la prostate de grade T1 à T4 selon la classification TNM.





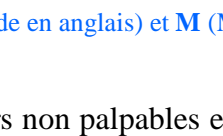
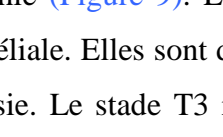
T Tumeur primitive Tx Tumeur primitive ne pouvant être classée T0 Absence de tumeur primitive T1 Tumeur non palpable de découverte fortuite ou visible à l'imagerie T1a Tumeur envahissant 5% du tissu réséqué lors d'une résection de prostate T1b Tumeur envahissant plus de 5% du tissu réséqué lors d'une résection de prostate T1c Tumeur découverte sur des biopsies pour une élévation du PSA	
T2 Tumeur limitée à la prostate (apex et capsule compris) T2a Atteinte d'un lobe prostatique T2b Atteinte des deux lobes prostatiques	
T3 Tumeur avec une extension au-delà de la capsule T3a Extension extra-capsulaire (invasion du col de la vessie) T3b Extension aux vésicules séminales	
T4 Tumeur avec une extension aux organes adjacents (col vésical, sphincter urétral, rectum, paroi pelvienne) ou tumeur fixée	
N Ganglions régionaux Nx Ganglions régionaux non évaluables N0 Absence de métastase ganglionnaire régionale N1 Atteinte ganglionnaire régionale	
M Métastases à distance Mx Métastase à distance non évaluable M0 Absence de métastase à distance M1 Métastases à distance M1a Ganglions non régionaux M1b Os M1c Autres sites	

Tableau 1 : Représentation des valeurs **T** (Tumeur), **N** (Ganglion pour Node en anglais) et **M** (Métastases).

Les tumeurs de grade T1 caractérisent de petites tumeurs non palpables et difficilement détectables par les techniques d'imagerie comme l'échographie (Figure 9). Les tumeurs de stade T2 sont plus étendues, mais confinées à la capsule épithéliale. Elles sont détectables par palpation et peuvent être prélevées avec une aiguille à biopsie. Le stade T3 représente des tumeurs ayant dépassé la barrière de la capsule de Gleason et qui se propagent au col vésical et aux vésicules séminales. Le dernier stade (T4) définit les métastases loco-régionales, c'est à dire les métastases ayant gagné des organes périphériques tels que la vessie. La propagation des métastases loco-régionales aux ganglions lymphatiques est définie par le statut N (N0-N1), alors que le statut M (M0-M1) désigne les métastases lointaines et indique quels organes elles ont atteint (os, foie, cerveau, ...).

- le score de Gleason:

En 1967, Gleason et coll. inventèrent un système de gradation du cancer de la prostate avec lequel ils mirent en évidence 5 grades distinctifs après l'observation histologique de plus d'un millier de tumeurs prostatiques (Gleason and Mellinger, 1974, Mellinger, *et al.*, 1967). Il est également mis à jour régulièrement et la dernière révision date de 2010 (Epstein, 2010). Ce système repose sur le profil architectural du tissu prostatique et le degré de différenciation de ses cellules, le grade oncologique étant défini par la somme des deux profils architecturaux

les plus observés et s'appelant le score de Gleason. Les caractéristiques et aspects histologiques des 5 grades sont présentés dans le [Tableau 2](#).

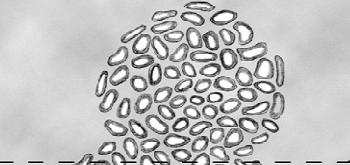
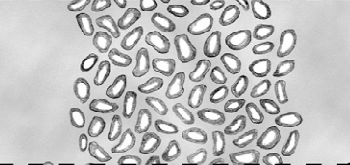
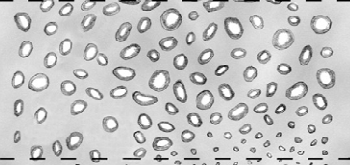
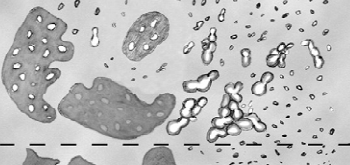
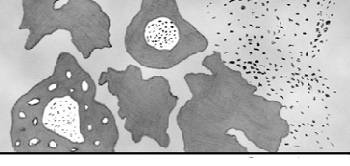
Grade	Profil Architectural	Description
①		Nodule circonscrit, avec de larges glandes contenant des acini uniformes, de taille moyenne, de forme ronde à ovale et étroitement regroupés mais bien distincts les uns des autres.
②		Nodule assez circonscrit, mais aux bords mal définis. Les glandes ont un arrangement plus lâche et sont moins uniformes.
③		Masses irrégulières aux bords déchiquetés. Glandes bien définies mais à taille et forme variable qui s'infiltrant parmi les acini non néoplasiques.
④		Tumeur à glandes fusionnées, glandes distinctes à faible lumière, larges glandes cribriformes et glandes à bord irrégulier. Aspect d'hypernephrome.
⑤		Massifs irréguliers et/ou arrondis disposés de façon variable, avec nécrose centrale (comédocarcinome) entourée de masses papillaires, solides, ou cribriformes.

Tableau 2 : Caractéristiques et aspects histologiques des différents grades (1 à 5) du cancer de la prostate selon le système de gradation de Gleason, d'après (Epstein, 2010).

f. Etiologie et épidémiologie du cancer de la prostate

Comme de nombreux autres cancers, le développement et la progression du cancer de la prostate sont principalement dus à l'accumulation de modifications génétiques. De nombreuses études ont ainsi décrit l'expression aberrante d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeur observée dans des cas de cancers prostatiques (Wong and Wang, 2000). On peut ainsi citer la surexpression d'oncogènes classiques tels que *ras*, *myc* et *c-sis* mais également d'autres types d'oncogènes comme *ETV1-4* et *ERG* (gènes codant des facteurs de transcription) pour lesquels on a observé une fusion avec le gène *TMPRSS2* (gène codant une sérine protéase transmembranaire) (De Marzo, *et al.*, 2007, Wang and Wong, 1997). Le gène de fusion *TMPRSS2-ERG* serait spécifique du cancer de la prostate et peut même être détecté dans les lésions précurseurs de type PIN. Depuis de nombreuses années, les oncogènes ne sont plus considérés comme les seuls événements génétiques à l'origine de la tumorigénèse, les gènes suppresseurs de tumeur étant tout aussi importants. Dans la tumorigénèse prostatique, il a par exemple été montré l'implication des gènes codant pour les protéines KAI1 (Dong, *et al.*, 1995), thymosine-beta 15 (Bao, *et al.*, 1996), du rétinoblastome

(pRb) (Kubota, *et al.*, 1995), p53 (Dong, *et al.*, 1997), PTEN (Whang, *et al.*, 1998), E-cadhérine (Morton and Isaacs, 1998), NKX3.1 (Bhatia-Gaur, *et al.*, 1999), p27 (Yang, *et al.*, 1998) et la Glutathion-S-Transférase GSTP1 (Yegnasubramanian, *et al.*, 2004).

Même si ces modifications génétiques sont cruciales dans la compréhension du mécanisme initiateur du PCa, elles ne suffisent pas à expliquer pourquoi le cancer de la prostate est aussi fréquent. D'autres facteurs semblent donc être impliqués dans son développement et sa progression, et certains facteurs de risque ont ainsi pu être identifiés. Un facteur de risque est un élément qui augmente le risque de développer une maladie et il en existe différentes sortes.

- Facteurs de risques constitutionnels :

Le facteur de risque le plus évident est l'âge. En effet, le cancer de la prostate est une affection dont l'incidence croît avec l'augmentation de la longévité. La majorité des cancers de la prostate sont découverts après 65 ans. Les antécédents familiaux interviennent également. En effet, le risque de développer un cancer de la prostate est 2 à 5 fois plus important si votre père ou frère en a eu un. L'origine ethnique est aussi un facteur de risque fréquemment évoqué. Il a en effet été montré que l'incidence du cancer de la prostate variait d'un continent à l'autre et d'une population à l'autre, les populations noires américaines étant les plus touchées. A l'inverse, les populations caucasiennes et asiatiques ont un risque moindre de développer un cancer de la prostate. Il est probable que des facteurs environnementaux soient en cause.

- Facteurs de risques environnementaux :

De multiples études ont tenté d'identifier des facteurs de risque du cancer prostatique présents dans l'environnement. Les importantes variations géographiques de l'incidence du cancer de la prostate suggèrent le rôle important que peuvent jouer certains facteurs environnementaux dans le développement du PCa. En effet, l'incidence et le taux de mortalité du PCa sont bien plus élevés en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord qu'en Asie, l'incidence étant jusqu'à 80 fois plus élevée aux Etats-Unis par rapport à la Chine (Parkin, *et al.*, 2005). Ces différences peuvent s'expliquer notamment par des comportements alimentaires différents (Stacewicz-Sapuntzakis, *et al.*, 2008). Il a ainsi été montré que la consommation régulière de graisses animales était directement associée au risque de développer un cancer de la prostate (Glade, 1999, Whittemore, *et al.*, 1995). Une alimentation riche en produits laitiers a été également mise en cause, l'apport en calcium supprimant les effets bénéfiques de la vitamine D (Giovannucci, 1998). En parallèle de

l'alimentation, d'autres facteurs plus incertains interviennent tels que l'obésité, le manque d'exercice, la consommation de tabac et l'exposition à des radiations.

4) Diagnostic

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

a. Examen clinique

Le geste diagnostique le plus simple et le plus efficace est le toucher rectal. Il s'agit d'un test quasi indolore, qui ne dure que quelques secondes et qui est effectué par le médecin généraliste. Le médecin palpe la prostate à travers le rectum pour apprécier son volume, la régularité de ses contours et sa consistance. Le médecin peut aussi mettre en évidence des zones anormales indurées (nodules) suspectes. L'examen permet également de juger si la maladie s'est étendue aux organes de voisinage comme la vessie et le rectum. Les cancers prostatiques détectés au toucher rectal sont malheureusement dans 50% des cas des cancers pathologiquement avancés.

b. Examen biologique

Le cancer de la prostate peut être détecté par un examen sanguin, le dosage du PSA étant le test le plus couramment utilisé à l'heure actuelle. Le PSA est sécrété aussi bien par les cellules normales de la prostate que par les cellules tumorales (Figure 10). Cependant son taux sanguin augmente dans le cancer de la prostate, c'est pourquoi la mesure du taux de PSA est utilisée pour évaluer le risque de cancer de la prostate. La valeur du taux de PSA permet ainsi de suspecter l'existence d'un cancer de la prostate : plus le taux de PSA est élevé, plus le risque de cancer de la prostate est grand comme l'indique le tableau 3. Toutefois, ce test n'est pas toujours concluant : il arrive que certains hommes atteints d'un cancer de la prostate ne présentent pas un taux de PSA élevé et il s'avère que deux tiers des hommes dont le taux de PSA est élevé n'ont pas de cancer de la prostate.

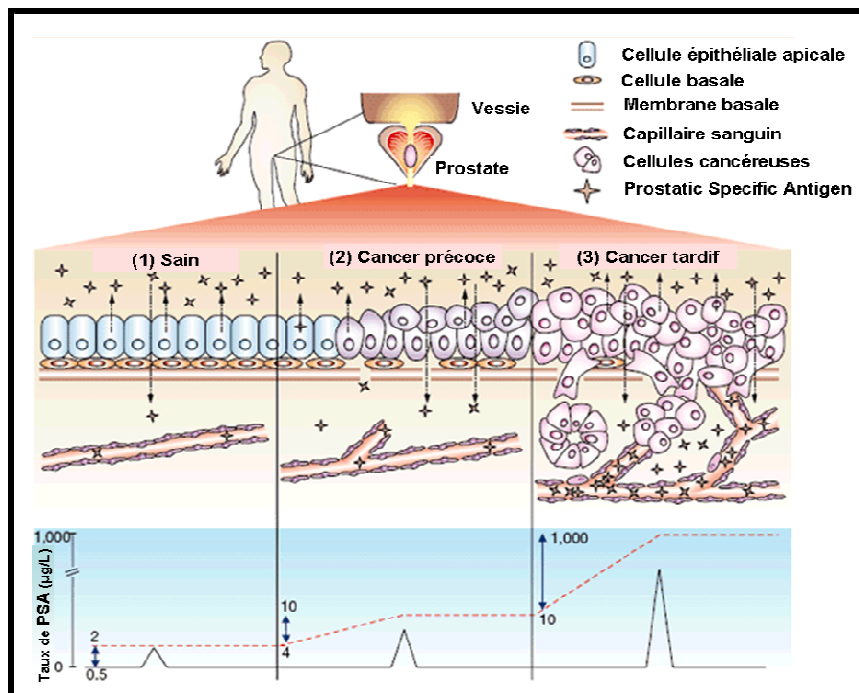


Figure 10 : Sécrétion du PSA dans le tissu prostatique sain (1), cancéreux précoce (2) et tardif (3).

Il a ainsi été constaté que la spécificité du test par dosage du PSA n'était que de 20 à 40% et sa sensibilité de 70 à 90% (Brawer, 1999). Des efforts ont été récemment réalisés pour améliorer les performances de ce test, notamment en normalisant le taux de PSA par rapport au volume de la glande (mesure de la « Densité de PSA ») ou en suivant les dynamiques de renouvellement du PSA dans le sérum comme la mesure de la vélocité du PSA, PSAV, qui correspond au changement de concentration en PSA sur une année, ou encore la mesure du temps de doublement du PSA, PSADT (Prensner, *et al.*, 2012). Ces valeurs dynamiques semblent plutôt jouer un rôle pronostique, des valeurs élevées de PSAV et de PSADT étant associées à une survie diminuée.

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

Tableau 3 : Valeur du taux de PSA en fonction du grade du cancer de la prostate.

L'émergence du dosage du PSA a ouvert la voie à la découverte et l'utilisation d'autres biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic du cancer de la prostate. L'un des biomarqueurs émergent en tant que test diagnostique du cancer de la prostate est le PCA3

(«Prostate Cancer Antigen 3») dont la surexpression est observée dans plus de 90% des cancers prostatiques, à l'inverse des prostatites saines et hyperplasiques (Bussemakers, *et al.*, 1999, de Kok, *et al.*, 2002). La haute sensibilité et spécificité de PCA3 ont conduit à l'élaboration d'un test urinaire (l'urine contenant des cellules prostatiques qui se sont détachées durant la miction) mais qui reste encore expérimental et n'est pas utilisé en routine (Prensner, *et al.*, 2012, Wolff and Mason, 2012). Le gène de fusion *TMPRSS2-ERG* pourrait être également exploité comme marqueur urinaire, mais en combinaison avec d'autres marqueurs comme le PSA car son transcrite n'est détecté que dans 50% des cancers prostatiques (Hessels, *et al.*, 2007). D'autres biomarqueurs existent encore (l' α -Méthylacyl-coenzyme A racemase, GOLPH2, SPINK1) mais présentent le désavantage d'un mode de détection invasif ou coûteux, de ne pas être spécifique au cancer de la prostate ou de ne pas apporter d'informations supplémentaires par rapport au PSA (Clarke, *et al.*, 2010, Prensner, *et al.*, 2012). Des lacunes restent donc à combler quant aux tests biologiques (Figure 11).

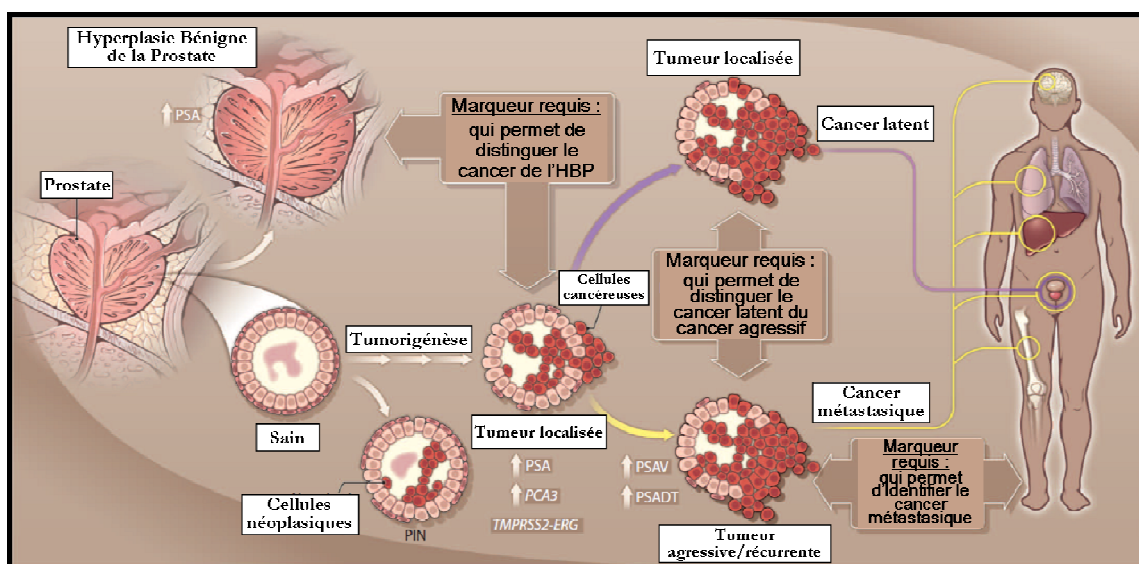


Figure 11 : Besoins actuels en biomarqueurs pour le cancer de la prostate, d'après (Prensner, *et al.*, 2012).

c. Prélèvement tissulaire prostatique

A l'heure actuelle, le seul moyen d'établir un diagnostic définitif est de pratiquer une biopsie qui permet au médecin d'examiner l'architecture cellulaire de la prostate au microscope. Les prélèvements ou biopsies permettent d'analyser au microscope les cellules et tissus prélevés. Ces analyses anatomo-pathologiques donnent des informations précises sur le type de cancer et ses caractéristiques. La biopsie prostatique est réalisée par un urologue, elle consiste en une ponction souvent effectuée par voie transrectale avec un guidage par échographie.

5) Traitements

Avant l'introduction du dosage du PSA, 50 à 70% des cancers prostatiques étaient diagnostiqués au stade d'extension locale ou métastatique. Aujourd'hui, moins de 5% des malades sont diagnostiqués à un stade avancé ou métastatique alors que plus de 70% des cancers sont diagnostiqués à une phase débutante (Tombal and Van Cangh, 2001). Le cancer de la prostate est ainsi devenu une maladie polymorphe qui touche aussi bien l'homme dans la cinquantaine en bonne santé que l'homme de 70-75 ans aux pathologies associées multiples, et il est souvent difficile pour le clinicien de trouver le meilleur traitement adapté au malade.

A l'heure actuelle il existe deux types de traitements utilisés contre le cancer prostatique : les traitements curatifs radicaux à l'intention des formes localisées de la maladie et les traitements palliatifs pour les formes avancées et métastatiques. Le traitement radical consiste en une prostatectomie totale, une radiothérapie externe ou une brachythérapie (sources radioactives mises temporairement ou définitivement au contact direct de la tumeur). Le traitement palliatif comprend le traitement hormonal ou une chimiothérapie.

❖ les traitements radicaux :

La prostatectomie radicale, qui consiste à retirer chirurgicalement la totalité du tissu pathologique prostatique, est le traitement de choix du cancer prostatique localisé chez l'homme âgé de moins de 70 ans (85% de survie à 15 ans) (Krongrad, *et al.*, 1997). Une meilleure connaissance de l'anatomie chirurgicale des plexus veineux périprostatiques, de la physiologie de l'appareil sphinctérien, et le développement de nouvelles techniques opératoires comme la laparoscopie assistée par robot a permis de réduire la morbidité périopératoire, de diminuer l'incidence d'impuissance et d'améliorer la continence postopératoires (Murphy, *et al.*, 2009, Tombal and Van Cangh, 2001, Wolff and Mason, 2012). La radiothérapie radicale, qu'elle soit externe ou interne, représente une alternative intéressante avec des taux de survie à moyen terme comparables à ceux de la prostatectomie radicale.

❖ les traitements palliatifs :

Depuis plus de 60 ans, la suppression androgénique est le traitement de choix des cancers avancés et métastatiques de la prostate. La première ligne de thérapie hormonale comprend différents modes de suppression des androgènes selon la cible visée et la mise en œuvre réalisée :

- **La castration chirurgicale (orchidectomie) ou chimique** qui bloque directement la production de testotérone. La castration chirurgicale (par ablation d'un ou des deux testicules) est la forme de suppression androgénique la plus ancienne et la plus rapide, permettant une baisse rapide du taux de testostérone sanguin. Les risques opératoires sont minimes mais l'acte est irréversible et peut entraîner des

effets indésirables. Cette technique n'est plus utilisée qu'en de rares indications : patient âgé, présentant une démence ou une débilité, ou présentant une maladie très agressive qui nécessite une efficacité thérapeutique immédiate. La castration chimique qui, elle, est réversible, est plus couramment utilisée : elle fait appel à des analogues ou agonistes de la LH-RH (Zoladex®, Decapeptyl®, Lucrin®) qui permettent de supprimer la sécrétion de LH (Luteinizing Hormone), hormone induisant la sécrétion de la testostérone au niveau des testicules (Figure 12). Cependant, de par leur activité d'agoniste partiel ils entraînent une stimulation initiale du récepteur à la LH-RH et un pic sécrétoire transitoire de testostérone qui se traduit par une majoration transitoire de la symptomatologie, connue sous le nom de « flare up » (Tombal and Van Cangh, 2001). Pour éviter ces désagréments, des antagonistes vrais de la LH-RH sont désormais disponibles (Abarelix®,Citrorelix®).

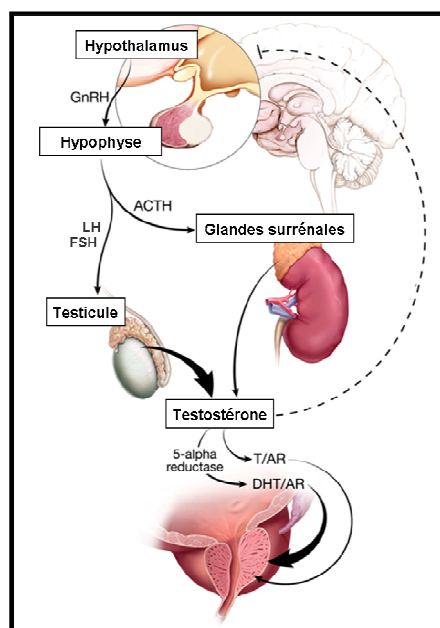


Figure 12 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique.

- **L'utilisation d'anti-androgènes périphériques** qui inhibent directement l'action de la testostérone et des androgènes surrénaliens au niveau cellulaire, produisant ainsi une castration intracellulaire sélective. On distingue les anti-androgènes stéroïdiens (Androcur®, Cyprostat®, Megace®) et les anti-androgènes non-stéroïdiens périphériques purs (Eulexin®, Flutaplex®, Casodex®). Les anti-androgènes peuvent être utilisés en monothérapie dans le cas d'un cancer agressif mais localisé, en alternative à la castration, permettant au patient de garder une meilleure qualité de vie. Ils peuvent être également utilisés en combinaison avec la

castration de manière à obtenir un blocage total des androgènes et à réduire l'effet « flare up » (Schroder, *et al.*, 2012, Tombal and Van Cangh, 2001).

- **L'utilisation d'œstrogènes** constitue une autre façon de provoquer un arrêt de synthèse de testostérone par les testicules en inhibant la sécrétion hypophysaire de LH mais présente de nombreux risques cardiovasculaires et de ce fait ils ne sont plus recommandés comme traitement de première ligne par l'Association Européenne d'Urologie (Schroder, *et al.*, 2012).
- **L'utilisation d'antagonistes de la GnRH** constitue la nouvelle génération de castration chimique. Les antagonistes de la GnRH (Abarelix®, Degarelix®) en bloquant de manière immédiate et compétitive le récepteur de la GnRH induisent une rapide baisse du taux de LH, FSH et de testostérone, sans déclencher le phénomène de « flare up ». Ces agents semblent avoir une meilleure efficacité (suppression de testostérone et diminution du taux de PSA sanguin toujours constatées au bout de 3 ans de traitement) et allonger la durée de survie en retardant quelque peu l'apparition du cancer hormonorésistant (Schroder, *et al.*, 2012, Wolff and Mason, 2012).
- **L'utilisation d'inhibiteurs de la 5 α -réductase**, qui permettent de supprimer de 70 à 95 % la 5 α -DHT circulante (Finastéride®, Dudastéride®) (Thorpe, *et al.*, 2007). Leur utilisation en combinaison avec des anti-androgènes périphériques chez des patients présentant un cancer prostatique avancé permet d'arrêter la progression de la maladie voire dans certains cas d'entraîner sa régression (Vis and Schroder, 2009).

Lorsque le patient ne répond plus à ces traitements, le cancer de la prostate devient « castration-résistant » et une deuxième ligne de thérapie hormonale peut être envisagée : elle correspond à un sevrage en anti-androgènes combiné à l'utilisation de molécules qui bloquent la synthèse de la testostérone d'origine surrénalienne, comme l'Hydrocortisone ou le Kétoconazole (Pronzato and Rondini, 2005). Cette seconde ligne de traitement n'offre malheureusement qu'une réponse limitée (réponse de quelques mois en général). La chimiothérapie peut être alors une alternative intéressante. La plupart des nouveaux protocoles prônent l'utilisation combinée de l'estramustine phosphate (Estracyt®) et d'agents de dernières générations tels que les taxanes (le paclitaxel ou Taxol®, le docetaxel ou Taxotere®) ou des dérivés platines oraux, qui permet d'améliorer la qualité de vie et la survie globale des patients (Machiels and Tombal, 2004). Il faut cependant souligner que ces patients sont souvent âgés, avec de nombreuses co-morbidités, ce qui rend parfois difficile l'administration d'un traitement de chimiothérapie lourd.

La transition vers un cancer hormono-résistant est donc associée à un faible pronostic vital, et la recherche des mécanismes moléculaires mis en jeu dans l'avancée des cancers prostatiques s'avère donc cruciale pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. A ce titre, la compréhension des interactions qui s'établissent entre la tumeur épithéliale et son environnement stromal paraît une voie d'étude intéressante puisque le stroma semble mettre en place de nombreux mécanismes pour favoriser la croissance tumorale prostatique.

II- Histologie de la prostate humaine et interactions épithélio-mésenchymateuses

A – Histologie

Le tissu prostatique est constitué de deux couches histologiques principales : le stroma fibro-musculaire et le tissu glandulaire, séparé l'un de l'autre par une membrane basale. Le tissu glandulaire est constitué d'un épithélium pseudo-stratifié (épithélium prostatique) qui forme les unités fonctionnelles sécrétrices de la prostate, les acini (Figure 13):

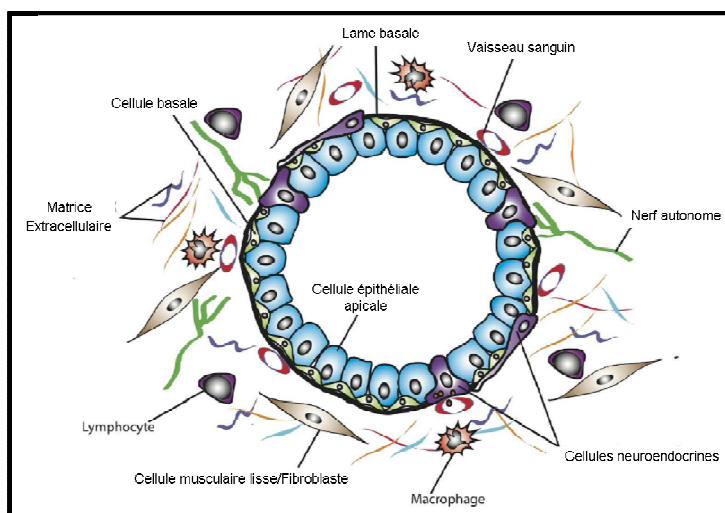


Figure 13 : Architecture cellulaire du tissu prostatique d'après (Rowley and Barron, 2012).

1) Le tissu glandulaire

Le tissu glandulaire de la prostate est formé par un épithélium pseudo-stratifié qui est composé de différents types cellulaires distincts :

- **les cellules épithéliales apicales ou luminales.** Ces cellules, de forme cylindrique, bordent la lumière de l'acinus et sont de type sécrétoire. Elles synthétisent et sécrètent de nombreuses protéines telles que le PSA ou la Phosphatase Acide Prostatique (PAP), et expriment des marqueurs spécifiques, telles que les cytokératines 8 et 18, et les molécules de surface CD10 et w123 (Liu and True, 2002). Elles expriment également le récepteur aux androgènes et sont de ce fait androgéno-dépendantes car leur survie et leur différenciation sont sous le contrôle des androgènes.

- **les cellules épithéliales basales.** Elles forment une couche continue uni- ou bi-cellulaire, ont une morphologie cubique ou aplatie, maintiennent un état relativement non différencié et sont capables de proliférer (Taylor, *et al.*, 2010). Les cellules basales sont androgéno-indépendantes et expriment des marqueurs spécifiques tels que les cytokératines 5, 14, CD117 et p63 (Leong, *et al.*, 2008, van Leenders and Schalken, 2003). Ces cellules disparaissent lors de l'évolution du tissu prostatique vers le cancer.

- **les cellules progénitrices ou épithéliales intermédiaire.** Le concept de cellules intermédiaires est né de l'idée que la différenciation est un processus séquentiel et dynamique (Figure 14). De nombreuses études basées sur des marquages immunohistochimiques ont mis en évidence l'existence de cellules aux caractéristiques intermédiaires du point de vue phénotypique qui expriment un mélange des marqueurs épithéliaux apicaux et basaux : cytokératines 5, 8, 14 et 18 et Récepteur aux androgènes (Ceder, *et al.*, 2008, Lawson, *et al.*, 2010, van Leenders, *et al.*, 2000, van Leenders and Schalken, 2003, Verhagen, *et al.*, 1992). Elles sont également appelées « transit-amplifying cells » du fait qu'elles présentent le plus fort taux de prolifération du compartiment épithélial. De récentes observations ont permis de faire la distinction entre différents types de cellules intermédiaires. En effet, il a été montré chez des souris ayant subi une castration androgénique qu'une fraction de cellules castration-résistantes avait la capacité de régénérer le tissu prostatique (avec formation de cellules basales, apicales et neuroendocrines) (Wang, *et al.*, 2009). Ainsi il existerait des cellules progénitrices situées dans la couche basale de l'épithélium, multipotentes, qui peuvent donner naissance aux cellules neuroendocrines, aux cellules basales matures et à des cellules progénitrices luminales qui sont à l'origine des cellules apicales. Les cellules progénitrices apicales quant à elles ont été identifiées pour leur capacité de régénération (elles seraient bipotentes) et pour leur expression du gène suppresseur de tumeur Nkx3.1 (Wang, *et al.*, 2009).

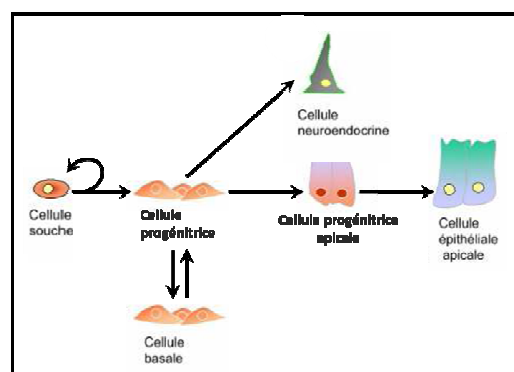


Figure 14 : Représentation schématique et hypothétique de la différenciation cellulaire de l'épithélium prostatique.

- **les cellules neuroendocrines.** Ces cellules ne représentent que 0,5 à 2% du tissu prostatique, elles sont dispersées dans le compartiment glandulaire entre les cellules épithéliales mais aussi dans le stroma. Elles sont dites neuroendocrines car elles possèdent certaines caractéristiques structurales, fonctionnelles et métaboliques similaires au neurone et produisent des substances semblables aux neurohormones et neurotransmetteurs tels que la

calcitonine, la sérotonine ou le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide). Elles expriment également des marqueurs neuroendocriniens spécifiques tels que la NSE (Neuron Specific Enolase) et la Chromogranine A (Karlsson, 2001). Leur origine a longuement été débattue, bien qu'il soit admis aujourd'hui qu'elles proviendraient des crêtes neurales (Aumuller, *et al.*, 1999). Les derniers travaux concernant la différenciation de ces cellules suggèrent qu'elles se forment à partir des cellules progénitrices situées dans la couche basale de l'épithélium prostatique (Ceder, *et al.*, 2008, Goldstein, *et al.*, 2010). Leur fonction précise n'est pas encore connue, elle pourrait cependant moduler la prolifération des cellules adjacentes par sécrétion paracrine de neuropeptides

- **les cellules souches.** Il est accepté depuis longtemps que les cellules souches prostatiques adultes résident dans le compartiment épithélial basal, bien qu'il existe actuellement une controverse sur leur hiérarchie de différenciation (Taylor, *et al.*, 2010). Le dernier modèle en date (Figure 14) propose une hiérarchie linéaire, basée sur des études fonctionnelles utilisant des marqueurs spécifiques des cellules souches prostatiques tels que CD133, KIT et Dlk-1 (Ceder, *et al.*, 2008). L'existence de cellules souches cancéreuses est également admise depuis peu : les cellules souches et progénitrices saines étant dans un processus prolifératif constant, si elles subissent une transformation maligne, elles peuvent alors conduire à la formation d'une tumeur (Reya, *et al.*, 2001, Signoretti and Loda, 2007).

2) Le stroma

Le stroma se compose essentiellement de fibroblastes, de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes mais contient également des cellules endothéliales qui forment les vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires (macrophages, monocytes...). Ces différents types cellulaires participent au support mécanique et au maintien de l'homéostasie du tissu glandulaire : elles contrôlent la prolifération et l'état de différenciation des cellules épithéliales adjacentes notamment par la sécrétion de facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le TGF β (Transforming Growth factor Beta), le NGF (Nerve Growth Factor), l'HGF (Hepathocyte Growth Factor), l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), le FGF (Fibroblast Growth Factor), le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le PDGF (Platelet-derived Growth Factor) et d'hormones comme la prolactine (Berry, *et al.*, 2008). Ces sécrétions sont pour la plupart sous le contrôle des hormones androgènes, les cellules stromales exprimant le récepteur aux androgènes.

Les fibroblastes, impliqués principalement dans les phénomènes de sécrétion, expriment en plus des marqueurs spécifiques tels que la Vimentine, la Tenascine C et le Pro-collagène I, alors que les cellules musculaires lisses expriment l' α -actine, la desmine et la calponine

(Figure 15). Ces dernières interviennent dans la contraction des zones glandulaires, entraînant la sécrétion du liquide prostatique lors de l'éjaculation, et participent à la régulation du débit sanguin dans la prostate lorsqu'elles entourent l'endothélium.

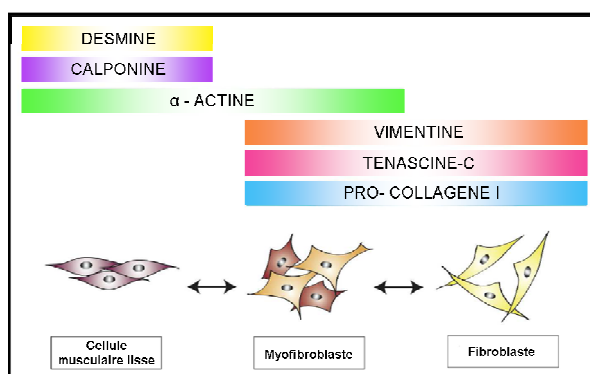


Figure 15 : Expression des marqueurs spécifiques des cellules stromales, d'après (Rowley and Barron, 2012).

Les myofibroblastes, identifiées pour la première fois il y a une trentaine d'années comme des cellules vimentine-positives et desmine-négatives (Gabbiani, *et al.*, 1971), possèdent des caractéristiques communes aux fibroblastes et cellules musculaires lisses (capacité de prolifération, sécrétion et contraction) (Powell, *et al.*, 1999) mais présentent en plus la capacité de suturer des blessures en formant des composants et fibres de la matrice extracellulaire. Ces cellules sont également appelées « Fibroblastes Associés au Cancer » (CAF pour Cancer-Associated Fibroblasts) car elles voient leur nombre augmenter fortement avec l'évolution du cancer prostatique.

Le stroma n'est pas homogène dans sa composition et sa fonction, il semble y avoir des différences régionales selon les zones prostatiques et sa localisation par rapport aux structures épithéliales (acinus ou canal excréteur) (Placencio, *et al.*, 2008, van der Heul-Nieuwenhuijsen, *et al.*, 2006). Le stroma évolue également avec l'âge, les cellules inflammatoires devenant de plus en plus abondantes et les fibroblastes devenant sénescents. Ces fibroblastes sénescents sont moins dépendants des androgènes et seraient capables de stimuler les cellules cancéreuses prostatiques en absence d'androgènes (Bavik, *et al.*, 2006). Il est reconnu depuis de nombreuses années que les cellules stromales et les cellules épithéliales sont capables d'interagir, ce lors du développement embryonnaire mais également à l'âge adulte pour maintenir l'homéostasie du tissu prostatique.

B – Interactions épithélium-stroma

1) Le stroma réactif

Le compartiment stromal évolue en parallèle du tissu épithélial prostatique, et de ce fait possède une plasticité inhérente de manière à répondre rapidement aux problèmes rencontrés

par le tissu glandulaire tels que la réparation d'une blessure ou la rupture de son homéostasie (Rowley and Barron, 2012). Les composants stromaux présents dans le micro-environnement adjacent à l'épithélium réagissent de manière coordonnée lorsque l'épithélium subit un dommage quelconque. Cette réponse rapide et coordonnée semble être destinée à éviter l'infection systémique provoquée par des microorganismes provenant de la lumière des acini. Les altérations phénotypiques et génotypiques associées à cette réponse ont été regroupées sous le terme de « stroma réactif ». Ce stroma altéré présente les mêmes caractéristiques que le tissu de granulation, tissu transitoire riche en vaisseaux qui représente le début d'une organisation conjonctive et qui se forme durant le processus de cicatrisation, capable d'induire un remodelage de la matrice extracellulaire et une modulation de l'expression de facteurs de croissance et de cytokines des cellules fibroblastiques (Desmouliere, *et al.*, 2005, Dvorak, 1986, Gabbiani, 2003).

Lors de cancers épithéliaux, un stroma réactif caractéristique se développe en parallèle et favoriserait les propriétés invasives et métastatiques des cellules épithéliales cancéreuses *via* la sécrétion de facteurs solubles et de protéines de la matrice extracellulaire (Bhowmick, *et al.*, 2004, De Wever and Mareel, 2003, Hu and Polyak, 2008, West and van de Rijn, 2007). Un tel processus semble se mettre en place lors du développement des cancers prostatiques. Ainsi, les interactions établies entre les cellules épithéliales et stromales permettent la progression du cancer (Grossfeld, *et al.*, 1998).

Le stroma réactif des cancers prostatiques est ainsi associé à une forte augmentation du nombre de myofibroblastes et de fibroblastes, à une plus grande densité de capillaires et à une production de collagène de type I mature et d'autres composants de la matrice extracellulaire. En effet, il a été observé que dans les cancers prostatiques de score de Gleason 3, le stroma réactif se compose de 50% de fibroblastes et de 50% de myofibroblastes, alors que le stroma d'un PCa de score 4 est constitué principalement de myofibroblastes (Tuxhorn, *et al.*, 2001, Tuxhorn, *et al.*, 2002). Ces observations concordent donc avec la capacité des myofibroblastes à favoriser la progression tumorale, *via* leur activité pro-proliférative (sécrétion de facteurs de croissance qui favorisent la prolifération des cellules épithéliales et endothéliales) et réparatrice. L'apparition d'un nombre plus important de myofibroblastes, et donc le développement du stroma réactif, serait provoquée par la transformation des fibroblastes en myofibroblastes sous le contrôle du TGF- β sécrété par les cellules épithéliales (Franco, *et al.*, 2011, Ishii, *et al.*, 2011). Les myofibroblastes du stroma réactif sont en retour capables d'induire l'expression de facteurs de transcription tels que HIF1- α (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha) et de sécréter de nombreux facteurs : TGF- β , HGF, EGF, FGF-2, FGF-7, SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1), VEGF, IGF-1 et le collagène I (Josson, *et al.*, 2010, Micke and Ostman, 2004, Orr, *et al.*, 2012, Pollak, *et al.*, 1998). Ces sécrétions

confèreraient un caractère invasif et migratoire aux cellules épithéliales cancéreuses adjacentes et permettraient également la prolifération des cellules endothéliales participant ainsi au phénomène d'angiogénèse.

L'activation du stroma va entraîner également une modification de la biologie de l'épithélium adjacent, conduisant à la formation d'un tissu de granulation et au remodelage tissulaire prostatique. Ces modifications s'observent suite à une sécrétion de composants de la matrice extracellulaire et de facteurs de croissance (Rowley and Barron, 2012). Ces changements s'opèrent dès l'apparition des lésions précancéreuses de type PIN, où on observe une surexpression de collagènes et d'IL-8 (Interleukin 8) accompagnée d'une augmentation de l'expression et du dépôt de la Ténascine C, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire connue pour être associée aux cancers (Schauer, *et al.*, 2008, Schauer and Rowley, 2011). Tamaoki et collaborateurs ont par ailleurs montré que la Ténascine C avait un rôle régulateur des myofibroblastes dans le processus de cicatrisation et dans le développement du stroma réactif, en induisant leur différenciation (Tamaoki, *et al.*, 2005). La surexpression de Ténascine C observée dans le stroma réactif semblerait être sous le contrôle de facteurs de croissance : le TGF- β sécrété par les fibroblastes et le PDGF sécrété par les cellules musculaires lisses (Chiquet, *et al.*, 2004). Une étude réalisée chez le cancer du sein a également montré un effet synergique du TGF- β et de la Ténascine C sur le processus migratoire des cellules épithéliales cancéreuses *via* la stimulation de l'expression de la métalloprotéinase 9 (MMP-9) (Ilunga, *et al.*, 2004). En effet, la MMP-9, en dégradant les composants de la matrice extracellulaire, ouvre la voie au déplacement des cellules épithéliales cancéreuses. Enfin, la Ténascine C est également connue pour interagir avec d'autres protéines de la matrice impliquées dans l'adhésion cellulaire, comme par exemple la fibronectine ou les récepteurs d'intégrines, régulant ainsi la prolifération et la migration cellulaires (Ingham, *et al.*, 2004).

2) La transition épithélio-mésenchymateuse

De récentes études ont montré que les cellules épithéliales cancéreuses pouvaient subir des transformations morphologiques accompagnées de l'expression de protéines des cellules mésenchymateuses, phénomène connu sous le nom de transition épithélio-mésenchymateuse (« Epithelial–Mesenchymal Transition », EMT) qui permet à des cellules épithéliales de devenir mobiles et qui a lieu physiologiquement lors d'importantes phases du développement embryonnaire (Guarino, 2007, Huber, *et al.*, 2005, Thiery and Sleeman, 2006). Les cellules épithéliales sont normalement polarisées et étroitement connectées les unes aux autres, ce qui empêche leur motilité. En revanche, les cellules mésenchymateuses n'établissent pas de connexion intercellulaire stable, ce qui leur confère des capacités locomotrices. Lors de

l'EMT, les cellules épithéliales perdent leurs jonctions intercellulaires, acquièrent des caractéristiques mésenchymateuses et deviennent capables de migrer depuis leur tissu d'origine vers le tissu adjacent. Des marqueurs moléculaires de l'EMT ont pu être caractérisés : la diminution d'expression de l'E-cadhérine qui est responsable de la perte d'adhésion cellulaire, l'augmentation d'expression des protéases dégradant la matrice et des protéines liées au mésenchyme telles que la vimentine et la N-cadhérine, la réorganisation du cytosquelette d'actine médiée par des GTPases de type Rho, l'augmentation d'expression et/ou la translocation nucléaire de facteurs de transcription qui sous-tendent le programme génétique spécifique de l'EMT, tels que la β -caténine et les membres des familles Snail et ZEB (Guarino, 2007, Thiery and Sleeman, 2006). D'autres molécules semblent également jouer un rôle important dans l'EMT telles que des protéines associées à la matrice extracellulaire (collagènes, intégrines et protéases dégradant la matrice) et des protéines de voie de transduction à signal oncogénique (Ras, Src et β -caténine), en permettant le contact direct des cellules épithéliales cancéreuses avec le microenvironnement stromal et ainsi l'initiation de l'EMT (Guarino, 1995, Shintani, *et al.*, 2006). L'activation des voies Ras, Src ou de la β -caténine et l'altération de la balance en GTPases de type Rho pourrait fournir les signaux supplémentaires nécessaires à la totale dissociation cellulaire et à l'induction du remodelage du cytosquelette requis pour la motilité des cellules. Les cellules épithéliales cancéreuses ainsi libérées, n'ont plus de contact avec leurs voisines et sont ainsi compétentes pour la locomotion, et peuvent par conséquent quitter l'épithélium pour se diriger vers le stroma et les capillaires sanguins environnants pour atteindre d'autres tissus de l'organisme.

Le stroma réactif pouvant contribuer à la progression du cancer prostatique, l'étude de la modulation des interactions stroma-épithélium pourrait s'avérer intéressante pour la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer prostatique. Dans un tel contexte, identifier les facteurs pouvant moduler ces interactions s'avère donc crucial.

III - Les Perturbateurs Endocriniens

A – Caractéristiques des Perturbateurs Endocriniens

1) Définition

En 1991, un congrès de la WWF (World Wildlife Federation) se tenait à Wingspread aux Etats-Unis et réunissait un panel d'experts scientifiques mené par le Dr. Colborn qui exposa pour la première fois l'existence de composés introduits dans l'environnement par l'homme et capables de perturber le système endocrine de l'homme et de la faune sauvage (Colborn and Clement, 1992). Un certain nombre de substances naturelles ou synthétiques (xénobiotiques) se trouvant dans l'environnement ont depuis été décrites comme des agents qui interfèrent avec les fonctions du système endocrine par des mécanismes multiples et sont appelées « Perturbateurs Endocriniens » (PE). Elles sont définies comme des substances ou mélanges exogènes qui affectent les fonctions du système endocrinien (interférence avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones endogènes) et induisent des effets nocifs sur la santé d'un organisme, de sa descendance ou de sous-populations (définition adoptée par l'Union Européenne en 1999).

Le groupe de molécules identifiées comme perturbateurs endocriniens est hautement hétérogène et inclue des composés chimiques synthétiques utilisés comme solvants/lubrifiants et leurs dérivés (Biphényles polychlorinés, PCBs, et dioxine), plastiques (phthalates) ou plastifiants (Bisphénol A, BPA, et nonyphénol), pesticides (méthoxychlore, dichlorodiphényltrichloroéthane, DDT), fongicides (vinclozoline), conservateurs (parabens), antibactériens (Triclosan, Triclocarban), agents pharmaceutiques (diéthylstilbestrol, DES) et métaux lourds, mais également des composés naturels comme les phyto-œstrogènes (génisteine et coumestrol). Ces substances sont diverses et ne semblent pas partager de structure similaire autre qu'être des composés de petits poids moléculaires (>1000 Daltons) (Diamanti-Kandarakis, *et al.*, 2009). Elles ont aussi souvent un noyau phénolique dont la fonction serait d'imiter les hormones stéroïdes naturelles et de conférer la capacité aux PE d'interagir avec leur récepteur comme analogues ou antagonistes. Ainsi, les PE sont en général classés selon leur activité agoniste ou antagoniste d'une hormone stéroïdienne (œstrogène, androgène) bien qu'il soit possible pour un même PE d'avoir des activités stéroïdiennes mixtes, comme par exemple être à la fois œstrogénique et antiandrogénique, ce qui est le cas du pesticide méthoxychlore (Diamanti-Kandarakis, *et al.*, 2009). Par ailleurs, de nombreux organes sont sous la dépendance des hormones stéroïdiennes et sont donc susceptibles d'être vulnérables à la perturbation endocrinienne (Figure 16).

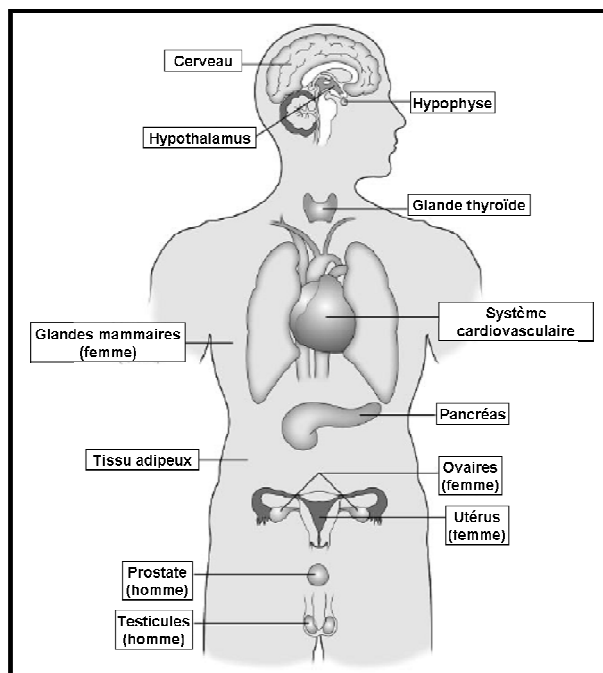


Figure 16 : Les différentes cibles des perturbateurs endocriniens dans le système endocrine, d'après (Diamanti-Kandarakis, *et al.*, 2009).

2) Voie d'exposition

Les sources d'exposition aux PE sont diverses et varient fortement d'un pays à l'autre, et cette situation évolue constamment du fait de l'interdiction, ancienne ou récente, de certains de ces composés. Les régions industrialisées sont plus particulièrement touchées par la contamination de ces composés chimiques qui peuvent s'accumuler dans les sols et les nappes phréatiques. Ils forment alors des mélanges complexes qui entrent dans la chaîne alimentaire, et l'exposition aux PE a lieu par l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminée, par la respiration d'air contaminé ou par contact de sols ou de matières contaminées (Diamanti-Kandarakis, *et al.*, 2009). Certaines professions (personnes travaillant avec des pesticides, fongicides ou composés chimiques industriels) favorisent également l'exposition aux PE et présentent un risque accru de développer une anomalie du système reproducteur ou endocrine.

En raison de leur utilisation industrielle, certains PE ont été conçus de manière à avoir la plus longue durée de vie possible, ce qui s'est avéré par la suite être préjudiciable pour la faune et l'homme. Ces substances ne se désintégrant pas facilement, elles ne peuvent être métabolisées ou alors elles sont métabolisées ou décomposées en substances plus toxiques que les molécules mères. Ainsi, même des substances qui avaient été interdites des décennies auparavant restent présentes à des niveaux élevés dans l'environnement et peuvent encore être détectées dans l'organisme humain (Gore, 2007). Les autres composés dont la demi-vie n'est pas aussi longue ont une utilisation tellement répandue que l'homme y est sans cesse exposé. De ce fait, l'inquiétude concernant les PE est actuellement amplifiée par deux facteurs : l'augmentation de la production de ces produits chimiques, qui maintenant atteint de manière

globale 400 millions de tonnes dans le monde entier, et l'augmentation de la pollution par ces molécules, rendant virtuellement impossible aujourd'hui d'éviter leur contact dans notre vie courante. Par conséquent, l'impact sur la santé humaine à travers les effets connus ou inconnus de ces composés chimiques sur le système endocrine est important.

3) Mécanismes d'action

Il a été montré que les perturbateurs endocriniens pouvaient exercer leurs effets *via* une large variété de mécanismes, un même facteur environnemental pouvant utiliser plusieurs de ces mécanismes :

- **Par l'activation directe du récepteur nucléaire classique de l'hormone endogène.** Le récepteur classique peut-être muté ou non, la mutation favorisant alors la fixation d'une plus large gamme d'agonistes. Le PE, une fois fixé sur le récepteur, va entraîner un changement de conformation de celui-ci qui peut-être différent du changement de conformation induit par la fixation de l'hormone endogène. Une telle différence est souvent à l'origine d'une fonction et d'une activité régulatrice de l'expression des gènes différentes, le récepteur lié au xénobiotique n'ayant pas la même influence que le récepteur lié à l'hormone endogène (Watanabe, *et al.*, 2003, Wu, *et al.*, 2008).

- **Par l'activation directe de récepteur stéroïdien membranaire.** Les hormones stéroïdiennes sont capables d'induire des effets non génomiques rapides, basés sur leur fixation à des récepteurs membranaires et induisant des voies de signalisation activées par des seconds messagers. Certains PE, notamment les xéno-œstrogènes nonylphénol, génisteine, Bisphénol A, coumestrol et diéthylstilbestrol, seraient également capables d'induire ces voies non génomiques, par l'activation des récepteurs membranaires à l'œstrogène comme le mER α , mER β ou le GPR30 (Thomas and Dong, 2006, Wozniak, *et al.*, 2005).

- **Par des interactions cytoplasmiques.** Les effets non génomiques d'une hormone stéroïdienne peuvent également passer par sa fixation au récepteur classique cytosolique et à l'interaction du complexe hormone-récepteur avec des protéines des voies de transduction comme celle des MAPK. Les perturbateurs endocriniens tels que le BPA, les nonylphénols, octylphénols, endosulfane et képone seraient capables d'en faire de même (Li, *et al.*, 2006).

- **Par changement de la méthylation de l'ADN ou par modification des Histones.** Des modifications épigénétiques telles que des changements de la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones ont été observées suite à une exposition aux PE durant le développement embryonnaire ou la période post-natale et semblent associées au risque accru de développer une maladie ou à un problème de fertilité (Anway, *et al.*, 2005, Ho, *et al.*, 2006). Ces modifications épigénétiques pourraient être en partie responsables du caractère transgénérationnel des effets des perturbateurs endocriniens.

- **Par induction d'instabilité génomique.** Il a ainsi été récemment montré que le composé BPA pouvait entraîner de l'instabilité génomique (formation de micro-noyaux) par interférence avec la formation du fuseau mitotique dans les cellules cancéreuses mammaires (Kabil, *et al.*, 2008).

- **Par interférence avec le rétrocontrôle de la régulation hormonale et les cellules neuroendocrines.** Les perturbateurs endocriniens peuvent également moduler la production des hormones stéroïdes endogènes par un rétrocontrôle positif ou négatif selon le stade de développement auquel se produit ce phénomène (Diamanti-Kandarakis, *et al.*, 2009). Ils peuvent aussi interférer avec l'homéostasie neuroendocrine, comme par exemple en perturbant l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien ou en modulant le taux de GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) sécrétée par les neurones hypothalamiques (Gore, 2010).

- **Par interférence avec le métabolisme des hormones.** De nombreuses études ont rapporté l'interférence de xéno-œstrogènes avec la synthèse des hormones stéroïdiennes, et ce notamment par l'inhibition des enzymes responsables de la stéroïdogénèse comme des déshydrogénases, une aromatasase, des sulfotransférases ou des sulfatases (Whitehead and Rice, 2006). D'autres mécanismes modulant le taux ou l'effet des hormones endogènes ont été également observé, comme l'induction d'une excrétion biliaire accrue de l'hormone ou encore une compétition pour le site de fixation du récepteur de l'hormone (De Coster and van Larebeke, 2012).

4) Caractéristiques atypiques

a. Dynamique de dose-réponse inhabituelle

Il a souvent été observé que les PE avaient des effets bien plus importants pour de très faibles doses, suivant une évolution biphasique : ces effets ont été caractérisés par des courbes dose-réponse en forme de U ou de U inversé (Figure 17) (Vandenberg, *et al.*, 2009, vom Saal, *et al.*, 2007). Ce concept, reconnu depuis longtemps pour les hormones et des neurotransmetteurs, a tout d'abord été sujet à controverse concernant les PE mais il est maintenant admis que ces composés chimiques sont pour la plupart 1000 fois plus puissants que les hormones endogènes et les doses auxquelles est exposé l'homme suffisent à induire des effets nocifs sur sa santé (De Coster and van Larebeke, 2012).

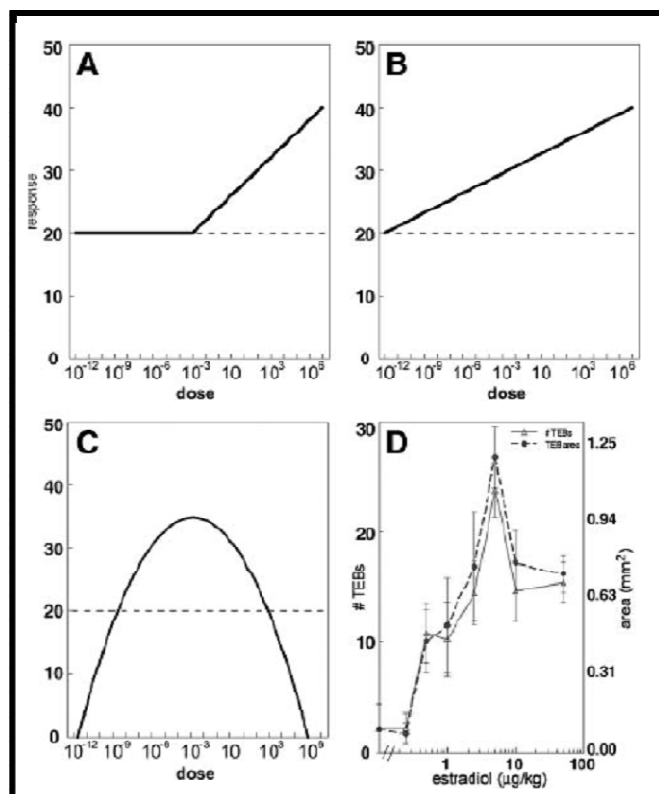


Figure 17 : Courbes dose-réponse classiques de type linéaire avec seuil (c'est à dire pas d'effet observé tant qu'une dose seuil n'ait été atteinte) (A), et sans seuil (B), et courbe dose-réponse non monotone (où une augmentation de dose n'entraîne pas forcément une augmentation de l'effet) (C) avec un exemple observé pour l'œstradiol (D) (Vandenberg, *et al.*, 2009).

b. Latence des effets des PE

De nombreuses études ont mis en évidence le lien entre une exposition à un facteur environnemental durant le développement et le risque accru de développer une maladie à l'âge adulte, il y aurait donc un décalage entre le moment de l'exposition et la manifestation de l'anomalie engendrée. Récemment il a par exemple été montré que les PE pouvaient entraîner des modifications génétiques ou épigénétiques durant le développement, modifications qui favoriseraient à l'âge adulte l'apparition de la maladie suite à une nouvelle exposition au PE. C'est le cas du BPA et du cancer de la prostate (Ho, *et al.*, 2006, Prins, *et al.*, 2008). Les raisons de cette sensibilité accrue au PE durant le développement est certainement due à l'absence des mécanismes de protection (mécanisme de réparation de l'ADN, système immunitaire compétent, enzymes détoxifiantes, métabolisme du foie,...) qui sont présents chez l'adulte mais pas encore fonctionnels chez le fœtus ou le nouveau-né (Schug, *et al.*, 2011). L'enfance et l'adolescence sont aussi marquées par la maturation continue des principaux systèmes endocriniens et sont de ce fait sensibles à l'exposition aux produits chimiques. Les effets délétères des PE varient ainsi selon l'âge auquel est exposé un organisme, la période critique d'exposition appelée « fenêtre de susceptibilité » différant selon le moment où se produisent les événements clés du développement dans chaque tissu.

En effet, chaque organe a une trajectoire de développement différente et sa fenêtre de susceptibilité va donc dépendre de cette trajectoire.

c. Effets combinés

Dans l'environnement, les PE sont rarement isolés les uns des autres et il est fort probable que l'on soit exposé simultanément à différentes classes de PE : ils peuvent alors avoir des effets additifs voir même synergiques. En effet, récemment Correia *et al.*, ont montré que l'exposition combinée à plusieurs xéno-œstrogènes à des concentrations identiques induit un effet en accord avec les prédictions faites par rapport au modèle d'ajout de concentration, suggérant une action additive de ces composés (Correia, *et al.*, 2007). D'autres études ont mis en évidence un processus plus complexe, suite à l'exposition simultanée de cellules hypophysaires à un xéno-œstrogène (éthylphénol, octylphénol, propylphénol, nonylphénol ou BPA) et à des œstrogènes endogènes. Ces composés sont capables à eux-seuls d'entraîner l'activation de la voie MAPK (phosphorylation des protéines ERK) et un effet synergique ou antagoniste de cette activation peut être observé lors d'expositions combinées selon la dose administrée du xénobiotique (Jeng and Watson, 2011, Kochukov, *et al.*, 2009). De manière intéressante, l'exposition combinée du xéno-œstrogène DDT et d'un agent pharmaceutique (fadrozole) ou d'un inhibiteur d'aromatase environnemental (tributyltine) aux actions antagonistes n'a pas suffi à bloquer les effets néfastes du DDT sur le poisson Medaka, suggérant que l'exposition simultanée à des PE à activités normalement antagonistes ne diminue pas nécessairement les effets nocifs de ceux-ci (Kuhl and Brouwer, 2006).

5) Pathologies associées à l'exposition aux PE

Les PE semblent être impliqués dans le développement de certaines maladies, certaines études épidémiologiques ayant mis en évidence une corrélation entre l'apparition et l'augmentation des PE dans l'environnement et l'incidence plus importante de ces maladies (De Coster and van Larebeke, 2012). Ainsi, depuis les 50 dernières années on constate une augmentation de l'incidence et de la prévalence des cancers du sein, de la prostate et des testicules, de l'obésité, du diabète et de troubles de la reproduction (malformations du système reproducteur, altérations de la fertilité), maladies ayant été associées à des PE. Des différences géographiques notables appuient ces données, les habitants des pays les plus industrialisés ayant le plus grand risque de développer des cancers hormono-dépendants (De Coster and van Larebeke, 2012). Une récente étude a mis en évidence l'implication de certains PE dans l'étiologie des cancers du sein, des poumons, du cerveau, du système reproducteur, des reins et du pancréas : des hydrocarbures polycycliques aromatiques, des

pesticides, des PCBs, le DDT, certains médicaments anti-épileptiques, des fongicides, des phyto-œstrogènes, des mycotoxines, le BPA, des phthalates, des alkylphénols et des métallo-œstrogènes (comme le sel d'aluminium) sembleraient être des molécules clés de la cancérogénèse des organes précédemment cités.

L'exemple le plus marquant est celui du cancer du sein où on dénombre aujourd'hui jusqu'à 160 xéno-œstrogènes potentiellement impliqués dans son développement (Brody and Rudel, 2003, Brody, *et al.*, 2007). Ce constat s'explique en partie par le fait que les femmes sont de grandes consommatrices de produits cosmétiques et hygiéniques, produits qui sont connus pour être des sources significatives en perturbateurs endocriniens tels que les sels d'aluminium, les parabens, les phthalates, l'extrait d'Aloe Vera ou encore le musc (Darbre, 2006). Certains d'entre eux ont d'ailleurs été mis en cause dans des études *in vivo* où un risque accru de développer des cancers mammaires été observés chez les animaux exposés à ces substances durant leur développement (Birnbaum and Fenton, 2003, Harvey, 2005, Nesaretnam, *et al.*, 1998). Concernant la prostate, de nombreuses études ont mis en évidence l'implication du BPA autant au niveau de l'induction de la cancérogénèse que de la progression du cancer (Ho, *et al.*, 2006, Prins, *et al.*, 2008, Wetherill, *et al.*, 2002, Wetherill, *et al.*, 2006).

Bien que plusieurs études montrent l'implication du BPA dans le développement du cancer prostatique, il est fort probable que d'autres PE y jouent un rôle également, à l'image de ce qui est observé pour le cancer du sein. Nous nous sommes donc intéressés au BPA et à une autre classe de PE, les antimicrobiens Triclosan et Triclocarban, et leurs effets sur la cancérogénèse prostatique.

B - Le Bisphénol A

1) Identité et propriétés physicochimiques

Le plastifiant Bisphénol A (BPA; 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane) est un petit composé phénolique lipophile de 228 Da (Figure 17) qui a été synthétisé pour la première fois en 1891 par A.P. Dianin. Il se présente sous forme de paillettes blanches, quasi inodore, peu soluble dans l'eau mais soluble dans les solutions aqueuses alcalines et dans certains solvants et présente une faible volatilité. Une fois polymérisé par des liaisons ester, il forme le plastique de type polycarbonate. Cependant, une hydrolyse des liaisons ester, et donc un relargage de molécules de BPA, se produit en conditions normales et peut s'accélérer suite à l'exposition du polycarbonate à de fortes températures, à des conditions acides ou alcalines, à des micro-ondes, ou encore par des lavages répétés du plastique (Figure 17) (Welshons, *et al.*,

2006). Ces conditions sont malheureusement courantes lors de l'utilisation de plastiques alimentaires contenant du BPA.

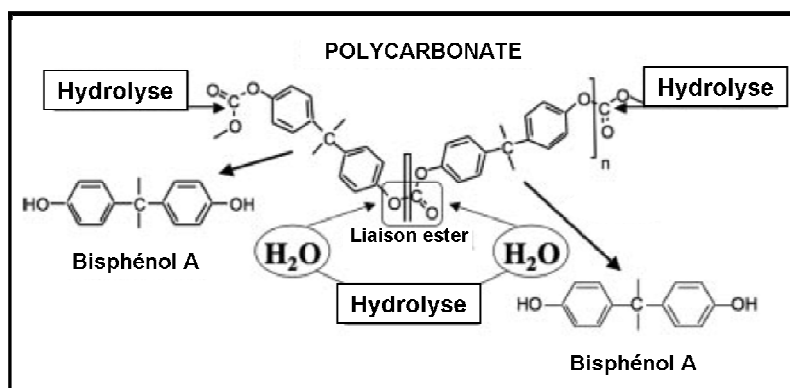


Figure 17 : Structure chimique du BPA et de son polymère, le Polycarbonate, d'après (Welshons, *et al.*, 2006).

Le BPA est un composé chimique pseudo-persistant : il est rapidement dégradé dans les eaux de surfaces et les sols, où il est majoritairement converti en 2 métabolites, le 4-hydroxyacétophénone et le 4-hydroxybenzoïque acide. Le BPA présent dans l'eau peut-être également dégradé par photolyse (le composé dissout dans l'eau absorbe directement la lumière du soleil ce qui entraîne une altération photochimique) (Staples, *et al.*, 1998). Le BPA présent dans l'air, qui représenterait moins de 1% du BPA environnemental, est quant à lui rapidement dégradé par photo-oxydation (dégradation du composé via une interaction avec des radicaux libres ou autres molécules oxydantes) (Flint, *et al.*, 2012).

Malgré une courte durée de vie, le BPA reste présent de manière ubiquitaire dans l'environnement du fait d'une libération continue (Oehlmann, *et al.*, 2009). Et il est estimé que les plus grands compartiments de l'environnement du BPA sont abiotiques et associés à l'eau et solides en suspension (53 %), aux sols (25 %) et aux sédiments (23 %) (Flint, *et al.*, 2012).

2) Utilisations et voies d'exposition

Le BPA est l'un des PE le plus produits au monde, avec une production de plus de 3 millions de tonnes constatée en 2003 et de 5,5 millions de tonnes prévue en 2011 (Flint, *et al.*, 2012, Tsai, 2006). Il est utilisé pour produire le plastique de type polycarbonate, identifié par le logo de recyclage n°7 (Figure 18), et les résines époxy (telle que la résine qui protège l'intérieur des canettes métalliques et boîtes de conserve). Il est également utilisé comme additif dans la composition d'autres plastiques tels que le Polyvinyl Chloride (PVC) à usage médical, pour les jouets ou pour les conduites d'eau, et le Polyéthylène Téréphtalate (PET) qui constitue les bouteilles d'eau minérale et de soda (Welshons, *et al.*, 2006). Le BPA a aussi

de nombreuses autres applications : il est ajouté dans de nombreux emballages et ustensiles alimentaires, matériels électroniques (coques plastiques de téléphone portable et d'ordinateur), les CD et DVD, les lunettes et lentilles mais également dans les colles, couronnes, et plombages dentaires. Son utilisation était également très répandue dans les biberons en plastiques, mais suite à la parution d'études mettant en avant les effets nocifs du BPA sur la santé humaine, de nombreux pays dont la France ont interdit cet usage.

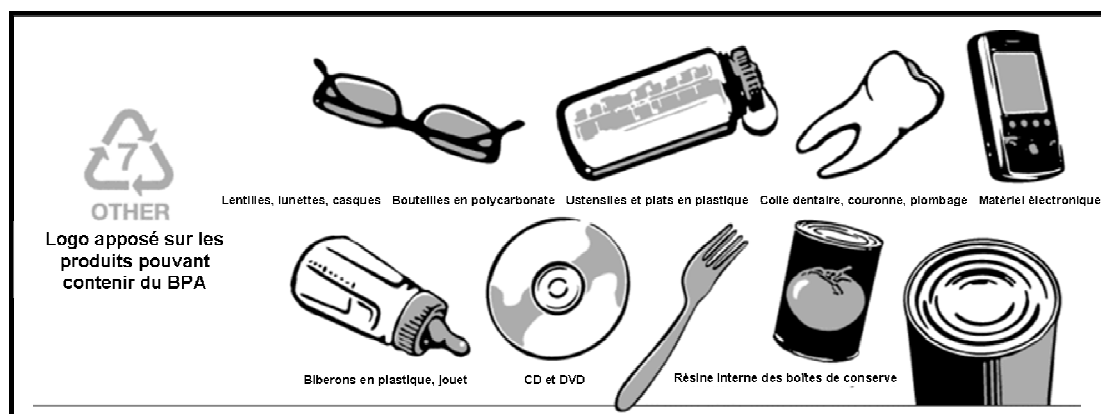


Figure 18 : Utilisation commune du BPA.

Son métabolisme a été très bien caractérisé chez le rat mais est moins bien connu chez l'homme. On sait cependant qu'il peut être absorbé par voie orale, respiratoire ou cutanée. Une étude récente réalisée chez des enfants en bas-âge, dont l'environnement contenait du BPA détectable dans l'air, la nourriture et la boisson, et des serviettes, a montré que 99% de l'exposition au BPA des enfants avait pour origine la nourriture (Wilson, *et al.*, 2007). La voie orale semble donc prédominante, à l'exception peut-être de cas d'exposition liée à l'occupation professionnelle (comme par exemple les personnes travaillant dans la manufacture du BPA ou de plastique polycarbonate).

a. Voie orale

Une fois ingéré, le BPA est rapidement absorbé par les intestins, transformé par glucuronidation au niveau du foie pour être excrété sous forme de BPA-glucuronide (BPA-G), forme dépourvue d'activité hormonale. La glucuronidation est assurée par les UDP-glucuronosyltransférases hépatiques, et plus particulièrement par l'isoforme UGT2B1 (Matsumoto, *et al.*, 2002). Le BPA-G excrété dans la circulation systémique atteint alors les reins, la forme libre du BPA n'étant plus présente qu'à de faibles concentrations, c'est le BPA-G qui est la forme majoritaire (Matthews, *et al.*, 2001). En raison d'une grande solubilité dans l'eau, le BPA-G est ensuite rapidement éliminé avec les urines et donc de l'organisme. Ainsi, les demi-vies plasmatique et urinaire de la forme conjuguée sont respectivement de

1h30 et de 6h. Après ingestion orale chez l'homme, il y a donc une conjugaison et une rapide et quasi-totale élimination du BPA (Volkel, *et al.*, 2005, Volkel, *et al.*, 2008). Récemment, une critique a été soulevée concernant toutes ces études pharmacocinétiques réalisées pour évaluer le métabolisme du BPA : en effet, celles-ci sont basées sur une seule exposition, en aiguë, au BPA alors qu'une exposition chronique aurait été plus à même de refléter la réalité.

b. Voies respiratoire et cutanée

Il n'y a pas d'étude de la toxicocinétique du BPA après exposition par inhalation, cependant au vu de la toxicité induite et de son coefficient de partage élevé, une forte absorption au niveau du tractus respiratoire est attendue. Après exposition cutanée *in vitro* (explants de peau humaine), il a été observé une absorption rapide du BPA à hauteur de 50% du dépôt d'origine, suivie d'une métabolisation en 2 composés majeurs, le BPA-G (73%) et du BPA-monosulfate (27%) (Zalko, *et al.*, 2011).

c. Détection dans l'organisme

De nombreuses études se sont attachées à mesurer la concentration en BPA dans les tissus et fluides humains, en se concentrant spécifiquement sur les personnes qui ont été exposées au BPA dans leur environnement (c'est-à-dire les expositions non professionnelles). Ces études, réalisées sur des milliers d'individus de différents pays, ont détecté de manière quasi systématique le BPA chez les adultes, adolescents et enfants testés, au niveau des urines, du sang, du tissu adipeux, du liquide amniotique ou du lait maternel (pour revue, (Vandenberg, *et al.*, 2012)). Ainsi, le BPA (forme libre et conjuguée) a été détecté dans 85,8% des échantillons urinaires collectés et dans 87,5% des échantillons sanguins, à une concentration moyenne de 4 nM (1 ng/mL). Calafat *et al.* ont par ailleurs montré que les variations de la concentration urinaire en BPA observées chez les individus analysés étaient associées avec l'âge, le sexe, l'ethnicité et la position sociale (Calafat, *et al.*, 2008). D'autres études ont confirmé ces observations : elles ont rapporté un taux de BPA 3 à 10 fois plus important chez les nouveau-nés que chez les adultes (Edginton and Ritter, 2009, Mielke and Gundert-Remy, 2009). Les taux urinaires de BPA détectés ont aussi servis à extrapoler sur l'absorption journalière de BPA pour une personne adulte : il a pu être estimé une absorption quotidienne de BPA à 0,037–0,064 µg/kg de poids corporel/jour pour les hommes et 0,043–0,075 µg/kg de poids corporel/jour pour les femmes (Miyamoto and Kotake, 2006).

Dans le liquide amniotique, le BPA a été aussi détecté dans tous les échantillons testés, à des concentrations allant de 2 à 35 nM, suggérant une transmission du BPA de la mère au fœtus. De même, dans le lait maternel, le BPA était présent dans tous les échantillons analysés avec une concentration moyenne de 4 nM. Quant au tissu adipeux, il a été constaté une

accumulation du BPA libre à une concentration moyenne de 3,16 ng/g dans 55% des tissus analysés et également du BPA chloriné (composé qui se forme quand le BPA est conjugué dans des eaux traitées) dans 88% des échantillons.

Ces différentes observations sont cependant en contradiction avec les études toxicocinétiques de Volkel et collaborateurs qui avaient mis en évidence une rapide élimination du BPA chez l'homme après administration orale (Volkel, *et al.*, 2005, Volkel, *et al.*, 2008). Vu le nombre important d'études détectant du BPA (aussi bien sous sa forme libre que sa forme conjuguée) dans l'organisme humain (plus de 80 études à ce jour), de nombreuses critiques ont été soulevées quant aux travaux de Volkel et collaborateurs notamment quant à la sensibilité de leur mode de détection et au nombre limité de leur groupe d'étude (Vandenberg, *et al.*, 2012). Par ailleurs, comme dit précédemment, leurs études étaient basées sur une seule exposition orale au BPA, ne prenant pas en compte l'effet d'une exposition chronique ni d'autres sources environnementales du BPA.

3) Toxicité

a. Activité hormonale

Le BPA a tout d'abord été considéré comme un faible œstrogène environnemental, ayant une affinité 1000 à 10 000 fois moins importante pour les Récepteur aux Œstrogènes ER α et ER β (ER, Estrogen Receptor) que l'œstradiol (Kuiper, *et al.*, 1998). Cependant de récentes études ont démontré que le BPA pouvait stimuler des réponses cellulaires à de très faibles concentrations, et dans certains cas il aurait même une puissance équivalente à l'œstradiol (Alonso-Magdalena, *et al.*, 2005, Walsh, *et al.*, 2005, Wozniak, *et al.*, 2005). Le BPA est désormais reconnu comme un modulateur sélectif du Récepteur aux Œstrogènes (SERM, Selective ER Modulator) : en tant que tel, il peut interagir avec le domaine de liaison de l'ER, montre une affinité de liaison et une régulation différente pour l'ER α et l'ER β dans les cellules cibles, interagit différemment avec les co-régulateurs transcriptionnels et ne se contente donc pas de mimer les effets de l'œstradiol (Welshons, *et al.*, 2006). Certaines actions du BPA sont également attribuées à sa capacité à se lier aux ER membranaires (mER), classiques et non classiques, ainsi qu'au Récepteur transmembranaire couplé à une protéine G-30 (GPR30) (Thomas and Dong, 2006, Watson, *et al.*, 2005). Sa liaison à ces récepteurs membranaires entrainerait des réponses rapides dans les cellules *via* une signalisation non génomique, comme il a par exemple été montré dans les cellules hypophysaires GH3/B6 où le BPA se fixe au mER et induit un flux calcique responsable d'une sortie de prolactine (Watson, *et al.*, 2007). Le BPA se lie aussi de manière spécifique et avec une très forte affinité sur l'ERR γ (Estrogen Related Receptor gamma), récepteur présent chez l'embryon et

le fœtus, ce qui pourrait expliquer en partie les effets du BPA durant le développement (Okada, *et al.*, 2008).

En plus de son activité œstrogénique, le BPA démontre une capacité à se fixer sur le récepteur de l'hormone thyroïdienne, en agissant comme antagoniste par inhibition de l'activité transcriptionnelle de l'hormone thyroïdienne T3. Heimeier et Shi ont ainsi suggéré que le BPA était capable d'altérer l'embryogénèse et le développement néonatal humain par la perturbation ou l'inhibition de la signalisation de l'hormone thyroïdienne (Heimeier and Shi, 2010).

Le BPA aurait également de fortes propriétés anti-androgéniques dans certains systèmes cellulaires, bien que cela fait encore débat à l'heure actuelle notamment concernant la dose à laquelle apparaîtrait cet effet antagoniste (Vandenberg, *et al.*, 2009). Une fois lié au récepteur aux androgènes, le complexe BPA-AR empêcherait les androgènes endogènes d'exercer leur régulation transcriptionnelle (Wetherill, *et al.*, 2007).

b. Effets nocifs sur la santé

❖ Etudes sur les animaux

Un grand nombre d'études menées sur les animaux a permis de mettre en évidence des effets néfastes du BPA à faible dose, aussi bien sur le développement qu'à l'âge adulte. Il a par exemple été montré que de faibles doses du BPA, administrées durant la gestation de souris, induisait une maturation sexuelle précoce des femelles et une croissance postnatale accrue (Honma, *et al.*, 2002, Nikaido, *et al.*, 2004, Takai, *et al.*, 2001), une altération des taux plasmatiques de l'hormone lutéinisante et de testostérone (Akingbemi, *et al.*, 2004), une augmentation de la taille de la prostate des mâles (Gupta, 2000, Timms, *et al.*, 2005), une diminution de la production de sperme et de la fertilité des mâles (Al-Hiyasat, *et al.*, 2002, Sakaue, *et al.*, 2001), une stimulation du développement de la glande mammaire des femelles (Markey, *et al.*, 2001), une augmentation de la mortalité des embryons (Al-Hiyasat, *et al.*, 2004), une perturbation des cycles œstrogéniques à l'âge adulte (Nikaido, *et al.*, 2004), une fonction immune altérée (Sawai, *et al.*, 2003, Yoshino, *et al.*, 2003, Yoshino, *et al.*, 2004), une diminution des enzymes anti-oxydantes (Chitra, *et al.*, 2003), des variations d'expression des récepteurs à la progestérone, aux œstrogènes (ER β) et à la somatostatine au niveau du cerveau (Facciolo, *et al.*, 2002, Funabashi, *et al.*, 2003, Ramos, *et al.*, 2003) et des changements comportementaux comme l'apparition d'hyperactivité ou d'agressivité (Farabollini, *et al.*, 2002, Ishido, *et al.*, 2004).

A l'âge adulte, il a été montré que de faibles doses de BPA (10 à 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) pouvaient aussi induire une rapide diminution du taux de glucose et augmentation du taux d'insuline plasmatique chez des souris mâles, les souris développant une hyperinsulémie chronique

après 4 jours de traitement (Alonso-Magdalena, *et al.*, 2006, Alonso-Magdalena, *et al.*, 2010). Dans d'autres tissus, seule une dose plus importante de BPA (5 mg/kg) était capable d'induire un effet, comme par exemple dans l'utérus de souris femelle ovariectomisée où une augmentation de la taille des cellules épithéliales pouvait s'observer (Markey, *et al.*, 2005).

Par ailleurs, des travaux récents montrent qu'une exposition chronique au BPA de rats adultes était inductrice de tumeurs testiculaires et de fibroadénomes, une tumeur bénigne de la glande mammaire (Keri, *et al.*, 2007). Concernant la cancérogenèse prostatique, des études suggèrent qu'une exposition intra-utérine ou post-natale de souris mâles au BPA peut les prédisposer au cancer de la prostate à l'âge adulte (Ho, *et al.*, 2006, Prins, *et al.*, 2008). Ces travaux utilisant des rats brièvement exposés au BPA (10 mg/kg/jr) durant leur période néonatale ont montré une augmentation significative de l'incidence des lésions précancéreuses de type PIN suite à une exposition aux œstrogènes à l'âge adulte. Ce modèle animal de susceptibilité à la cancérogenèse prostatique est pertinent pour l'homme car il est connu que les taux d'œstradiol augmentent chez l'homme avec l'âge ce qui contribue au risque de développer le cancer prostatique (Kaufman and Vermeulen, 2005). Ces études ont également montré que les prostates exposées au BPA possédaient des altérations du profil de méthylation de l'ADN de nombreux gènes de signalisation cellulaire, suggérant que des doses environnementalement pertinentes du BPA soient capables « d'imprimer » la prostate en développement à travers des modifications épigénétiques (Ho, *et al.*, 2006, Prins, *et al.*, 2008). Il a été aussi observé que le BPA permettait d'accélérer la croissance de tumeurs prostatiques après l'ablation androgénique chez l'animal et d'induire l'expression de PSA, normalement sous contrôle des androgènes (Wetherill, *et al.*, 2006).

❖ Etudes sur l'homme

Depuis les quinze dernières années, un nombre important d'études a été réalisé concernant l'exposition humaine au BPA, ces études cliniques et épidémiologiques ayant permis de mettre en évidence une corrélation entre le BPA et des effets observés sur le système reproducteur humain, les cancers du sein et de la prostate, la thyroïde et des syndromes métaboliques comme l'obésité (Vandenberg, *et al.*, 2010).

Il a par exemple été montré que le BPA induisait une résistance à l'insuline dans les cellules pancréatiques β et une inhibition de la sécrétion d'adiponectine dans le tissu adipeux associées au développement du diabète de type 2 (Alonso-Magdalena, *et al.*, 2010). Une exposition au BPA semblerait également être corrélée avec l'apparition de maladies cardiovasculaires et d'altérations des enzymes hépatiques (Lang, *et al.*, 2008, Melzer, *et al.*, 2010). Chez les femmes ont été constatées des fausses-couches plus récurrentes et une hausse des naissances prématurées, ainsi qu'une inflammation et un stress oxydatif plus importants

pour les femmes en ménopause (Cantonwine, *et al.*, 2010, Sugiura-Ogasawara, *et al.*, 2005, Yang, *et al.*, 2009b). Une réduction de la qualité du sperme a été observée chez les hommes (Meeker, *et al.*, 2010). Ces données révèlent donc une association entre une exposition au BPA et des anomalies constatées chez l'adulte, mais elles ne peuvent pas prouver un lien de cause à effet.

Des données développementales ont également pu être obtenues, l'exposition prénatale au BPA ayant été évaluée à partir de mesure du taux de BPA maternel : il a ainsi été montré une association entre l'exposition prénatale et une augmentation de l'agressivité et une hyperactivité chez les enfants âgés de 2 ans, principalement chez les filles, de manière similaire à ce qui était observé dans les études sur les rongeurs (Braun, *et al.*, 2009).

D'autres effets du BPA ont pu être mis en évidence notamment sa capacité à agir sur les cellules cancéreuses humaines contribuant ainsi à la progression des cancers. En effet, des études récentes montrent que le plastifiant serait capable d'induire la progression dans le cycle et de favoriser la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et ovariennes, notamment par l'activation de l'ER (Park, *et al.*, 2009b, Samuelsen, *et al.*, 2001). Wetherill et al. ont également montré l'influence du BPA sur les cellules cancéreuses prostatiques humaines présentant un AR muté (AR-T887A) qui est fréquemment retrouvé dans les cancers avancés de patients ayant fait une rechute après thérapie par privation androgénique. En effet, ils ont observé que des doses pertinentes du BPA (1 nM) pouvaient activer l'AR-T877A et induire de ce fait la progression dans le cycle et la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques cultivées dans les conditions de privation androgénique (Wetherill, *et al.*, 2002). Par la suite, l'impact du BPA fut testé sur la croissance et la récurrence des tumeurs prostatiques en utilisant un modèle de xénogreffe des cellules cancéreuses présentant l'AR-T887A chez des souris soumises à une privation androgénique : une augmentation de la taille des tumeurs prostatiques et une sécrétion de PSA plus élevée furent constatées les animaux exposés aux BPA (Wetherill, *et al.*, 2006). L'exposition au BPA, qui serait un agoniste de l'AR muté dans les cancers prostatiques, pourrait ainsi réduire potentiellement l'efficacité thérapeutique et faciliter l'échappement hormonal lors des thérapies hormonales des cancers prostatiques (Wetherill, *et al.*, 2002, Wetherill, *et al.*, 2005, Wetherill, *et al.*, 2006).

C - Le Triclosan

1) Identité et propriétés physicochimiques

L'agent antimicrobien Triclosan (TCS; 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxyphényléther ou encore 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol; Irgasan[®], ou Irgacare MP) est un composé phénolique lipophile halogéné (Figure 19) qui a été synthétisé pour la première fois en 1965 par Ciba-Geigy Co. (Basel, Suisse). Il se présente sous une forme de poudre blanche inodore

et cristalline, pratiquement insoluble dans l'eau, mais soluble dans la plupart des solvants organiques non polaires (Bhargava and Leonard, 1996).

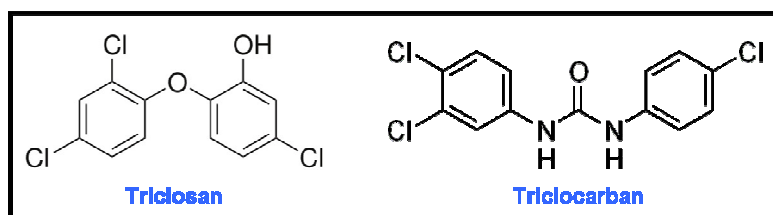


Figure 19 : Structure chimique du TCS et du triclocarban.

Le TCS est un germinicide bactériostatique à large spectre et est structurellement similaire aux Biphényles Polychlorinés *ortho*-substitués non coplanaires (Ahn, *et al.*, 2008, Bhargava and Leonard, 1996). Il est efficace contre de nombreuses bactéries et certains types de champignons, s'attaquant à des cibles cytoplasmiques et membranaires (comme les acteurs de la synthèse d'ARN ou de la production de macromolécules) (Russell, 2004). Bien que hydrologiquement stable dans un environnement aquatique, le triclosan est sujet à la photolyse avec une demi-vie estimée à moins d'une heure en lumière naturelle (Lindstrom, *et al.*, 2002, Sabaliunas, *et al.*, 2003). Sa dégradation par la lumière dans les eaux de surface conduit à la formation de dioxine et de produits polychlorinés, alors que sa biodégradation conduit principalement à la formation de méthyltriclosan mais aussi de chloroforme et d'autres composés chlorinés (Bester, 2005, Latch, *et al.*, 2005). Le TCS et ses produits de dégradation sont retrouvés aussi bien dans les eaux usées (95% des produits contenant du TCS sont rejetés dans les conduites d'eau résidentielles) que dans les sols (Thompson, *et al.*, 2005).

2) Utilisations et voies d'exposition

Depuis une trentaine d'années, le TCS est ajouté communément dans les produits d'hygiène personnelle (dentifrices, déodorants, gels douches, savons,...), les produits cosmétiques, les produits d'entretien (liquides vaisselles, savons pour les sols...), certains textiles, plastiques et matériels médicaux et dans de nombreux autres produits ménagers et de la vie courante (Ahn, *et al.*, 2008, Daughton and Ternes, 1999). Récemment, il a été également ajouté aux fils de suture utilisés en chirurgie, pour éviter l'infection bactérienne du site opératoire. En Europe, il en est produit de 10 à 1000 tonnes chaque année pour ces diverses applications commerciales. Le TCS est actuellement l'antibiotique le plus utilisé dans les savons liquides (Perencevich, *et al.*, 2001), et avec son usage également répandu dans les dentifrices et les déodorants, cela semble constituer les sources principales d'exposition

pour l'homme (Allmyr, *et al.*, 2006). Le TCS est ainsi absorbé par l'homme selon deux voies principales : à travers l'épiderme et le tractus gastrointestinal (Dann and Hontela, 2011).

a. Voie orale

Après absorption orale, le TCS est rapidement absorbé par le tractus gastrointestinal où il est principalement métabolisé par hydroxylation avec scission de la liaison éther (Tulp, *et al.*, 1979). La concentration plasmatique en TCS augmente rapidement après son absorption, atteignant un pic dans les 1 à 3 heures suivantes et ayant au final une $\frac{1}{2}$ vie plasmatique de 21 h (Lin, 2000). On trouve dans le sang à la fois le TCS sous forme conjuguée (glucuronée ou sulfonée) et non conjuguée. Le TCS est à la fois excrété dans les urines et les matières fécales, sa $\frac{1}{2}$ vie dans les urines atteint 11 h, l'antibactérien étant éliminé totalement au bout de 24 h et ne s'accumulant pas dans le corps (Dann and Hontela, 2011).

b. Voie cutanée

La pénétration par voie dermique est également rapide, une partie du TCS semblant même être directement métabolisée à la surface de la peau. Une étude chez l'animal a montré qu'après absorption à travers la peau, le TCS était largement distribué dans tout l'organisme, les concentrations tissulaires atteignant un pic dans les 12 à 18h suivant l'exposition, où il était retrouvé dans la vésicule biliaire, le foie, les poumons, le tissu adipeux et le sang (Kanetoshi, *et al.*, 1992). Queckenberg *et al.* ont évalué la toxicocinétique du TCS chez l'homme après administration dermique : le TCS absorbé fut entièrement éliminé dans les urines après 24h, sa demi-vie étant de 10,8h (Queckenberg, *et al.*, 2010). La toxicocinétique du TCS semble donc être la même que ce soit pour une exposition orale ou dermique.

c. Détection dans l'organisme

Le TCS a été ainsi détecté dans le lait maternel à une concentration de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de lipides (Dayan, 2007) et dans le plasma sanguin à des concentrations allant de 0,1 μM à 13 μM (Allmyr, *et al.*, 2006, Gee, *et al.*, 2008). On peut estimer l'exposition journalière du tissu mammaire à cet antibiotique à 5,5 μM (pour une application journalière d'une lotion corporelle contenant 0.3% de TCS) (Gee, *et al.*, 2008). Son élimination/persistance dans ce tissu n'est pas encore connue. Dans des études récentes, le TCS a été également détecté au niveau des urines : dans 75% des échantillons urinaires analysés, à une concentration moyenne de 45 nM aux Etats-Unis (Calafat, *et al.*, 2008) et à une concentration moyenne de 9 nM en Belgique (Pirard, *et al.*, 2012). Une étude menée en Corée du Sud a même trouvé du TCS dans 93% des échantillons urinaires analysés (à une concentration moyenne de 5 nM),

constatant des variations de concentration urinaire en TCS liées à des facteurs géographiques et à des comportements tels que la consommation de tabac (Kim, *et al.*, 2011).

3) Toxicité

a. Activité hormonale

Le mode d'action du TCS en tant que Perturbateur Endocrinien est très controversé, certaines études indiquant une action de nature oestrogénique ou faiblement androgénique alors que d'autres soutiennent une action anti-androgénique. Il a été ainsi montré chez l'alevin du poisson japonais medaka qu'une exposition de 14 jours au TCS (dose de 100, 10 ou 1 mg/L) induisait un faible effet androgénique (Foran, *et al.*, 2000). Par la suite une étude menée sur le même modèle animal à des stades précoces de sa vie a montré que le TCS (à des concentrations allant de 10 à 140 µg/L) était fortement toxique et que ses métabolites pouvait avoir une faible activité oestrogénique (Ishibashi, *et al.*, 2004).

De manière identique une étude suivante a montré l'activité antagoniste en tant qu'oestrogène du TCS (à une concentration de 1 µM) et une activité agoniste partielle du récepteur à l'Aryl hydrocarbure, AhR (à une concentration de 10 µM) (Ahn, *et al.*, 2008). Le TCS (à des concentrations de 0.23 à 230 µg/L) semblerait également se lier au récepteur de l'hormone thyroïdienne et ainsi perturber le système endocrinien de grenouilles taureaux d'Amérique du Nord (Veldhoen, *et al.*, 2006).

Par ailleurs, chez des xénopes mâles d'Afrique du Sud, des injections intra péritonéales de TCS (à des doses allant de 4 à 400 µg/g) ont conduit à une diminution de leur production de vitellogénine plasmatique et à une réduction de leur taux de testostérone (Matsumura, *et al.*, 2005). Une étude plus récente a également montré que le TCS pouvait fonctionner comme un anti-androgène en inhibant l'activité transcriptomique induite par la testostérone (Chen, *et al.*, 2007). De même, des rats mâles traités au TCS (traitement de 60 jours avec des doses de TCS allant de 5 mg/kg à 20 mg/kg) présentaient une synthèse réduite des androgènes et une diminution de la production de sperme, semblant confirmer un effet anti-androgène du TCS (Kumar, *et al.*, 2009).

On ne peut cependant vraiment conclure sur la nature de l'activité du TCS, celle-ci semblant dépendre de plusieurs facteurs comme le système cellulaire considéré ou la dose et le temps du traitement administré.

b. Effets nocifs sur la santé

❖ Etudes sur les animaux

Le TCS a été incriminé plus récemment en tant que perturbateur endocrinien, et il a été montré dans un premier temps qu'il constituait un composé hautement toxique pour la faune

et la flore et qu'il pouvait perturber de nombreuses fonctions de l'organisme et ce chez des espèces très variées incluant des invertébrés, des amphibiens, des poissons, des oiseaux et des mammifères (Bedoux, *et al.*, 2012, Tatarazako, *et al.*, 2004).

Il a par exemple été montré chez le rat que le TCS perturbait l'homéostasie des hormones thyroïdiennes : le TCS est ainsi capable d'empêcher la sulfatation de ces hormones, transformation qui inhibe normalement les hormones thyroïdiennes et qui est une étape clé du développement sous contrôle thyroïdien (Dann and Hontela, 2011, Schuur, *et al.*, 1998). Une autre étude réalisée chez des grenouilles a confirmé ces résultats, les doses environnementalement pertinentes du TCS auxquelles ont été exposés les amphibiens ayant été à l'origine d'altération de processus développementaux qui sont dépendants des hormones thyroïdiennes (Veldhoen, *et al.*, 2006). Crofton *et al.* ont également montré que le TCS était capable de diminuer le taux plasmatique de l'hormone thyroïdienne T₄ (Crofton, *et al.*, 2007). Chez les poissons exposés au TCS, il a été observé une toxicité durant les premiers stades de vie du poisson medaka et une toxicité sur des larves du poisson zèbre avec un impact négatif sur leur éclosion, leur développement embryonnaire, leur activité enzymatique et leur survie (Ishibashi, *et al.*, 2004, Oliveira, *et al.*, 2009).

Par ailleurs, le TCS semblerait interagir avec les enzymes du cytochrome P450 dans les microsomes hépatiques, il pourrait notamment en activer ou en inhiber certaines isoformes (CYP1A et CYP2B) impliquées dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes mais aussi dans l'élimination de l'agent antibactérien (Hanioka, *et al.*, 1997, Jinno, *et al.*, 1997).

Une étude très récente a également montré que le TCS perturbait la fonction musculaire, et en particulier celle du muscle cardiaque (Cherednichenko, *et al.*, 2012). En effet, des souris exposées à des doses similaires à celles rencontrées par l'homme dans sa vie quotidienne ont des muscles qui se contractent plus difficilement, en raison d'une perturbation du couplage excitation-contraction du muscle.

❖ Etudes sur l'homme

Chez l'homme, Allmyr *et al.* sont les seuls à avoir étudié les effets du TCS sur l'homéostasie thyroïdienne : les participants de cette étude se sont brossés les dents deux fois par jour avec un dentifrice contenant 0,3% de TCS pendant 14 jours et l'évolution de leurs taux plasmatiques en hormones thyroïdiennes fut évaluée par une prise de sang avant et après l'exposition au TCS. Cette étude n'a pas obtenu les mêmes résultats que ce qui était observé chez les animaux, les taux d'hormones thyroïdiennes n'ayant pas varié. Il se peut cependant que la période d'exposition des participants n'ait pas été suffisamment longue pour voir apparaître une altération de l'homéostasie thyroïdienne.

De manière similaire à ce qui était observé chez les rongeurs, Jacobs *et al.* ont montré *in vitro* l'activation du récepteur au pregnane X humain (hPXR) par le TCS, récepteur qui régule l'expression des enzymes de phase I hépatiques telles que le cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) (Jacobs, *et al.*, 2005). Cette enzyme joue un rôle important dans la biotransformation d'une grande partie des agents pharmaceutiques et de composés chimiques comme le TCS (Jacobs, *et al.*, 2005, Luo, *et al.*, 2002). Une modification de la régulation des enzymes hépatiques peut donc entraîner une altération du taux de métabolisation de ces agents et potentiellement des effets nocifs sur la santé en les accumulant dans l'organisme.

Les effets du TCS sur la cancérogénèse sont à l'heure actuelle peu connus, une seule étude ayant étudié cet aspect chez les cellules cancéreuses mammaires (Gee, *et al.*, 2008). Gee *et al.* ont ainsi observé une prolifération accrue des cellules cancéreuses mammaires suite à leur exposition à l'antibactérien à des concentrations pertinentes du point de vue environnemental. Le TCS pourrait donc favoriser l'avancée tumorale de certains cancers.

4) Son analogue : le Triclocarban

Le TCS possède un analogue, le triclocarban (TCC) ou 3,4,4'-trichlorocarbanilide, à la structure chimique très proche (Figure 19). Il possède également des propriétés antibactériennes (il agit contre les bactéries gram-positives), d'où son utilisation courante dans les savons solides et déodorants. Il a été aussi identifié comme perturbateur endocrinien : il serait capable de potentialiser l'action des androgènes via l'AR dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines et induirait ainsi une hyperplasie des organes sexuels accessoires (Chen, *et al.*, 2008, Duleba, *et al.*, 2011). Il aurait également une activité œstrogénique, par l'activation de l'ER α (Yueh, *et al.*, 2012). Par ailleurs, en traitement combiné avec le BPA il est capable d'induire la surexpression d'une aromatasase impliquée dans la conversion des androgènes en œstrogènes chez le poisson zèbre (Chung, *et al.*, 2011). Il ne paraît donc pas impossible que le TCC soit capable de potentialiser les effets d'autres PE déjà constatés chez l'homme.

D – Perturbateurs endocriniens et signalisation calcique

Parmi les actions non génomiques des perturbateurs endocriniens, une modification de l'homéostasie calcique conduisant à des changements de motilité cellulaire, de signalisation intra- ou extracellulaire ou une rapide sécrétion d'hormone par exocytose a souvent été observée.

Il a par exemple été montré que certains xéno-œstrogènes tels que l'endosulfane, le coumestrol, le nonyphénol et le BPA étaient capables d'induire un influx calcique suffisant pour déclencher la sécrétion de prolactine (PRL) dans les cellules hypophysaires GH3/B6

(Wozniak, *et al.*, 2005). Cet influx calcique proviendrait de l'activation de canaux calciques voltages-dépendants de type L, activation directe par les xéno-œstrogènes à des concentrations de l'ordre du pico- et du nanomolaire (par exemple de 0,1 à 10 nM pour le BPA).

Le BPA (à une concentration de 1 nM) serait également capable de moduler l'activité de canaux potassiques K_{ATP} , et d'induire ainsi une augmentation de la signalisation calcique dépendante du glucose et une libération d'insuline dans les cellules pancréatiques β humaines (Soriano, *et al.*, 2012). Cette modulation des canaux potassiques passerait par une activation de l'ER β et pourrait être à l'origine de troubles métaboliques chez l'homme. De même, le BPA (10 nM) serait capable d'activer directement (de manière non génomique) des canaux potassiques Maxi-K ($K_{Ca1.1}$) dans les cellules musculaires d'artères coronaires, agissant comme un potentiel vasodilatateur (Asano, *et al.*, 2010).

Un autre exemple est celui des alkylphénols (nonylphénol, octylphénol, propylphénol,...) pour lesquels il a été montré qu'ils étaient à l'origine d'une élévation anormale de la concentration en calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) dans les cellules de Sertoli TM4 (cellules impliquées dans la maturation des spermatozoïdes) (Michelangeli, *et al.*, 2008). Cette augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ dépolarisait leurs mitochondries et induirait leur mort cellulaire. Cette altération de l'homéostasie calcique par les alkylphénols se produirait par leur inhibition des pompes calciques de type SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase).

Il a été aussi observé que le TCS pouvait altérer l'homéostasie calcique, notamment par l'activation des Récepteurs à la Ryanodine (RyR) de type I dans des myotubules squelettiques de souris (Ahn, *et al.*, 2008). Dans les cellules musculaires cardiaques et squelettiques de souris, le TCS altérerait le couplage excitation-contraction *via* l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Cherednichenko, *et al.*, 2012). Il semblerait que l'antibactérien interrompe la signalisation orthograde et rétrograde entre les canaux calciques de type L et les RyR dans le muscle squelettique, alors que dans le muscle cardiaque le TCS bloque directement l'entrée calcique *via* les canaux de type L, révélant un mécanisme par lequel le TCS affaiblit la contractilité de ces deux types de muscle.

Une autre modulation de la signalisation calcique ne passant pas par une modulation de l'expression ou de l'activité des canaux ioniques a été également observée pour des parabens. En effet, le methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl-, et isobutylparaben sont capables d'induire une augmentation de l'expression de la Calbindine-D9k, une protéine à haute affinité pour le Ca^{2+} impliquée dans le transport de cet ion, *via* l'activation de l'ER α dans les cellules hypophysaires GH3 de rat (Vo, *et al.*, 2011).

Bien que de nombreuses études montrent des altérations de l'homéostasie calcique et une progression de la cancérogénèse suite à l'exposition aux PE et que l'on sache que la modulation du fonctionnement des canaux ioniques pourrait jouer un rôle important dans la régulation de l'oncogénèse, aucun lien n'a été établi entre ces différents phénomènes, à savoir si les PE sont capables d'induire une progression tumorale *via* une modulation de l'homéostasie calcique. C'est pourquoi nous nous sommes particulièrement intéressés aux canaux calciques et à leur(s) rôle(s) dans la progression du cancer prostatique suite à une exposition aux PE.

IV - Les canaux ioniques et le cancer

A – Rôle du calcium dans la physiologie cellulaire

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

Le « calciosome » a été défini comme le répertoire des acteurs impliqués dans l'homéostasie calcique, la signature calcique de chaque cellule dépendant de l'activité globale de ce calciosome. De nombreux composants du calciosome sont d'ores et déjà identifiés et étudiés : des transporteurs assurant le transport actif ou facilité du Ca^{2+} (canaux et pompes calciques), des chélateurs calciques, des enzymes à activité dépendante du Ca^{2+} et des protéines senseur de Ca^{2+} . Chacun de ces acteurs va donc contribuer à la signature calcique de la cellule, et chaque signature calcique va être à l'origine d'une régulation fine de la physiologie de la cellule.

1) Les canaux ioniques à l'origine des signaux calciques

Des canaux ioniques présents au niveau membranaire et intracellulaire (membrane des organites cytoplasmiques) sont capables de générer des signaux calciques.

Au niveau de la membrane plasmique, différents types de canaux et pompes calciques régulent les échanges d'ions Ca^{2+} entre les milieux intra et extracellulaires (Figure 20). Il existe ainsi des canaux calciques chimio-dépendants (ROC pour Receptor-Operated Channel) que l'on retrouve aussi bien dans les cellules excitables que dans les cellules non excitables (Berridge, 1996). Ces canaux s'ouvrent en réponse à la fixation d'un ligand (hormones, neurotransmetteurs, seconds messagers) et permettent un influx de Ca^{2+} dans la cellule. Les canaux SOC (Store-Operated Calcium channel), activés suite à la libération du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sont, quant à eux, largement présents dans les cellules non excitables (Parekh and Penner, 1997).

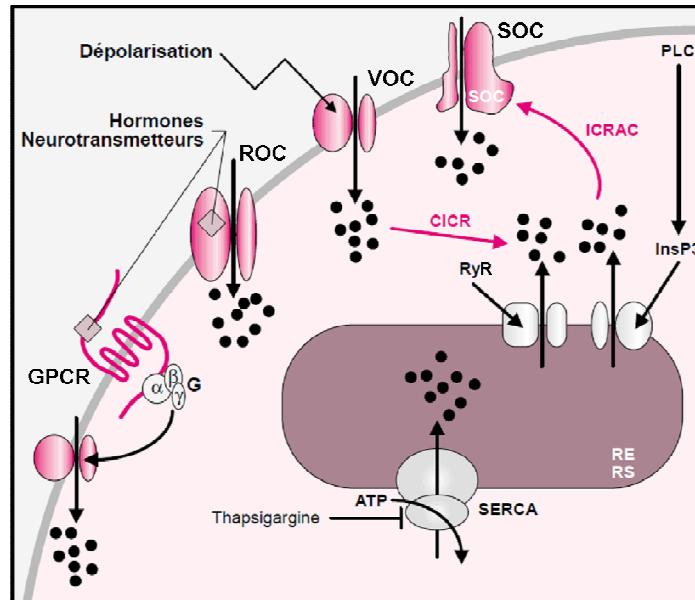


Figure 20 : Sources et voies d'entrée du calcium dans le cytoplasme. Les points noirs désignent les ions Ca^{2+} . Le Ca^{2+} peut entrer depuis le milieu extracellulaire par (de gauche à droite) : un canal associé à un récepteur couplé à une protéine G (GPCR), un récepteur-canal (Receptor Operated Channel, ROC), un canal sensible au potentiel, ou un canal activé par la vidange des réserves intracellulaires (Store-Operated Calcium channel, SOC). Le réticulum endoplasmique (RE) (ou sarcoplasmique, RS, dans le muscle) peut libérer du Ca^{2+} par les récepteurs de l'InsP3 (InsP3R) ou par les canaux sensibles à la ryanodine (RyR). Ces réserves internes sont maintenues grâce à l'activité des SERCA (Sarcoplasmic ER calcium ATPase), qui pompent le Ca^{2+} à l'inverse du gradient de concentration en consommant de l'énergie. Ces SERCA sont la cible de la thapsigargine. Le CICR (Calcium-Induced Calcium Release) est l'activation des canaux InsP3R ou RyR par l'ouverture des canaux VOC sensibles au potentiel. Inversement, les SOC de la membrane plasmique s'ouvrent lorsque le Ca^{2+} des stocks intracellulaires est mobilisé.

La membrane plasmique possède également des pompes appelées PMCA (pour Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase) et des transporteurs (comme l'échangeur $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$) pour faire sortir le Ca^{2+} hors de la cellule et ainsi maintenir la concentration basale en Ca^{2+} proche de 100 nM. Les pompes SERCA situées sur la membrane du réticulum endoplasmique participent à ce phénomène. Les cellules dites excitables, c'est-à-dire pouvant générer des potentiels d'action, comme les neurones ou les cellules musculaires, possèdent en plus des canaux calciques voltage-dépendants (VOC pour Voltage-Operated Channel) qui s'ouvrent lors d'un changement de potentiel membranaire et provoquent une entrée de Ca^{2+} (Berridge, 1996). On retrouve également certains de ces VOC dans les cellules non-excitables. Ces différents canaux calciques vont donc contribuer à générer le signal calcique qui va diriger la cellule vers un processus physiologique donné.

2) Caractéristiques des signaux calciques

a. Régulation spatio-temporelle

Le Ca^{2+} , second messenger des plus versatiles, est un agent universel de signalisation intracellulaire utilisé par tous les types cellulaires durant les étapes précoces de la réponse à

de nombreux stimuli. Cet ion polyvalent génère des signaux très finement régulés, à la fois dans le temps, l'espace et en amplitude (Figure 21) (Berridge, *et al.*, 1998).

La source du Ca²⁺ (milieu extracellulaire, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, les mitochondries et l'enveloppe nucléaire) et la nature du signal calcique (événement localisé, vagues calciques intra- ou intercellulaires) sont autant de moyens d'activer des processus physiologiques différents (Berridge, 1993, Clapham, 1995). Les événements localisés, encore appelés événements élémentaires, peuvent être initiés par des canaux de la membrane plasmique ou réticulaire, et participent alors à des phénomènes tels que la sécrétion vésiculaire ou la mitose, ou peuvent recruter d'autres canaux et ainsi générer des vagues calciques globales intracellulaires, voire intercellulaires, impliquées dans la prolifération, l'expression génique,... La localisation subcellulaire des canaux est également essentielle car elle permet de cibler, pour des événements élémentaires similaires, des processus cellulaires différents, voire opposés. Il a par exemple été montré que la relaxation des cellules musculaires lisses était due à l'activation de canaux potassiques par des pics calciques élémentaires, localisés à proximité de la membrane plasmique. Et quand ces pics calciques avaient lieu plus profondément dans la cellule, ils étaient alors coordonnés pour générer une vague calcique et entraîner la contraction musculaire (Nelson, *et al.*, 1995, Porter, *et al.*, 1998). Un signal calcique peut ainsi être décomposé en plusieurs événements calciques élémentaires. On peut donc considérer que c'est l'intégration de ces signaux en un signal d'amplitude supérieure au seuil d'activation des protéines effectrices qui déclenche une fonction cellulaire.

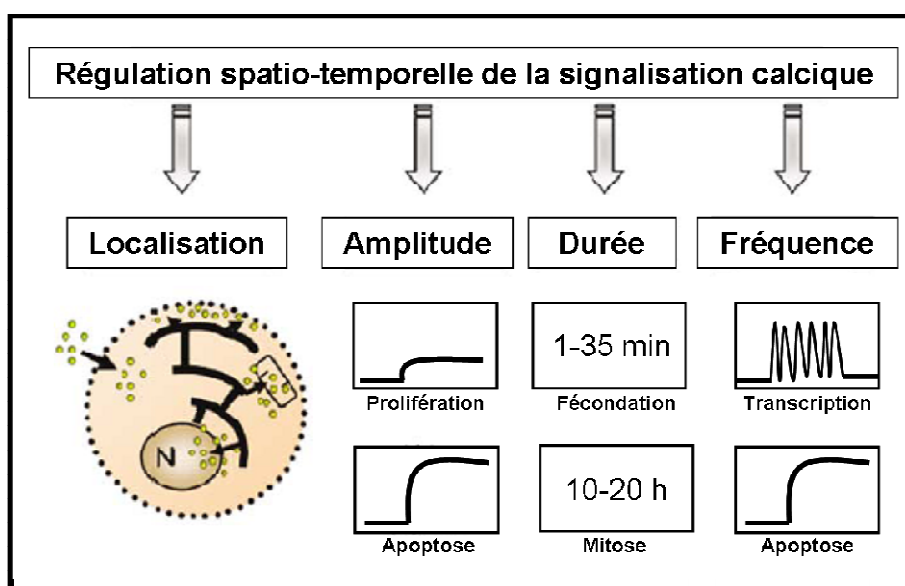


Figure 21 : Régulation spatio-temporelle du signal calcique, d'après (Prevarskaya, *et al.*, 2007). Cette régulation est caractérisée par une «signature particulière» qui reflète la cinétique (durée et fréquence), l'amplitude et la localisation subcellulaire du signal calcique.

Ces signaux calciques sont également régulés dans le temps. En effet, bien que des augmentations du taux de Ca^{2+} soient nécessaires pour générer un signal cellulaire, une élévation trop prolongée du Ca^{2+} peut engendrer la mort cellulaire. Les cellules délivrent donc des signaux de faible amplitude appelés pics calciques transitoires. Dans certains cas, un pic unique suffit à déclencher une réponse cellulaire, comme par exemple lors de la sécrétion de neurotransmetteurs ou de la contraction du muscle squelettique (Berridge, *et al.*, 2000). Quand le signal doit être maintenu sur une plus longue période, les pics sont répétés formant ainsi des vagues oscillantes dont la fréquence et la durée sont modulées en fonction de l'effet escompté. Les cellules sont alors capables de moduler l'intensité de leur réponse en faisant varier la fréquence de ces oscillations. Il a ainsi été montré qu'en fonction de la fréquence d'oscillations calciques déclenchée dans des cellules Jurkat, certains types de facteurs de transcription étaient activés et par conséquent que le profil d'expression génique de ces cellules variait (Dolmetsch, *et al.*, 1998).

b. Genèse et maintien des oscillations calciques

Dans la plupart des cellules non excitables, de nombreux récepteurs des hormones ou des neurotransmetteurs sont couplés aux Phospholipases C (PLC) par l'intermédiaire de protéines G ou par leur activité tyrosine kinase. En présence d'agonistes, les PLC hydrolysent les phosphoinositides (préférentiellement le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate ou PIP_2) et produisent du Diacylgcérol (DAG) et de l'inositol 1,4,5,-triphosphate (IP_3). L' IP_3 est un second messager intracellulaire qui peut alors rapidement diffuser dans le cytosol jusqu'à son récepteur, l' IP_3R , situé au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique libérant le Ca^{2+} séquestré dans ce compartiment (Berridge, *et al.*, 1998, Berridge, *et al.*, 2000). Cette libération rapide et transitoire des stocks calciques intracellulaires (correspondant à la vidange du RE) est suivie d'un influx lent et soutenu de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire *via* les canaux SOC, qui était préalablement nommé CRAC pour Calcium Release-Activated Channel et qui génèrent le phénomène appelé «entrée capacitive» ou «SOCE» pour Store-Operated Calcium Entry (Berridge, 1995, Clapham, 1995, Parekh and Penner, 1997, Parekh and Putney, 2005). Cette entrée de calcium représente un moyen de remplir à nouveau les réserves calciques intra-réticulaires après leur vidange, bien que la nature du signal permettant l'entrée capacitive soit encore mal connue (Figure 22) (Parekh and Penner, 1997, Parekh and Putney, 2005, Putney, *et al.*, 2001).

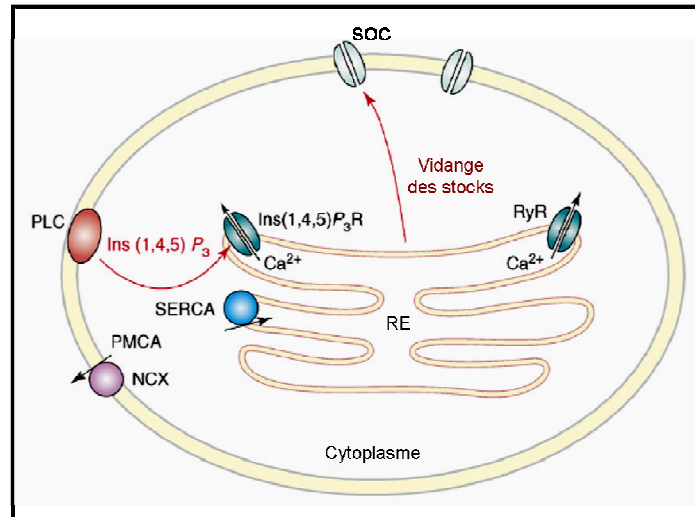


Figure 22 : Mécanisme de l'entrée capacitive. La production d'IP₃ suite à la stimulation d'un récepteur induit la vidange réticulaire. Celle-ci serait détectée par un «Ca²⁺ sensor» dans la lumière du réticulum endoplasmique, les canaux SOC alors activés permettent une entrée de Ca²⁺ dite « capacitive » afin de remplir les stocks calciques intracellulaires.

Déclenchée par des stimuli extracellulaires (hormones, facteurs de croissance ou agents pathogènes), l'entrée capacitive constitue également un signal pour la cellule qui peut être impliquée dans la prolifération ou encore l'apoptose. Or, ces processus physiologiques nécessitent des signaux calciques maintenus dans le temps. Comme les réserves calciques intracellulaires sont limitées, le maintien d'un signal calcique prolongé nécessite un influx calcique transitoire d'origine extracellulaire. Celui-ci s'établit à travers les canaux de type SOC situés au niveau de la membrane plasmique. Il existe donc un cycle « membranaire » : le Ca²⁺ entre par les canaux SOC et est déchargé par les pompes Ca²⁺-ATPases de la membrane plasmique, et un cycle « réticulaire » où le Ca²⁺ est libéré par les récepteurs IP₃ et capturé par les pompes SERCA. Des oscillations calciques régulières sont donc obtenues grâce à l'interaction entre ces cycles (Berridge, 1995, Dolmetsch and Lewis, 1994).

Dans les cellules non excitables, les oscillations calciques s'expliquent notamment par le fonctionnement du récepteur IP₃. Dans un cadre physiologique, l'IP₃ contrôle à la fois la vidange réticulaire et l'entrée capacitive en agissant sur le récepteur IP₃ (Berridge, 1993). Lorsqu'il est produit par la PLC, l'IP₃ vidange faiblement le RE et sensibilise son récepteur au Ca²⁺ qui agit comme co-agoniste en permettant une nouvelle sortie de Ca²⁺ selon un phénomène appelé « calcium-induced calcium release » (CICR) (Berridge, 1993, Berridge, *et al.*, 2003). Ce phénomène, présent dans tous les types cellulaires, peut induire la libération de Ca²⁺ de proche en proche formant ainsi des vagues calciques se propageant par un mécanisme « régénératif » le long du réticulum endoplasmique. Le Ca²⁺ déclenche, *via* les IP₃R qui au fur et à mesure se désensibilisent au Ca²⁺, une vidange réticulaire correspondant à un pic calcique transitoire. Cette vidange induit le remplissage des réserves calciques après chaque pic, le Ca²⁺ provenant de la phase de recouvrement du précédent pic et du milieu extracellulaire *via*

les canaux SOC. Une fois que le récepteur IP₃ est à nouveau sensible au Ca²⁺, celui-ci provoque une nouvelle oscillation et ainsi de suite. Le CICR permet ainsi d'amplifier et de propager des évènements calciques microscopiques en signaux calciques détectables.

3) Calcium et transcription

Le Ca²⁺ est connu pour être un puissant activateur de la transcription génique, les gènes qu'il active lui permettant de réguler les processus physiologiques tels que la prolifération, la différenciation ou la migration. Ces signaux calciques, généralement de courte durée en comparaison des mécanismes mis en jeu pour obtenir l'expression des gènes, vont activer des protéines kinases ou phosphatases dont les cibles principales sont des facteurs de transcription. La plupart du temps, l'activité de ces enzymes est stimulée par la fixation du Ca²⁺ à une protéine intermédiaire messagère, la calmoduline. Toutefois, la calmoduline n'est pas toujours le médiateur, le Ca²⁺ pouvant agir directement sur un facteur de transcription. Selon l'état de phosphorylation du facteur de transcription induit par le signal calcique, il y aura modulation de sa localisation subcellulaire, de sa stabilité, de son activité transcriptionnelle, de son association avec des cofacteurs ou de sa capacité à effectuer un remodelage ciblé de la chromatine.

a. Modulation de la localisation des facteurs de transcription

L'une des voies les plus courantes de modulation des facteurs de transcription par le Ca²⁺ intracellulaire est le contrôle de leur localisation subcellulaire. Les signalisations les mieux connues sont celles des facteurs de transcription NF-κB (Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et NF-AT (Nuclear factor of Activated T-cells). En effet, si on prend l'exemple du facteur NF-AT, celui-ci est un complexe protéique constitué d'une composante cytosolique (NF-ATc) et d'une composante nucléaire (NF-ATn) (Figure 23) (Coulon and Blanchard, 2001). Une élévation de la [Ca²⁺]_i stimule une phosphatase sensible au Ca²⁺, la calcineurine, qui va déphosphoryler la protéine NF-ATc, celle-ci étant alors capable de rentrer dans le noyau pour s'associer à NF-ATn. L'association des 2 protéines déclenche la transcription génique des gènes cibles de NF-AT. Dès que la signalisation calcique s'arrête, des kinases présentes dans le noyau re-phosphorylent rapidement NF-ATc, qui quitte alors le compartiment nucléaire et la transcription des gènes dépendante du facteur de transcription stoppe également. L'activation soutenue de la calcineurine est donc nécessaire pour le maintien de NF-ATc dans le noyau. De nombreuses observations montrent que la transcription sous la dépendance des facteurs NF-AT n'est effective que si d'autres voies de signalisation sont sollicitées de façon conjointe (Alonso and Garcia-Sancho, 2011).

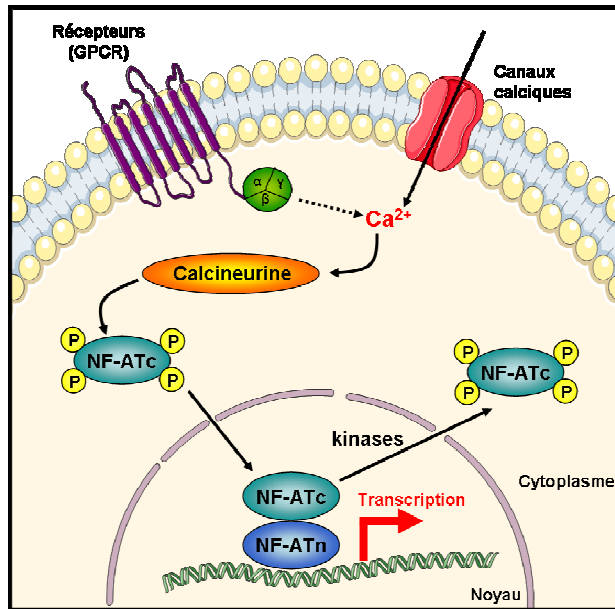


Figure 23 : Représentation schématique de la translocation Ca^{2+} -dépendante du facteur de transcription NF-AT (Nuclear factor of Activated T-cells). GPCR = G Protein Coupled Receptor, NF-ATc = NF-AT cytoplasmique, NF-ATn = NF-AT nucléaire.

b. Modulation de l'activité des facteurs de transcription

Parmi les facteurs de transcription appartenant à la famille « leucine zipper », le facteur de transcription CREB (Cyclic AMP Response Element-Binding), dont la régulation se fait par les voies Ca^{2+} dépendantes, a été très étudié. La régulation de la transcription par le facteur CREB fait intervenir des CaM Kinases (CaMK) cytosolique ou nucléaire (Alonso and Garcia-Sancho, 2011, Coulon and Blanchard, 2001). Lorsqu'une augmentation de Ca^{2+} au niveau cytosolique se produit, c'est la CaMK II qui est activée et se transloque dans le noyau pour activer le facteur CREB (Figure 24).

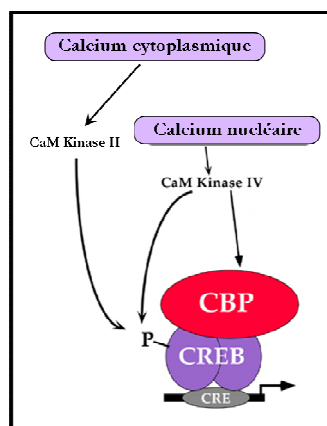


Figure 24 : Schématisation de la régulation transcriptionnelle par le facteur de transcription CREB. CBP = Calcium Binding Protein, CRE = Cyclic AMP Response Element.

Celui-ci peut alors se fixer sur les sites CRE (Cyclic AMP Response Element) de ses gènes cibles pour déclencher leur transcription. Lorsqu'une augmentation de Ca^{2+} dans le

compartiment nucléaire se produit, c'est la CaMK IV qui est mise en jeu et phosphoryle CREB. Une fois activé, le facteur de transcription CREB va interagir avec un co-facteur, le CBP (CREB Binding Protein), nécessaire pour déclencher son activité transcriptionnelle. D'autres co-activateurs stimulés par le Ca^{2+} sembleraient également se lier au facteur CREB pour augmenter son activité transcriptionnelle (Alonso and Garcia-Sancho, 2011, Hardingham, *et al.*, 1997, Hardingham, *et al.*, 2001).

c. Modulation directe de l'expression des gènes par le calcium

La protéine DREAM (Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator) représente un exemple de mécanisme direct de régulation de l'expression des gènes par le Ca^{2+} . DREAM est une protéine sensible au Ca^{2+} qui possède 4 sites de fixation de type EF hand (Carrion, *et al.*, 1999). Elle fonctionne comme un répresseur de transcription qui se lie sur les sites DRE (Downstream Regulatory Element) des gènes cibles et bloque ainsi l'action du complexe d'initiation de la transcription (Figure 25) (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). Lorsque la concentration en Ca^{2+} augmente à l'intérieur du noyau, le Ca^{2+} se fixe directement sur DREAM ce qui diminue son affinité pour les sites DRE et permet alors la transcription des gènes cibles.

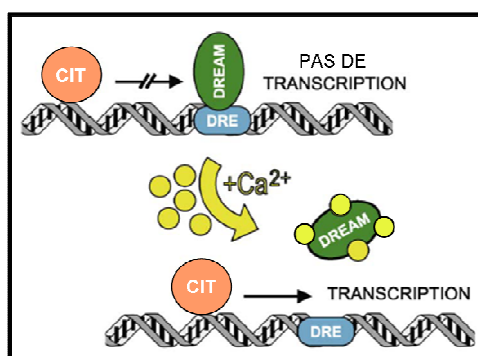


Figure 25 : Schématisation de la régulation transcriptionnelle par la protéine DREAM, d'après (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). CIT = Complexe d'Initiation de la Transcription, DRE = Downstream Regulatory Element.

4) Processus physiologiques calcium dépendants

Le Ca^{2+} est impliqué dans de nombreux processus physiologiques, il est même considéré comme un signal « donneur de vie » car c'est grâce à lui que les spermatozoïdes sont motiles et que la réaction acrosomiale se produit permettant la fécondation de l'ovocyte, et c'est également un ion indispensable pour maintenir la vie de l'organisme.

Il est aujourd'hui admis qu'un signal calcique prolongé constitue un signal de croissance pour de nombreux types cellulaires (Berridge, 1995). Des altérations des voies de signalisation calcique impliquées dans la prolifération cellulaire conduisent ainsi au

développement de certains cancers. A l'inverse, la prolifération cellulaire peut être réduite si la genèse ou l'action des signaux calciques est affectée. Un excès de prolifération est souvent lié à des mutations des voies de signalisation calcique induites par les facteurs de croissance. Une surexpression de PLC, une augmentation d'activité des protéines kinases synthétisant les phosphoinositides, une réduction du catabolisme de l'IP₃ ont été décrites dans certains carcinomes colorectaux ou leucémies humaines (Homma, *et al.*, 1994, Mengubas, *et al.*, 1994). Ainsi, de nombreuses thérapies anti-cancéreuses ainsi que des substances immunosuppressives ont pour cibles directes les protéines impliquées dans la voie de signalisation calcique. La prolifération cellulaire peut être stimulée par différents agonistes qui vont se fixer sur des récepteurs couplés aux protéines G (Rozengurt, 1992). Ceux-ci une fois activés agissent sur la PLC (ses isoformes $\gamma 1$ et ϵ semblant être celles qui sont le plus souvent impliquées) qui génère du diacylglycérol (DAG) et de l'IP₃ (Figure 26) (Fukami, *et al.*, 2010). L'IP₃ en se fixant sur son récepteur (IP₃R) entraîne la vidange réticulaire qui active, conjointement avec le DAG, la protéine kinase C (PKC). La PKC active alors l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire *via* des facteurs de transcription (Berridge, *et al.*, 2000, Martelli, *et al.*, 2006).

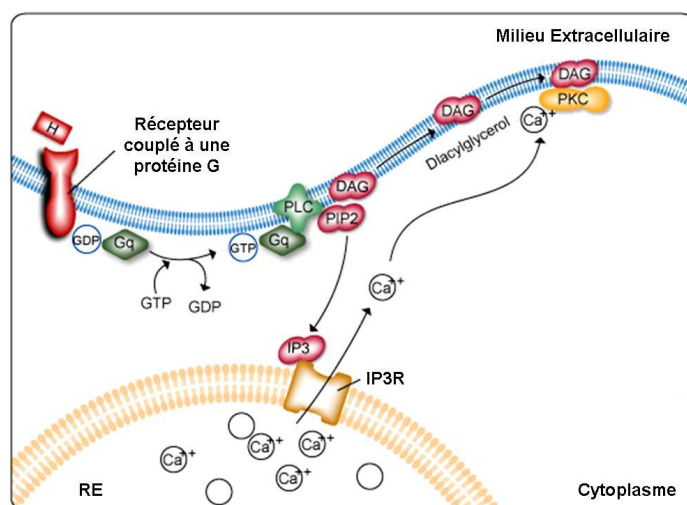


Figure 26 : Voie de signalisation de la Phospholipase C.

Outre la voie de la PLC, le Ca²⁺ cytosolique joue aussi un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en intervenant au niveau de points stratégiques tels que le début de la phase G1, les transitions G1/S et G2/M (Roderick and Cook, 2008). De même, les facteurs de croissance sont également capables d'induire de la prolifération cellulaire. En se fixant sur des récepteurs tyrosine kinase, ils vont par exemple activer la voie des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein kinase) ou déclencher un influx calcique qui lui-même va activer des protéines kinases dépendantes du Ca²⁺ impliquées dans une signalisation proliférative (Chandra and Angle, 2005, Coulon and Blanchard, 2001). Qui plus est la sécrétion de ces

facteurs de croissance peut être déclenché par une élévation du taux de Ca^{2+} cytosolique (Berridge, *et al.*, 2000, Martineau, *et al.*, 2004).

En effet, les phénomènes de sécrétion peuvent être contrôlés par des signaux calciques. L'exocytose des vésicules contenant les hormones, neurotransmetteurs et autres peptides peut être déclenchée par une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire, le Ca^{2+} contrôlant aussi la quantité et la cinétique des vésicules sécrétées (Gustavsson, *et al.*, 2012). Les synapses de neurones représentent l'un des modèles les plus connus du rôle joué par le Ca^{2+} dans la sécrétion. Sous l'impulsion d'une variation de potentiel membranaire, des canaux calciques voltages-dépendants s'activent et permettent l'entrée de Ca^{2+} ce qui entraîne l'activation de petites protéines G qui déclenchent alors la libération des vésicules de sécrétion (Giancippoli, *et al.*, 2006, Mansvelder and Kits, 2000).

Une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peut être également à l'origine d'un processus de migration cellulaire. En effet, les changements d'adhérence et de morphologie cycliques observés au cours de la migration cellulaire sont accompagnés de signaux calciques répétitifs sous forme de pics ou d'oscillations (Pettit and Fay, 1998, Prevarskaya, *et al.*, 2011). Un gradient interne de Ca^{2+} s'établit également de manière stable à l'intérieur de la cellule motile en fonction des stimuli externes qu'elle reçoit et ce à fin de l'orienter dans sa migration (Prevarskaya, *et al.*, 2011, Ridley, *et al.*, 2003, Wei, *et al.*, 2012).

En revanche, un défaut de signalisation calcique peut avoir des effets tout autres, comme par exemple entraîner une résistance à l'apoptose. En effet, plusieurs voies de signalisation sont répertoriées comme étant inductrice d'apoptose : on peut citer la voie extrinsèque des récepteurs de mort activés par leur ligand spécifique (TGF- β , Fas ligand) et la voie intrinsèque mitochondriale impliquant les protéines de la famille Bcl-2. Ces deux voies, une fois activées, font intervenir des aspartate-protéases appelées caspases qui dirigent alors l'apoptose. De nombreuses études ont montré le pouvoir pro-apoptotique du Ca^{2+} . Ainsi, il a été observé qu'une surcharge mitochondriale en Ca^{2+} ou l'activation de la protéine pro-apoptotique Bad suite à sa déphosphorylation par la calcineurine activée par le Ca^{2+} étaient des événements pouvant déclencher l'apoptose (Bernardi and Rasola, 2007, Shou, *et al.*, 2004, Wang, *et al.*, 1999). Une altération de l'une de ces voies peut donc entraîner une résistance à l'apoptose.

Par ailleurs, il a été montré chez les cellules cancéreuses prostatiques que l'entrée de Ca^{2+} via les canaux SOC était un élément clé dans le déclenchement de l'apoptose de ces cellules (Vanden Abeele, *et al.*, 2002). La fonction normale des canaux SOC étant de reconstituer les stocks calciques réticulaires, une ouverture prolongée de ces canaux peut conduire à une accumulation de Ca^{2+} dans le cytosol et induire ainsi l'entrée en apoptose des cellules. Il a été cependant montré que ces canaux SOC étaient inhibés dans les cancers

prostatiques avancés, la résistance à l'apoptose induite par ce phénomène contribuant certainement au caractère agressif de ces cancers (Vanden Abeele, *et al.*, 2002, Vanden Abeele, *et al.*, 2004).

Le Ca^{2+} paraît donc un facteur majeur pour le contrôle des processus physiologiques. Deux types de canaux ioniques membranaires peuvent intervenir dans l'entrée de Ca^{2+} à partir du milieu extracellulaire : les canaux calciques permettant l'entrée de Ca^{2+} et les canaux potassiques permettant une modulation du potentiel de membrane et de favoriser ainsi la force électromotrice pour le Ca^{2+} . Des canaux ioniques (calciques et potassiques) situés sur la membrane des organites intracellulaires (RE, Appareil de Golgi et mitochondries) participent également à cette homéostasie calcique intracellulaire.

B – Les canaux ioniques impliqués dans l'homéostasie calcique des cellules cancéreuses prostatiques

1) Les canaux calciques

Les canaux calciques forment des pores permettant le passage rapide et sélectif d'ions Ca^{2+} au travers de la membrane plasmique. Le flux d'ions au travers de ces canaux, qui est fonction du gradient électrochimique, crée un courant calcique. Dans la mesure où les ions Ca^{2+} sont plus concentrés à l'extérieur de la cellule, l'ouverture des canaux calciques résulte donc en un influx d'ions Ca^{2+} dans la cellule, cet influx participant à la dépolarisation membranaire de celle-ci. L'ouverture des canaux ioniques est conditionnée par un effecteur primaire qui définit la famille d'appartenance de chacune des classes de canaux ioniques. L'activation d'un canal ionique résulte en un changement de conformation de la protéine qui conditionne les transitions entre l'état fermé et l'état ouvert du canal.

a. Les canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux activés par la dépolarisation membranaire fonctionnent comme des portails dont l'ouverture est finement régulée par le changement de polarité membranaire. Ils sont dits voltage-dépendants et participent à la propagation de l'information électrique et à l'excitabilité cellulaire. Ils occupent une position unique dans la signalisation calcique, étant souvent la source d'entrées calciques et de rétrocontrôles Ca^{2+} dépendants, ils ont ainsi un rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la contraction musculaire, l'activité pacemaker cardiaque, la plasticité synaptique, la sécrétion d'hormone et la prolifération cellulaire. Ces canaux sont présents aussi bien sur des cellules excitables que non excitables. Lorsque la membrane est à son potentiel de repos (-70 mV), les canaux calciques voltages-

dépendants sont fermés; sous l'effet d'une dépolarisation, ces canaux s'ouvrent et le Ca^{2+} entre dans la cellule suivant le gradient électrochimique. C'est une diffusion passive. Les canaux calciques activés par la dépolarisation membranaire sont regroupés en deux classes sur la base de leurs propriétés électrophysiologiques: les canaux à « haut seuil d'activation » (HSA) activés pour de fortes dépolarisations membranaires et les canaux à « bas seuil d'activation » (BSA) activés par des potentiels membranaires plus négatifs que ceux des HSA. La classe des canaux BSA regroupe exclusivement les canaux de type T alors que la classe des canaux HSA comprend les canaux de type L, P/Q, N, et R. Chacun de ces canaux présente des propriétés biophysiques et pharmacologiques propres. Dans les cancers prostatiques avancés de type neuroendocrine, il a été montré une forte expression des canaux HSA de type L et N ainsi qu'une surexpression de canaux de type T observable durant la différenciation neuroendocrine, et il a été suggéré que ces canaux pouvaient jouer un rôle anti-apoptotique (Kim, *et al.*, 2003, Mariot, *et al.*, 2002).

b. Les canaux calciques voltage-indépendants

b.1 Les canaux calciques chimio-dépendants : ROC et SOC

Les canaux ROC, canaux couplés à des Récepteurs eux-même couplés à des protéines G, s'ouvrent en réponse à la fixation d'un ligand (hormones, neurotransmetteurs, seconds messagers). Les plus connus sont les Récepteurs à l'Acétylcholine et au NMDA (N-Méthyl D-Aspartate). Il existe également des Récepteurs canaux, certains étant connus pour être impliqués dans la vidange calcique réticulaire tels que les Récepteurs à l' IP_3 (IP_3R) et les Récepteurs à la Ryanodine (RyR).

Les récepteurs à la ryanodine (RyR) ont été mis en évidence au niveau du réticulum sarcoplasmique (RS) des fibres musculaires striées cardiaques, squelettiques et lisses, où leur rôle dans le phénomène d'excitation-contraction a bien été caractérisé (Missiaen, *et al.*, 1992, Pessah, *et al.*, 1985, Sorrentino and Volpe, 1993). Ces récepteurs sont également exprimés au niveau du RE des cellules non musculaires comme les cellules épithéliales et notamment les cellules prostatiques humaines (Mariot, *et al.*, 2000, Socci, *et al.*, 1993). On dénombre neuf isoformes différentes de RyRs, dont trois majeures chez l'homme (RyR1-3). Le RyR présente de fortes homologues de structure avec le récepteur à l' IP_3 , mais les modalités d'activation de ces deux types de récepteurs sont très différentes. Le RyR est un récepteur canal formé de 4 sous-unités identiques, possédant des sites de liaison et d'activation pour la ryanodine, un alcaloïde végétal (Dulhunty, *et al.*, 1996). Ce canal peut aussi être activé par une élévation du taux de Ca^{2+} intracellulaire, du fait de la présence d'un site de fixation à haute affinité pour le Ca^{2+} dans sa partie cytoplasmique. Ainsi, une faible augmentation du taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme à proximité des RyRs déclenche la libération du contenu des stocks calciques

intracellulaires par stimulation des RyRs. Ce processus appelé « Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release » (CICR) a été mis en évidence pour la première fois par Endo et al., en 1970 (Endo, *et al.*, 1970).

Les canaux SOC activés suite à la déplétion du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique ont quant à eux été difficiles à identifier. De longues années de frustration se sont finalement achevées avec la découverte de la base moléculaire de l'entrée capacitive dans les cellules cancéreuses prostatiques : la protéine senseur STIM1 (Stromal Interacting Molecule 1), le canal Orai1 et des canaux TRP (Transient Receptor Potential).

b.2 Les canaux TRP : Généralités

Les canaux TRP ont été décrits pour la première fois chez la Drosophile, où des cellules photoréceptrices portant des mutations du gène *TRP* exhibaient un influx calcique transitoire suite à un stimulus lumineux continu. Les canaux cationiques TRP sont retrouvés dans la plupart des types cellulaires, où une fois activés ils font entrer des cations à l'intérieur des cellules et les dépolarisent par la même occasion. La plupart des canaux TRP ne sont pas sélectifs, ont tous six domaines transmembranaires et partagent une certaine homologie de séquence. Un autre dénominateur commun à la superfamille des TRP est que ses membres jouent des rôles critiques dans la physiologie sensorielle, ils contribuent ainsi à la réponse aux stimuli tels que la lumière, le bruit, la température, le toucher et les produits chimiques (Venkatachalam and Montell, 2007). Certains canaux TRP confèrent également aux cellules la capacité à sentir les changements de leur environnement local, telles que des altérations de l'osmolarité. Malgré ces similarités, les canaux TRP forment une famille de canaux très inhabituelle dans le sens où ils présentent une grande diversité de sélectivités cationiques et des mécanismes d'activation très spécifiques. Certains canaux TRP peuvent même être activés par plusieurs mécanismes différents. Les TRP peuvent ainsi être considérés comme des intégrateurs de signaux multiples, la réponse à l'un de ces signaux pouvant être modulée par un autre de ces signaux.

b.3 Diversité moléculaire et fonctionnelle des canaux TRP

Chez les mammifères, la superfamille des canaux cationiques TRP regroupe actuellement 28 membres qui présentent un haut degré de conservation (Birnbaumer, *et al.*, 2003). Toutes ces protéines sont similaires sur le plan structural à la protéine TRP de la drosophile : elles forment des homo ou hétérotétramères dans lesquels chaque sous-unité TRP consiste en six segments transmembranaires, une boucle entre les domaines S5 et S6 formant le pore et des extrémités amino- et carboxy-terminales intracellulaires (Figure 27).

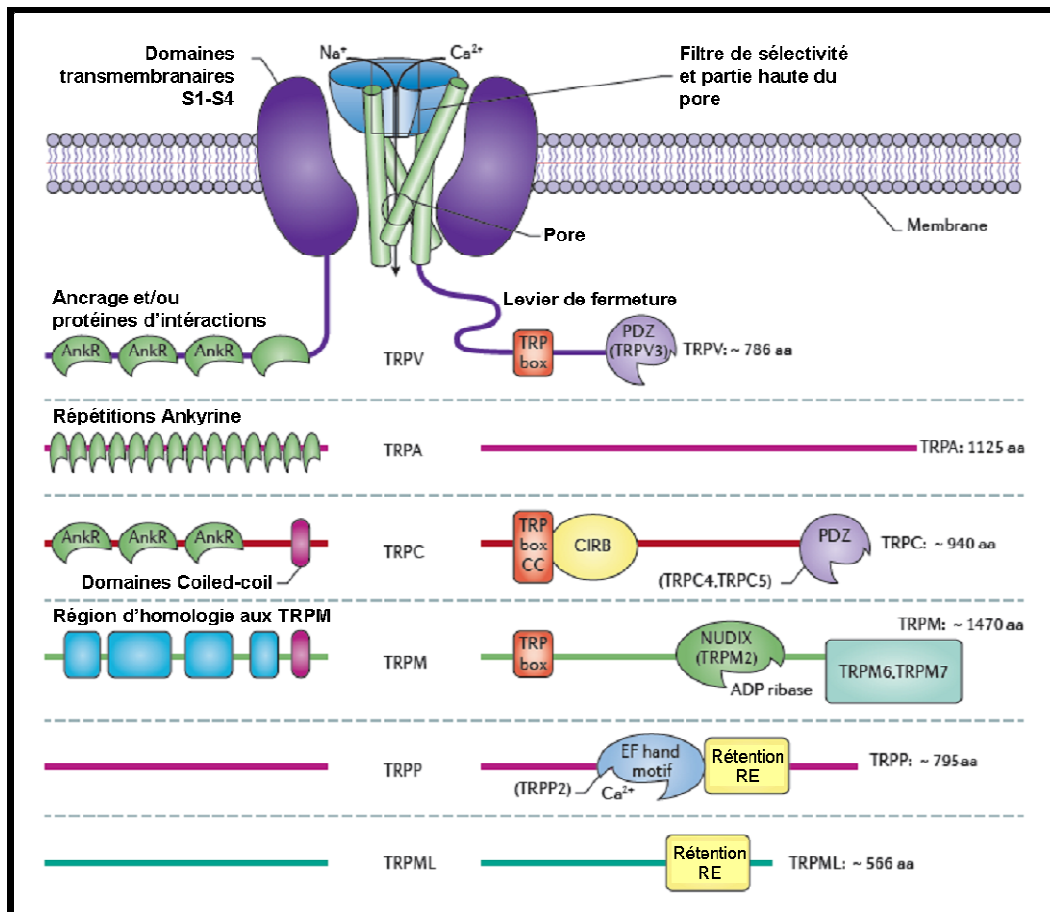


Figure 27 : Représentation schématique de la structure générale des canaux de la famille des TRP, d'après (Moran, *et al.*, 2011). Plusieurs domaines sont représentés : AnkR = Répétitions Ankyrine ; TRP box = Domaine d'homologie des TRP ; CC = Domaine coiled-coil ; CIRB = Domaine Calmodulin/IP3 Receptor Binding ; PDZ= acronyme pour Postsynaptic density protein 95 (PSD95), Drosophila disc large tumour suppressor (DLGA) and Zonula occludens protein 1 (ZO1) ; NUDIX = Nucleoside Diphosphate-linked moiety X ; Rétention RE = Domaine dont la fonction est de maintenir le canal au niveau du RE.

Selon leur séquence primaire en acides aminés, ces canaux ont été regroupés en six sous-familles :

- ❖ TRPC (1-7) pour Canonique en raison de leur forte homologie avec la protéine TRP de la drosophile.
- ❖ TRPV (1-6) pour Vanilloïde en référence au premier membre cloné de cette famille (TRPV1) qui fut identifié comme un canal activé par la capsaïcine, le composant irritant du piment rouge de type vanilloïde.
- ❖ TRPM (1-8) pour Mélastatine en référence également au premier membre cloné de cette famille (TRPM1) qui fut mis en évidence lors d'une analyse comparative des gènes de naevus bénins et de mélanomes malins d'un modèle murin.
- ❖ TRPML (1-3) pour Mucoïdine en raison de mutations observées chez son membre fondateur chez des patient atteint de mucoviscidose.
- ❖ TRPP (1-5) pour Polycystic kidney disease en raison également de la maladie à laquelle ils sont associés.

- ❖ TRPA (TRPA1 ou ANKTM1) pour Ankyrine en référence aux nombreuses répétitions ankyrine présentes au niveau de son domaine N-terminal. Elle ne comprend actuellement qu'un seul membre identifié chez l'Homme.

Leur activité aboutit souvent à une dépolarisation de la cellule, une entrée de Ca^{2+} extracellulaire ou une libération de Ca^{2+} à partir des stocks intracellulaires, et influe sur divers processus cellulaires comme la prolifération, l'apoptose ou la transcription de gènes. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs membres de cette famille aient été associés à certains cancers, leur expression étant altérée dans ces cellules cancéreuses.

En effet, dans la prostate plusieurs TRP ont été mis en évidence pour leur implication dans la cancérogénèse et/ou la progression du cancer de cette glande. Tsavaler et al., ont ainsi identifié le canal TRPM8 comme un marqueur du cancer prostatique, celui-ci n'étant pas exprimé dans les prostates saines et hyperplasiques (Tsavaler, *et al.*, 2001). Qui plus est son expression serait fortement augmentée dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes et semblerait inhiber la migration de ces cellules dans les premiers stades de la maladie (Gkika, *et al.*, 2010, Gkika and Prevarskaya, 2011, Tsavaler, *et al.*, 2001). A l'inverse, le canal TRPV6 a été proposé comme marqueur pronostique de la progression du cancer de la prostate au vu de son expression qui augmente fortement dans les tumeurs de haut grade (Fixemer, *et al.*, 2003). Ainsi le canal TRPV6 assure une entrée calcique basale dans les cellules androgéno-dépendantes permettant leur prolifération par l'intermédiaire de l'activation du facteur de transcription NFAT dépendant de la voie Ca^{2+} /calmoduline/calcineurine (Lehen'kyi, *et al.*, 2007). Le canal TRPC6 aurait également un rôle pro-prolifératif en médiant l'effet mitogénique des catécholamines *via* leur libération par les nerfs sympathiques (Gkika and Prevarskaya, 2011). Enfin l'activation constitutive du canal TRPV2 dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes serait à l'origine de leur caractère agressif et invasif par la régulation direct de marqueurs d'invasion comme les MMP-2, MMP-9 et cathépsine B (Monet, *et al.*, 2010).

b.4 Le canal TRPA1

La protéine TRPA1 humaine a été identifiée en 1999 lors d'un screening des gènes sous-exprimés après transformation oncogénique des fibroblastes (Jaquemar, *et al.*, 1999). Cette protéine de 1119 AA est encodée par le gène *TRPA1* localisé sur le chromosome 8q13. Elle est largement exprimée dans de nombreux types cellulaires et tissus incluant les neurones sensoriels, les cheveux, les vaisseaux, le cœur, les poumons, les muscles squelettiques, l'intestin, le cerveau ou encore le pancréas (Nilius, *et al.*, 2011, Stokes, *et al.*, 2006). Elle forme un canal cationique non sélectif perméable au calcium, rubidium, potassium, césium,

sodium, lithium et zinc, de relativement haute conductance (98 pS) en solution physiologique (Hu, *et al.*, 2009, Nagata, *et al.*, 2005, Nilius, *et al.*, 2011). Celui-ci contribuerait à de nombreux processus physiologiques comme la nociception, la mécanotransduction et la thermosensation, de nombreux travaux ayant en effet mis en évidence l'implication du canal TRPA1 dans les phénomènes de douleur inflammatoire, d'hyperalgésie au froid, de douleur neuropathique ou de douleur aiguë en réponse à un agent toxique, pour revue (Andrade, *et al.*, 2012).

Le canal TRPA1 avait premièrement été appelée ANKTM1 parce que la protéine présente de nombreuses répétitions ankyrine dans son extrémité N-terminale (Story, *et al.*, 2003). Les répétitions ankyrine (AnkR) sont des motifs protéiques d'environ 33 acides aminés qui constituent 2 hélices α reliées par un coude β . Les AnkR apparaissent en général en tandem et forment des domaines allongés critiques pour de nombreux processus physiologiques (Lishko, *et al.*, 2007, Sotomayor, *et al.*, 2005). La plupart des canaux TRP ne contiennent que 3 à 6 AnkR dans leur région N-terminale alors que le canal TRPA1 se distingue par 16 à 17 AnkR (Gaudet, 2008). Leur fonction n'est pas encore bien établie mais il semblerait qu'elles aient un rôle dans la mécano-sensibilité et l'ouverture du canal. Des études récentes ont ainsi montré que les domaines de répétitions ankyrine pouvaient constituer un ressort moléculaire rattachant le canal à la matrice du cytosquelette (notamment par l'interaction avec des cadhérines) et permettre son ouverture mécanique (Lee, *et al.*, 2006, Nagata, *et al.*, 2005, Sotomayor, *et al.*, 2005). Les AnkR seraient également capable de moduler l'activité du canal via le motif EF de liaison au calcium qu'elles contiennent (Doerner, *et al.*, 2007, Zurborg, *et al.*, 2007). Enfin elles pourraient aussi conférer au canal une sensibilité aux stimuli thermiques et chimiques (les modules AnkR 3-8 et AnkR 10-15) et au calcium intracellulaire (AnkR11) (Cordero-Morales, *et al.*, 2011).

En effet, il semblerait que le canal TRPA1 s'active suite à une exposition à des températures très froides ($<17^{\circ}\text{C}$) ou à de l'iciline (composé chimique induisant une sensation de fraîcheur), bien que cela soit encore très controversé à l'heure actuelle. En effet, récemment deux études *in vivo* indépendantes ont réalisé un knock-out de la protéine TRPA1 (ciblant toutes les deux le pore du canal) chez l'animal et obtiennent des résultats contradictoires quant à la réponse au froid du canal (Bautista, *et al.*, 2006, Kwan, *et al.*, 2006).

Le canal TRPA1 est également activé par de nombreux composés chimiques endogènes et exogènes de type irritant dont une partie est listée dans le [Tableau 4](#) à titre d'exemples (Andrade, *et al.*, 2012, Bang and Hwang, 2009, Fernandes, *et al.*, 2012, Macpherson, *et al.*, 2007).

Composé (source)	Activité	Structure
Allyl Isothiocyanate (moutarde et wasabi)	agoniste	
Cinnamaldéhyde (cannelle)	agoniste	
Allicin (ail et oignon)	agoniste	
Δ9-Tétrahydrocannabinol (marijuana)	agoniste	
Acrolein (fumée de cigarette et gaz lacrimogène)	agoniste	
Eugenol (clou de girofle)	agoniste	
Iodoacétamide	agoniste	
Nicotine	agoniste	
Formaldéhyde	agoniste	
Paracétamol/Acétaminophen	agoniste	
Camphre	agoniste	
Iciline	agoniste	
Peroxyde d'hydrogène (endogène)	agoniste	
4-hydroxynonenal (endogène)	agoniste	
15-deoxy-delta-12,14-prostaglandine J2 (15d-PGJ2) (endogène)	agoniste	
Bradykinine	Modulateur	
AP-18	antagoniste	
HC-030031	antagoniste	

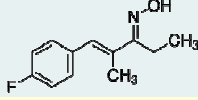
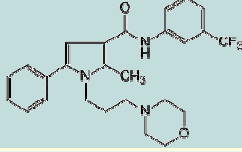
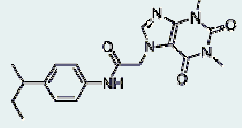
A-967079	antagoniste	
HC-067047	antagoniste	
Chembridge-5861528	antagoniste	

Tableau 4 : Liste non exhaustive des molécules modulant l'activité du canal TRPA1.

Malgré leur hétérogénéité structurale, de nombreux ligands de TRPA1 partagent une caractéristique commune : le caractère électrophile (c'est à dire la capacité à accepter un doublet d'électrons). Certains ligands connus de TRPA1, comme l'Allyl isothiocyanate (AITC), le cinnamaldéhyde, l'acroléine, contiennent un noyau carbone électrophile hautement réactif. Grâce à cette caractéristique, ces molécules sont capables de se lier de manière covalente au canal. En effet, il a été montré que le groupement thiol SH des résidus cystéine ou lysine présents au niveau des répétitions ankyrine du canal s'additionnait au groupement carbonyle de l'agoniste, cette liaison covalente et réversible entraînant l'activation du canal (Figure 28) (Hinman, *et al.*, 2006, Macpherson, *et al.*, 2007, Sadofsky, *et al.*, 2011, Takahashi, *et al.*, 2008). Plusieurs résidus se sont ainsi avérés critiques pour ce type de liaison : les cystéines C415, C421, C422, C619, C621, C622, C639 et C663 ainsi que la lysine K708.

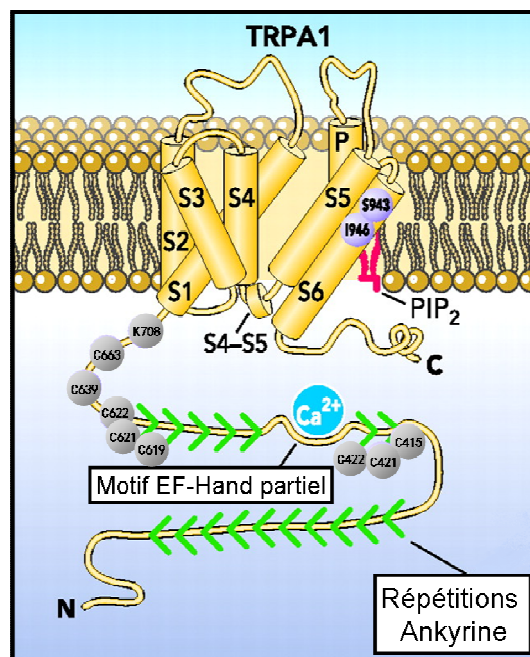


Figure 28 : Représentation schématique de la structure du canal TRPA1.

Le canal TRPA1 peut également détecter de nombreux composés phytochimiques non-électrophiles et certains composés chimiques synthétiques, probablement par le mode traditionnel de liaison d'un ligand sur un récepteur. Ces ligands, tels que le Δ^9 -Tétrahydrocannabinol ou l'iciline, se fixent sur des sites différents des agonistes électrophiles et montrent une rapide réversibilité (Bang and Hwang, 2009). Des composés d'origine endogène (provenant du stress oxydatif ou du métabolisme des acides gras) tels que le peroxyde d'hydrogène, le 4-hydroxynonanal et le 15d-PGJ2 peuvent également activer le canal TRPA1 par une addition conjuguée ou formation de ponts disulfure (Andersson, *et al.*, 2008).

Par ailleurs, des travaux récents ont montré l'activation du canal TRPA1 par le calcium extracellulaire, impliquant le résidu N855 de son segment transmembranaire S4 et dont la mutation peut conduire au développement du syndrome de douleur épisodique familial (Kremeyer, *et al.*, 2010). De même, une élévation du zinc intracellulaire, par un influx à travers le canal TRPA1 ou d'autres canaux, serait capable d'activer le canal TRPA1 par la fixation du zinc au niveau de résidus cystéine et histidine intracellulaires spécifiques et d'exciter ainsi des neurones nocicepteurs (Hu, *et al.*, 2009).

D'autres voies de modulation du canal ont été également découvertes, impliquant des molécules endogènes comme la bradykinine (*via* l'activation de son récepteur B₂) ou des protéases (*via* l'activation du récepteur PAR2, Protease Activated Receptor 2) (Bandell, *et al.*, 2004, Dai, *et al.*, 2007). Ainsi, la bradykinine en se fixant sur son récepteur active la voie de la PLC, aboutissant à une vidange calcique du réticulum endoplasmique suite à l'ouverture des IP₃R. Cette vidange calcique active dans un premier temps le canal TRPV1 et l'influx calcique établi permet alors l'ouverture du canal TRPA1 (Bautista, *et al.*, 2006). En outre, Wang *et al.*, ont montré que dans les neurones des ganglions rachidiens l'activation du canal TRPA1 par la bradykinine pouvait passer par la voie de la protéine kinase A (PKA) (Wang, *et al.*, 2008).

Compte-tenu de ces différentes données, il a été suggéré que le canal TRPA1 pouvait fonctionner comme une alarme sensorielle aux composés nocifs d'origine environnementale et l'expression éventuelle de ce canal au niveau des cellules cancéreuses peut ainsi sensibiliser ces dernières aux substances environnementales et favoriser la génèse des signaux calciques.

b.5 Les protéines STIM et Orai

Il a été récemment démontré que les canaux TRP ne pouvaient à eux seuls assurer les courants SOC, d'autres canaux calciques étant sûrement impliqués. En effet, deux protéines, STIM (Stromal Interaction Molecule) et Orai ou CRACM (Calcium Release-Activated Channel Modulator) ont été identifiées pour leur participation dans le courant calcique de type SOCE (Feske, *et al.*, 2006, Liou, *et al.*, 2005).

Les protéines Orai sont des protéines membranaires à 4 domaines transmembranaires avec des extrémités N- et C-terminales intracellulaires avec un supposé « pore » situé entre les segments transmembranaires 2 et 3 (Feske, *et al.*, 2006). Trois isoformes de cette famille sont actuellement connues : Orai1, Orai2 et Orai3 (ces protéines étant nommées d'après les trois gardiens de la porte du paradis dans la mythologie grec). La protéine Orai1 a été identifiée par Feske *et al.* (2006) par un screening de l'utilisation des ARN interférents combiné à l'étude des mutations géniques chez des patients atteints d'une immunodéficiência sévère (Feske, *et al.*, 2006). Cette pathologie était associée à une non-fonctionnalité des canaux ioniques impliqués dans le courant CRAC dans les lymphocytes T.

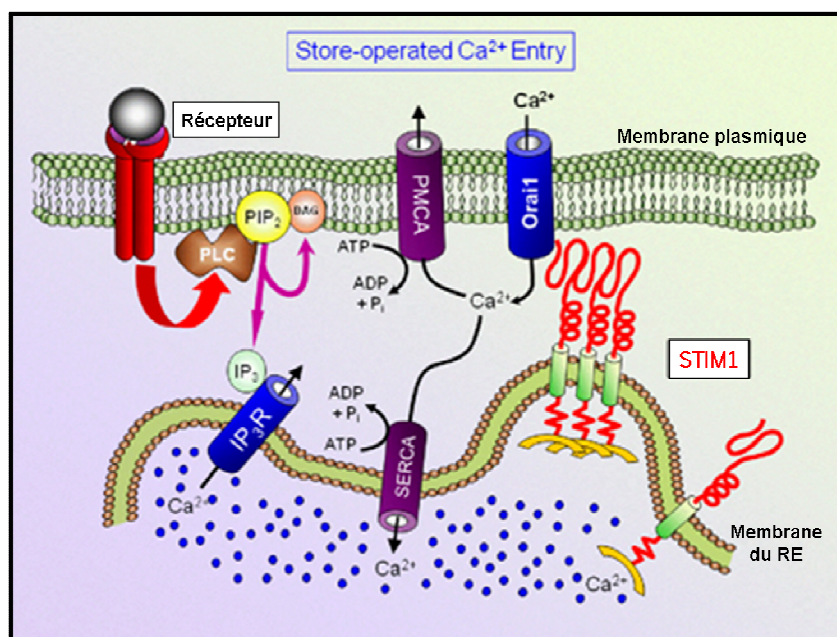


Figure 29 : Implication des protéines Orai1 et STIM1 dans le développement du SOCE.

Deux isoformes de la protéine STIM sont actuellement connues (STIM1 et STIM2). Ce sont des protéines à un domaine transmembranaire localisées dans la membrane du RE. Des travaux récents montrent que STIM1 peut jouer le rôle d'un « senseur de calcium » dans le réticulum et ainsi détecter la vidange calcique de cet organelle pour déclencher l'activation des canaux SOC. En effet, après la vidange calcique, les protéines STIM1 s'aggrègent et s'accumulent dans une région de la membrane du RE située sous la membrane plasmique

(Figure 29) (Liou, *et al.*, 2005, Mercer, *et al.*, 2006, Wu, *et al.*, 2006). Quant à la protéine STIM2, son rôle dans la modulation du courant SOC reste encore controversé dans les différents systèmes cellulaires étudiés jusqu'à ce jour. En effet certains travaux pencheraient pour un rôle d'inhibiteur du courant SOC induit par STIM1 alors que des études récentes indiquent un rôle identique à celui de STIM1 mais pour une plus faible vidange calcique du RE ou encore un rôle dans le maintien du taux de calcium basal du RE (Gruszczynska-Biegala, *et al.*, 2011, Oh-Hora, *et al.*, 2008, Soboloff, *et al.*, 2006).

Des travaux récents ont montré que STIM1 et Orai1 interagissaient fonctionnellement pour moduler le courant CRAC, le canal calcique dans ce système étant constitué d'Orai1 (Peinelt, *et al.*, 2006). Par ailleurs, Huang et al. (2006) ont montré que STIM1 pouvait également s'associer avec l'extrémité C-terminale de TRPC1 et moduler ainsi les courants SOCE endogènes suggérant une interdépendance entre cette nouvelle voie de signalisation impliquée dans le SOC et celles impliquant les protéines de type TRP (Huang, *et al.*, 2006). Reste à savoir si la prédominance de ces différentes voies dépend des types cellulaires et/ou de la physiologie ou la physiopathologie des cellules considérées.

2) Les canaux potassiques

Les canaux K^+ permettent la diffusion facilitée et sélective des ions potassiques à travers la membrane plasmique. Dans des conditions physiologiques, le potassium est le cation dominant du milieu intracellulaire, les canaux potassiques fournissent donc un efflux de K^+ et participent à la régulation du volume cellulaire. Ils participent également au potentiel de repos en maintenant le potentiel électrique de la membrane à une valeur proche de celle du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ($E_{K^+} = -80mV$), c'est pourquoi ils sont partie intégrante de toutes les cellules. Il existe une grande diversité de canaux K^+ qui se distingue par différents mécanismes de modulation de leur activité. Cette diversité est à l'origine de nombreux rôles physiologiques : contrôle de l'homéostasie du K^+ , du volume cellulaire et de la sécrétion des hormones, contrôle de la forme et de la fréquence des potentiels d'action, de la réponse immunitaire, de la prolifération cellulaire et de l'apoptose. Ils sont classiquement regroupés en 5 groupes fonctionnels :

- Les canaux K^+ dépendants du voltage (K_V)
- Les canaux K^+ activés par le calcium intracellulaire (K_{Ca})
- Les canaux K^+ rectifiant dans le sens entrant (K_{ir})
- Les canaux K^+ sensibles à l'ATP (K_{ATP})
- Les canaux K^+ à 2 domaines pore (K_{2P})

Les récents progrès de la biologie moléculaire ont permis également d'identifier les structures moléculaires des sous unités protéiques α composant les canaux K^+ . Trois familles structurales ont ainsi été définies d'après les homologies de séquence, le nombre de segments transmembranaires (STM) et de portions participant à la formation du pore ionique, le segment P :

- Les canaux K^+ à 6 segments transmembranaires et 1 domaine pore
- Les canaux K^+ à 2 segments transmembranaires et 1 domaine pore
- Les canaux K^+ à 4 segments transmembranaires et 2 domaines pore

Il est à noter l'existence d'un canal K^+ à la structure particulière, n'entrant dans aucune des familles précédemment citées, le canal BK_{Ca} qui présente sept segments transmembranaires.

Certains de ces canaux K^+ ont été associés à divers types de carcinomes où ils sont impliqués dans la prolifération et l'apoptose des cellules tumorales. Ceci est cohérent avec le paradigme selon lequel un efflux accru de K^+ est associé à l'initiation de l'apoptose et, inversement, que l'apoptose est atténuée si l'efflux d'ions K^+ est diminué.

Parmi ces canaux, le canal Eag1 (pour Ether-à-go-go 1), encore appelé KCNH1 ou $K_V10.1$, semble être impliqué dans la tumorigénèse. Ce canal, qui appartient à la classe des canaux K^+ dépendants du voltage (K_V), présente une augmentation d'expression dans de nombreux cancers qui est corrélée à une prolifération cellulaire accrue (Hemmerlein, *et al.*, 2006, Pardo, *et al.*, 1999). Cela semble être une caractéristique commune des canaux de type Eag, les canaux Eag2 (KCNH5) et HERG (Human Ether à-go-go Related Gene) étant également surexprimés dans divers cancers (Asher, *et al.*, 2010, Wadhwa, *et al.*, 2009).

De manière intéressante, le canal BK_{Ca} de grande conductance et appartenant à la classes des K_{Ca} a été identifié dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP (Bloch, *et al.*, 2007). Ce canal, activé normalement par une dépolarisation membranaire ou une augmentation du calcium intracellulaire, voit son expression régulé par des facteurs dérivant du sérum. Sachant qu'une privation en sérum peut entraîner le phénomène de différenciation neuroendocrine dans les cellules LNCaP, il se pourrait qu'une diminution de l'expression de ce canal joue un rôle dans le processus conduisant à la différenciation neuroendocrine (Abdul and Hoosein, 2002).

De même, des travaux de notre laboratoire ont montré que le canal IK_{Ca} à conductance intermédiaire et activé par le calcium pouvait moduler la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP. En effet, la répression de son expression par le facteur de transcription REST (Repressor Element 1-Silencing Transcription factor) induit la prolifération de ces cellules, alors qu'une inhibition de REST et donc l'induction d' IK_{Ca} conduit au processus de différenciation neuroendocrine. De plus,

l'activation du canal IK_{Ca} conduit à une hyperpolarisation du potentiel de membrane et favorise la force électromotrice du calcium, induisant l'entrée de calcium par l'intermédiaire du canal TRPV6 (Lallet-Daher, *et al.*, 2009). Le canal IK_{Ca} et le canal calcique TRPV6 associés forment ainsi un complexe moléculaire fonctionnel permettant l'entrée de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques afin de permettre leur prolifération.

Les canaux K^+ semblent donc jouer un rôle important dans le contrôle de la croissance des cellules cancéreuses prostatiques en régulant leur potentiel membranaire et l'influx calcique.

3) Les canaux ioniques et le cancer

Le rôle des canaux ioniques dans la cancérogénèse et le développement tumoral a été démontré par leur implication dans les divers processus sous-tendant ces phénomènes, tels que la prolifération, l'apoptose et la migration (Kunzelmann, 2005). Les premiers canaux à avoir été suspectés pour leur rôle dans la cancérogénèse furent des canaux potassiques, pour lesquels il a été montré qu'ils pouvaient induire la prolifération par la progression du cycle cellulaire (Wonderlin and Strobl, 1996). Mais depuis, de nombreux autres canaux ont été incriminés.

En plus des différents canaux précédemment cités pour leur implication dans la cancérogénèse prostatique, il semblerait que l'altération de l'homéostasie calcique et de l'activité SOCE joue un rôle majeur dans la mise en place du phénotype résistant à l'apoptose (surexprimant la protéine Bcl-2) androgéno-indépendant du PCa (Flourakis, *et al.*, 2010, Vanden Abeele, *et al.*, 2002). En effet, les principales caractéristiques de l'homéostasie calcique des cellules cancéreuses androgéno-indépendantes sont : un niveau basal du pool calcique du RE et une SOCE réduits. Ces changements sont accompagnés par une résistance accrue à l'apoptose induite par la thapsigargine et le $TNF\alpha$, et semblent provenir d'une régulation négative des acteurs du SOCE par la protéine Bcl-2.

Par ailleurs, les constituants ubiquitaires du SOCE (Orai1 et STIM1) ont été récemment impliqués dans la migration des cellules tumorales mammaires *in vitro* et dans un modèle murin de métastases générées par xénogreffes tumorales (Yang, *et al.*, 2009a). En effet, l'inhibition du SOCE par l'agent pharmacologique SKF96365 ou par l'utilisation de siARN STIM1 ou Orai1 supprimait la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ainsi que la propagation des cellules tumorales de xénogreffes chez la souris. Des travaux de notre laboratoire ont également montré que les protéines Orai1 et STIM1 sont régulées négativement lors de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques, suite à une modulation par la réorganisation du cytosquelette (Vanoverberghe, *et al.*, 2012).

Les canaux potassiques ont aussi été impliqués dans des voies de signalisation de facteurs protéiques modulant la croissance des cellules cancéreuses prostatiques. Des travaux du laboratoire ont ainsi montré que la prolactine (PRL) stimulait l'activité des canaux potassiques et induisait la prolifération des cellules LNCaP (Prevorskaya, *et al.*, 1994, Prevorskaya, *et al.*, 1995). Cet effet de la PRL est inhibé par le TEA, un inhibiteur à spectre large des canaux potassiques, suggérant un rôle médiateur des canaux potassiques dans les effets de la PRL sur la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate humaine (Van Coppenolle, *et al.*, 2004).

Comme nous venons de le voir, des données montrent l'intervention des canaux ioniques (potassiques et calciques) dans les processus de croissance, d'angiogenèse, de migration et de métastase des cellules cancéreuses prostatiques humaines n'est pas encore bien connue. C'est pourquoi, au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux rôles des canaux ioniques et du calcium dans les voies de signalisation des facteurs environnementaux, connus pour jouer un rôle non négligeable dans la perturbation de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques incluant la cancérogénèse.

Problématique et objectifs

Le cancer de la prostate est actuellement la troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme. Malgré les différentes approches thérapeutiques disponibles, l'efficacité de ces traitements reste médiocre. Aujourd'hui, les traitements des cancers de la prostate consistent à réduire au maximum le taux des androgènes circulants. Bien que ces traitements soient très efficaces à court terme, ils restent inefficaces sur le long terme, les cancers devenant androgéno-indépendants. Il est donc évident que d'autres facteurs non androgéniques interviennent. L'étude de ces facteurs permettrait à terme de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques pour traiter le cancer de la prostate humaine ou d'empêcher son évolution vers des formes agressives.

Des données montrent que des facteurs de l'environnement sont à l'origine de dérégulations de nombreuses fonctions de l'organisme. Ces facteurs sont également montrés jouer un rôle non négligeable dans la cancérogénèse. Le cancer de la prostate étant un cancer hormono-dépendant, du moins dans ses premiers stades, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à une certaine catégorie de ces facteurs environnementaux : les perturbateurs endocriniens. Certains d'entre eux ont ainsi été montrés comme étant impliqués dans l'induction de la cancérogénèse et/ou la progression tumorale. Or ces deux phénomènes font appel à des signatures calciques bien particulières.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes donc intéressés aux rôles des canaux ioniques (calciques et potassiques) dans les éventuels effets de ces perturbateurs endocriniens sur les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Nous nous sommes attachées à étudier à la fois l'impact de ces PE sur les cellules épithéliales cancéreuses et les cellules stromales issues de cancers prostatiques. En effet, de récentes études montrent l'importance des interactions entre l'épithélium et le stroma pour l'avancée des cancers épithéliaux. En réponse aux stimuli générés par la tumeur épithéliale, le stroma subit de nombreuses modifications et devient capable de sécréter des facteurs et protéines favorisant le caractère agressif et invasif des cellules épithéliales cancéreuses (Bhowmick and Moses, 2005, Josson, *et al.*, 2010, Rowley and Barron, 2012). Il se peut donc que les perturbateurs endocriniens agissent différemment sur l'épithélium et le stroma prostatique, contribuant dans les deux cas au développement tumoral.

Dans ce contexte, le projet de recherche de ma thèse a constitué en l'étude :

- De l'impact de ces perturbateurs endocriniens sur la signalisation calcique des cellules cancéreuses prostatiques. Nous avons pour cela mesuré deux types d'effets :

- des effets directs par la modulation de l'activité des canaux ioniques.
- des effets indirects par la modulation de l'expression des canaux ioniques influant sur la signalisation calcique.

- De l'impact de ces signalisations induites par les PE sur la prolifération, l'apoptose et la migration des cellules cancéreuses prostatiques, des processus impliqués dans la cancérogénèse.

Ces études permettraient de mettre en évidence l'impact des facteurs environnementaux sur les cellules cancéreuses prostatiques et la progression tumorale prostatique. Elles permettraient aussi de mettre à jour des marqueurs d'exposition à ces facteurs environnementaux au niveau des cellules cancéreuses prostatiques et de proposer des mesures préventives et des canaux ioniques comme cibles thérapeutiques.

Matériel et Méthodes

I - Culture cellulaire

A -Lignées cellulaires

1) Cultures primaires

Des prélèvements chirurgicaux de tissus prostatiques humains (hyperplasies bénignes et cancers de la prostate) obtenus par collaboration avec le service d'Urologie de l'Hôpital Saint Philibert (Lomme) ont été mis en culture dans différents milieux afin de favoriser le développement des cellules épithéliales (hPEC pour human Primary Epithelial Cells), stromales (hPrSC pour human Prostate cancer Stromal Cells) et endothéliales. Pour cela, chaque prélèvement obtenu est découpé avec une lame de scalpel stérile en plusieurs morceaux et ces explants sont répartis dans des boîtes de pétrie précoâtées de type Primaria (Nunc). Les explants sont déposés dans des gouttes de milieu, afin de favoriser leur adhésion, et chaque boîte reçoit un milieu de culture différent pour permettre le développement d'un seul type cellulaire donné. Après 24 à 48h, on complète les gouttes de milieu afin d'éviter la dessiccation avec le volume de milieu adapté au type de boîte. Chaque prélèvement a été identifié par un numéro attribué lors de sa mise en culture (Pr1 à 6).

2) Lignées cancéreuses et transformées

Différentes lignées cancéreuses prostatiques ont été utilisées pour ces travaux :

- La lignée androgéno-dépendante LNCaP provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection). Il s'agit d'une lignée établie à partir d'une biopsie d'un ganglion lymphatique supraclaviculaire métastaté prélevé sur un homme caucasien de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes, sont caractérisées par leur androgéno-dépendance et nécessitent donc la présence d'androgènes dans leur milieu de culture. Ces cellules expriment également le PSA.
- La lignée androgéno-résistante LNCaP C4-2 dérive de cellules LNCaP qui ont été injectées par xéno greffe chez la souris soumise à une thérapie d'ablation androgénique. Les clones ainsi obtenus présentent une hypersensibilité aux androgènes (indépendamment d'une modulation de l'expression de l'AR) et sont capables de métastaser (Gregory, *et al.*, 2001). Les cellules LNCaP C4-2 nous ont été fournies par le Dr Monique Capron.
- La lignée androgéno-indépendante PC-3 provenant de l'ATCC. Elle a été établie à partir d'une métastase osseuse localisée au niveau des vertèbres lombaires d'un patient caucasien âgé de 62 ans présentant un adénocarcinome prostatique de grade IV. Les cellules PC-3 n'expriment pas le PSA et n'ont pas de récepteur aux androgènes fonctionnel. Ces cellules sont capables de former une tumeur extrêmement agressive *in vivo* comme *in vitro* et qui est caractérisée par son hormono-insensibilité. Les cellules PC-3 ont acquis la capacité de survivre et de proliférer en absence d'androgènes.

- La lignée androgéno-indépendante DU 145 provenant également de l'ATCC. Cette lignée a été établie à partir d'une métastase localisée au niveau du cerveau d'un patient âgé de 69 ans présentant un adénocarcinome prostatique accompagné d'une leucémie. Ces cellules sont aussi capables de former des tumeurs *in vivo* et n'expriment pas le PSA ni le récepteur aux androgènes.

Nous avons également utilisé la lignée HEK-293 (Human Embryonic Kidney-293) qui est une lignée transformée dérivant de cellules rénales corticales d'embryon humain et qui présente l'avantage de ne pas exprimer nos canaux ioniques d'intérêt.

B – Conditions de culture

Les lignées LNCaP, LNCaP C4-2, PC-3 et DU 145 sont cultivées dans le milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-glutamine (5mM, Sigma, L'Isle d'Abeau, France) et en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%, Seromed, Strasbourg). La lignée HEK293 est cultivée dans le milieu DMEM-HG (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-glutamine (5mM) et en sérum de veau fœtal décomplémenté (10%) et en acides aminés non-essentiels. Pour l'étude des facteurs environnementaux de type plastifiant, les cultures des cellules ont été réalisées dans un milieu RPMI-1640 (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) reconstitué à partir d'une poudre et filtré dans des bouteilles en verre, afin d'éviter toute contamination par les molécules plastifiantes relarguées par les bouteilles de milieu.

Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie en 5% de CO₂. Lorsque ces cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont décollées par une brève trypsinisation (trypsine-EDTA, 0.25%, ICN, USA). En effet, la trypsine est une enzyme qui a pour but de digérer les protéines de surface des cellules leur permettant de s'attacher aux supports. Elle permet ainsi de détacher les cellules cultivées dans les flacons. L'effet de la trypsine est inhibé par l'ajout de milieu de culture complet et les cellules sont placées dans de nouveaux flacons de culture T75 à 50 000 cellules/mL. Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les 2 jours.

Les cellules dérivées de cultures primaires sont cultivées dans différents milieux selon le type cellulaire considéré. Les cellules épithéliales se développent et se maintiennent en culture dans du milieu KSF-M (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté (2%), en extrait pituitaire bovin et en « epidermal growth factor » (EGF). Les cellules stromales sont cultivées en milieu RPMI-1640 supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté et déstéroïdé (10%), en L-glutamine (5mM) et en 5 α -dihydrotestostérone ajoutée extemporanément (1 nM). Les cellules endothéliales sont quant à elles cultivées dans du milieu EBM supplémenté en sérum de veau fœtal décomplémenté à

5% (Gibco, Life Technologies, France). Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C dont l'atmosphère est enrichie à 5% de CO₂. Lorsque ces cellules arrivent à environ 80% de confluence, elles sont décollées par l'incubation dans une solution de PBS-EDTA (0,56 mM) pour les cellules épithéliales et dans la trypsine pour les cellules stromales et endothéliales. Elles sont ensuiteensemencées selon les expériences envisagées dans des boîtes de pétri de type Primaria (électrophysiologie, RT-PCR) ou sur des lamelles de verres (imagerie calciques, immunocytochimie) ou dans des flacons T25 ou T75 (extraction protéique). Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les 2 jours.

1) Préparation du sérum déstéroïdé

La solution de sérum de veau fœtal SVF (Seromed, Strasbourg) est additionnée de charbon actif (Charcoal activated, SIGMA, L'Isle d'Abeau, France) à une concentration de 100 g/L et laissée sous agitation pendant la nuit à 4°C. Le sérum est ensuite centrifugé une fois à 2500×g (30 minutes à 4°C) et une deuxième fois à 10, 000×g (1h à 4°C) afin d'éliminer au maximum le charbon actif. Le sérum est ensuite filtré deux fois (filtres de 0,22 µm de diamètre) sous la hotte aspirante pour le stériliser. Le sérum ainsi obtenu est conservé sous forme d'aliquots à -20°C.

2) Conservation des cellules (Congélation/Décongélation)

Après trypsinisation, environ 1 million de cellules sont reprises dans 1 mL de milieu de congélation (Recovery Cell culture Freezing Medium, Gibco), puis transférés dans une ampoule de congélation. Les cryotubes sont ensuite placés dans une boîte de congélation dont les parois sont remplies d'isopropanol, à -80°C sur la nuit. L'isolation des tubes du froid par l'isopropanol permet au milieu cellulaire de perdre environ 1°C par minute, permettant un lent refroidissement. La conservation à -80°C est utilisée pour les ampoules de cellules servant à une décongélation régulière afin de renouveler les lignées utilisées. La congélation à long terme est réalisée en stockant les cryotubes dans un container à azote liquide.

Afin de décongeler les cellules, les ampoules sont plongées dans un bain-marie préalablement chauffé à +37°C jusqu'à décongélation de la suspension cellulaire. Les cellules sont ensuiteensemencées dans des flacons T25 ou T75 contenant du milieu complet.

II - Mesure de la viabilité cellulaire et de l'apoptose

A – Test de viabilité cellulaire

La mesure de viabilité cellulaire est effectuée en utilisant un kit de mesure de prolifération (Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay). C'est une méthode colorimétrique déterminant le nombre de cellules viables par la mesure d'une

activité enzymatique mitochondriale. Le kit de dosage est composé de MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Le MTS est réduit par les cellules en formazan (soluble dans le milieu de culture) par des déshydrogénases endogènes présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite, mesurée par son absorbance à 490 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture.

B – Mesure de l'apoptose : coloration au Hoechst

Le bisBenzimide H 33258 ou Hoechst 33258 (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) est un agent intercalant de l'ADN qui permet de visualiser la chromatine en microscopie à fluorescence. Après la culture des cellules selon les conditions souhaitées, on récupère le surnageant dans le cas où une apoptose serait provoquée ou provoquerait le décollement des cellules (anoïkis) dans les conditions d'expérimentation. Les cellules flottantes sont ensuite mélangées aux cellules adhérentes, qui auront été au préalable détachées par trypsinisation. L'ensemble est homogénéisé puis centrifugé afin d'être déposé sur une lame par force centrifuge (Cytospin3, Shambon, France). Les cellules sont ensuite fixées par un bain de méthanol de 15 minutes à -20°C puis elles sont incubées dans une solution de PBS contenant 4 µg/mL de Hoechst 33258 pendant 20 minutes, à température ambiante et à l'obscurité. Après rinçage au PBS, on applique une lamelle sur chaque lame qui, une fois sèche, peut être observée au microscope à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) à la longueur d'onde d'excitation de 435 nm. Il est alors possible de distinguer les différentes figures apoptotiques (condensations chromatiniennes, corps apoptotiques) qui sont toutes prises en compte lors du comptage. Celui-ci nécessite 500 à 1000 cellules et doit être répété au minimum 3 fois par condition. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellule présentant une figure apoptotique sur le nombre total de cellules comptées.

C – Mesure de l'apoptose : visualisation de l'échelle d'ADN

La fragmentation de l'ADN est causée par des endonucléases induites par les caspases durant le processus apoptotique. La coupure de l'ADN se produit préférentiellement dans des régions spécifiques de l'ADN, ce qui provoque la libération de fragments oligonucléosomiaux typiques de l'apoptose de 180 pb. Ces fragments peuvent être visualisés sur un gel d'agarose sous forme de bandes multiples formant une "échelle d'ADN" (DNA ladder).

La technique permettant de visualiser cette échelle d'ADN est la suivante. Après la culture des cellules selon les conditions souhaitées, on récupère le surnageant dans le cas où une apoptose serait provoquée ou provoquerait le décollement des cellules (anoïkis) dans les conditions d'expérimentation. Les cellules flottantes sont ensuite mélangées aux cellules

adhérentes, qui auront été au préalable détachées par trypsinisation. L'ensemble est homogénéisé puis centrifugé, le culot étant repris dans un tampon de lyse (pour la composition voir « Annexes »). Les protéines sont éliminées de ce lysat cellulaire par un traitement à la protéinase K (200 µg/mL) sur la nuit à 37°C. L'ADN génomique est ensuite extrait avec un volume d'une solution de phénol-chloroforme/alcool isoamylalcool (AIA) (voir « Annexes »). L'extraction est réalisée pendant 10 minutes dans la glace. L'ADN est alors précipité par une centrifugation (10 000xg, 30 minutes) à 4°C. Il est ensuite concentré par l'ajout d'acétate de sodium 3M (1/10ème de volume) et d'éthanol 100% (2 volumes) sur la nuit à -20°C. L'ADN est alors recueilli à l'aide d'une centrifugation (10 000xg, 30 minutes) puis lavé à l'éthanol 75% pendant 30 minutes à 4°C. Après l'élimination de l'éthanol à l'air libre, l'ADN est repris dans du tampon TE (pH 8) contenant de la RNase A (20 µg/mL), sur glace. L'ADN est enfin soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec BET (Bromure d'éthidium ; 0.5µg/ml), visualisé sous UV (254-310nm) et photographié.

III - Mesure de la migration cellulaire

A - Test de cicatrisation

Ce test consiste à réaliser une cicatrice ou brèche au niveau d'un tapis cellulaire et à évaluer le temps nécessaire aux cellules disposées de part et d'autre de la cicatrice pour migrer et combler la brèche. Les cellules sontensemencées dans des plaques 12 puits de manière à former des tapis cellulaires homogènes. Une fois à confluence, une blessure est réalisée dans la couche cellulaire au centre des puits à l'aide d'une pointe de pipette p200 stérile. Les puits sont ensuite rincés avec du milieu de culture afin d'éliminer les cellules décollées et sont à nouveau incubés selon les conditions de culture souhaitées (avec ou sans traitement). Un marquage au feutre à l'extérieur des puits ayant été réalisé au préalable, il est ainsi possible de suivre au niveau d'une même région l'avancement de la fermeture de la blessure en fonction du temps. Un suivi photo graphique est ainsi réalisé au niveau de chaque brèche, à partir de T0 jusque T24, afin de couvrir le processus de comblement de la brèche. Ce type d'étude est réalisable au niveau des cellules PC-3 et DU145 alors que pour les cellules LNCaP, seule la méthode de chambre de Boyden est applicable.

B - Test de migration cellulaire en Chambres de Boyden / Transwell®

Un autre système pour évaluer la capacité de migration des cellules est celui des chambres de Boyden. Les cellules sontensemencées dans des inserts dont le fond consiste en une membrane de polycarbonate percée de pores de 8 µm et ces inserts sont placés dans une plaque 24 puits adaptée (Nunc) (Figure 30). Un gradient de sérum est imposé aux cellules pour déclencher leur migration, la suspension cellulaire déposée dans la chambre apicale étant

préparée dans du milieu dépourvu en sérum et le milieu déposé dans la chambre basolatérale contenant 10% de sérum (SVF). Les cellules sontensemencées de manière à recouvrir entièrement la membrane ($1 \text{ à } 2 \times 10^5$ cellules selon le type cellulaire), afin de maximiser les contacts avec les pores de la membrane. Les cellules sont incubées pendant 24 à 48h à 37°C dans ce dispositif. Les cellules n'ayant pas migré (sur la face supérieure de la membrane) sont alors retirées à l'aide de coton-tige et les cellules de la face inférieure sont fixées en plongeant l'insert dans un nouveau puits contenant du méthanol. La fixation se réalise à -20°C pendant 15 minutes et est suivie d'un marquage au Hœchst 33258 ($4 \mu\text{g/mL}$) de 20 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après rinçage au PBS, les membranes sont détachées de leur insert avec l'aide d'un scalpel et de pinces et sont déposées sur une lame en prenant soin à l'orientation de la membrane : sa face inférieure (celle avec les cellules ayant migré) doit être orientée vers le haut. Les membranes sont ainsi montées entre lame et lamelle dans le liquide de montage Glycergel (Dako) et peuvent être observées immédiatement au microscope à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) à la longueur d'onde d'excitation de 435 nm.

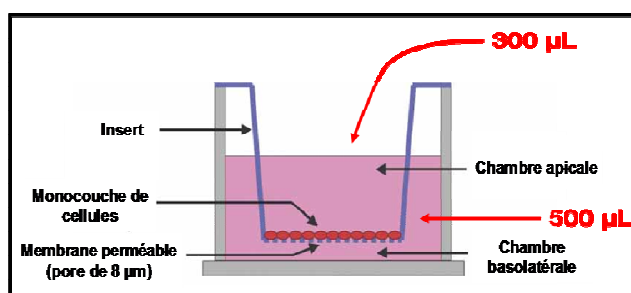


Figure 30 : Schéma d'une chambre de Boyden

IV – Mesure de la sécrétion de VEGF

Pour déterminer si l'une de nos conditions de culture des cellules stromales entraînait une modulation de la sécrétion du facteur de croissance VEGF, nous avons utilisé la technique de dosage par ELISA. Nous avons pour cela employé un kit ELISA (VEGF Human ELISA Kit, Abcam) de type sandwich (Figure 31) : un anticorps de « capture » dirigé contre notre protéine d'intérêt est coaté au fond des puits d'une plaque 96 puits, il suffit alors d'appliquer $100 \mu\text{L}$ de surnageant de nos conditions de culture (le surnageant ayant été centrifugé au préalable 5 min à 200 g) dans ces puits et de laisser incubé 3 heures. Après élimination du surnageant et rinçage avec une solution tampon, on ajoute l'anticorps de détection qui va se fixer sur la protéine d'intérêt (anti-VEGF dirigé contre un autre épitope que l'anticorps de capture) qui aura été retenue dans le fond des puits grâce à l'anticorps de capture, on le laisse incubé 1 heure. Une nouvelle étape de rinçage s'ensuit, puis on dépose une solution contenant un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps de détection et qui est

conjugué à un complexe streptavidine/péroxydase (HRP, pour Horseradish Peroxydase), pendant 45 min. Après un dernier rinçage, on ajoute le substrat chromogène qui est oxydé par la peroxydase et forme un produit coloré bleu : on bloque la réaction une fois la coloration optimale atteinte (30 minutes environ) avec une solution stop qui fait virer la coloration au jaune. On mesure ainsi l'absorbance à 450 nm qui est directement proportionnelle à la quantité de VEGF présente dans nos surnageants. Ces mêmes types de dosage ont été également effectués pour l'IGF-1 mais les concentrations d'IGF-1 sécrétées par les cellules stromales et les gammes de sensibilité des kits de dosage utilisés (Abcam et AssayPro) n'ont pas permis d'évaluer les quantités d'IGF-1 sécrétées ainsi que leurs variations sous l'effet du TCS.

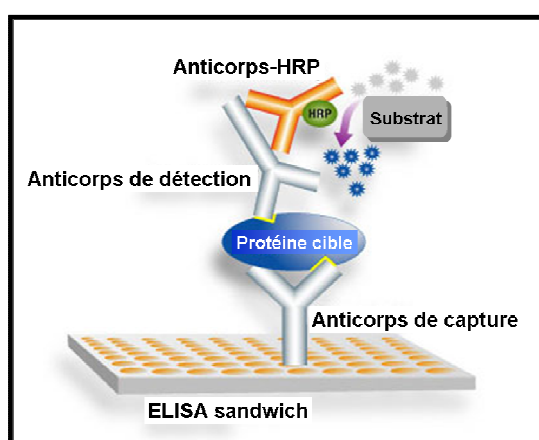


Figure 31 : Schéma d'un test ELISA de type sandwich

V - Transfections transitoire et stable

A - Lipofection

Les transfections par des siARN (petits ARN interférants) (Tableau 5) par lipofection furent réalisées avec Hiperfect (HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen). Selon la procédure conseillée par le fournisseur et pour un volume final de 1.5 mL, la solution d'Hiperfect (6 µL) d'abord mélangé avec la quantité de siARN (25 nM) et du milieu de culture sans sérum (qsp 100 µL). Après 5 minutes d'incubation à la température ambiante permettant la formation du complexe de transfection, cette solution est mélangée avec 1.4 mL de milieu de culture complet. Finalement, le mélange est déposé sur les cellules. Après environ 10 heures d'incubation, un volume de milieu complété est ajouté sur les cellules pendant une demi-journée. Le milieu est ensuite remplacé par du nouveau milieu complété. Les cellules peuvent alors être utilisées dans les 24 à 72 heures suivantes. L'efficacité de ces siRNA est vérifiée par RT-PCR et par immunofluorescence, permettant de mettre en évidence la variation d'expression au niveau ARN et au niveau protéique du marqueur ciblé.

siARN	Séquence
Orai1	UGAGCAACGUGCACAAUCU
TRPA1	GGTGGGATGTTATTCCATATAT

[Tableau 5](#) : Liste des siARN utilisés.

B - Nucléofection

La « nucléofection » est une technique de transfection par d'électroporation (au moyen du nucleofector) récemment mis au point par la société Amaxa. Cette technique permet de transférer du matériel nucléique directement dans le noyau des cellules en suspension. Après le détachement des cellules par trysinisation, 2 millions de cellules repris dans 100 µL de tampon de nucléofection (adapté selon le modèle cellulaire) sont transférées dans une cuve d'électroporation. L'ADN plasmidique (1-3 µg) contenant le gène d'intérêt (TRPA1) est alors directement ajouté dans l'homogénat et l'ensemble est soumis à la nucléofection. Les cellules sont alors reprises dans leur milieu de culture etensemencées selon les expériences envisagées. Dans le but de contrôler la réussite de la nucléofection, les cellules sont transfectées dans les mêmes conditions avec 1-3 µg du vecteur pmaxGFP dont l'expression et l'émission de fluorescence permet de contrôler l'efficacité de la transfection. Ce vecteur va permettre la production de la protéine GFP que l'on peut visualiser par fluorescence verte. Une sélection par antibiotique (les vecteurs plasmidiques utilisés contenant un gène de résistance à cet antibiotique) est ensuite réalisée sur plusieurs jours pour récupérer uniquement les colonies ayant intégré les plasmides d'intérêt. Après sélection, les colonies positives sont repiquées dans du milieu complet et prêtes à être utilisées pour nos expériences. Le vecteur plasmidique contenant le gène humain de TRPA1 nous a été fourni par le Dr Laura R. Sadofsky (Université de Hull, Grande-Bretagne) (Sadofsky, *et al.*, 2008).

VI - Etudes d'expression des ARN messagers (ARNm)

A - Extraction des ARNm

Les ARN totaux des cellules sont extraits selon la méthode décrite par Chomczynski (Chomczynski and Sacchi, 1987). Brièvement, les cellules sont rincées au PBS puis lysées dans la solution D (voir « Annexes »). Les ARN sont extraits de ce lysat cellulaire en ajoutant de l'acétate de sodium (90 mM) avec un volume d'une solution de phénol-chloroforme/alcool isoamylalcool (AIA) (voir « Annexes »). L'extraction est réalisée pendant 10 minutes dans la glace. Une centrifugation (10,000xg, 10 minutes, +4°C) permet la séparation d'une solution aqueuse d'ARN totaux. Cet extrait d'ARN est concentré à l'aide d'acétate de sodium 3M

(1/10ème de volume) et d'éthanol 95% (2 à 2,5 volumes) à -20°C pendant la nuit. Les ARN précipités sont recueillis à l'aide d'une centrifugation (10 000xg, 30 minutes) puis lavés à l'éthanol 75% pendant 30 minutes à 4°C . Après l'élimination de l'éthanol à l'air libre, les ARN sont repris dans de l'eau puis, dosés au spectromètre à 260 nm pour les acides nucléiques et à 280 nm pour les protéines. La qualité de l'extraction est jugée satisfaisante si le rapport $260/280 \geq 1,8$ et la qualité des ARN extraits est contrôlée sur gel d'agarose de 1.5%.

B - Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNase I)

Une quantité d'ARN (1 à 2 μg) est traitée à la DNaseI dépourvue d'activité RNAsique afin d'éliminer l'ADN génomique. Dans le but d'inactiver la DNase I, l'EDTA est ajouté à ces échantillons d'ARN à une concentration finale de 2,5 mM puis l'ensemble est chauffé à 65°C pendant 10 minutes. La reverse transcription est ensuite réalisée en ajoutant du tampon 10X (sans Mg^{2+}), MgCl_2 (2,5 mM), dNTP (2,5 mM/dNTP), MULV (ADN polymérase ARN dépendante, 50unités/ μl) et RNase inhibiteur (20 unités/ μl). La reverse transcription est réalisée pendant 15 minutes à température ambiante puis, les tubes sont incubés à 42°C pendant 30 minutes. Les ADN complémentaires (ADNc) sont ensuite incubés à 70°C pendant 10 minutes, puis placés dans la glace pendant au moins 5 minutes et conservés à -20°C pour les études ultérieures par PCR.

C - Retro-Transcription et Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction de PCR est réalisée dans un volume total de 25 μL avec 1 à 2 μL d'ADNc (50 à 100 ng équivalent ARN). L'ADN matrice est mélangé avec les amorces sens et antisens (concentration finale : 500 nM) (Cf. [Tableau 6](#)), des dNTPs (2.5 mM/dNTP), 2.5 μL de tampon de réaction 10X (concentration finale 1X : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16 mM ; Tris-HCl 50 mM), MgCl_2 25 mM (concentration finale : 2.5 mM), 1 μL d'enzyme polymérase TaqGold (5 U/ μL , Roche), qsp 25 μL ddH₂O. Puis la solution est placée dans l'appareil à PCR (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) et soumise au programme suivant: dénaturation initiale de 5min. à 95°C , suivie de 40 cycles de dénaturation (30 s. à 95°C)-hybridation (30 s. à 55°C - 60°C)-élongation (1 min./1kb à 72°C). Pour contrôler la qualité de la PCR, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose avec Bromure d'éthidium (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Après cette analyse électrophorétique, les produits PCR sont visualisés sous UV (254-310nm) et sont photographiés.

Gène	5'-forward-3' (Sens)	5'-reverse-3' (Antisens)	RT-PCR Taille (bp)	Numéro d'accèsion
Orai1	CTTCTTCGACCTC GTCCTCCT	CGTAAGGCCAA AGCATGGAA	406	NM_032790
RyR1	CTTTTGGTGA GCTCCGAGAC	TGGGAAGAAA TCCCAACATC	255	NM_000540
RyR2	ACATCTTTGG CCTGGATCTG	GGCTTGTCAC TTTGGCATT	506	NM_001035
TRPA1	AGTGGCAAT GTGGAGCAA	TCTGATCCA CTTTGCGTA	510	NM_007332
Vimentine	GAGAACTTTG CCGTTGAAGC	CGTGATGCTG AGAAGTTTCG	326	NM_0033807
β-actine	CAGAGCAAGA GAGGCATCCT	GTTGAAGGTCT CAAACATGATC	212	NM_001101

Tableau 6 : Liste des amorces (sens et anti-sens) utilisées pour l'étude de l'expression au niveau ARNm.

VII - Immunodétection

A - Extraction des protéines

Après la culture cellulaire, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont rincées avec du tampon PBS puis, lysées avec du tampon RIPA (20 mM PO₄Na₂/K, pH 7,2 ; Triton X-100 1% ; Déoxycholate de sodium 1% ; NaCl 150 mM) en présence d'anti-protéases (Sigma P 8340) pendant 1 heure sur la glace. Le lysat est ensuite soniqué (3 fois 5 secondes), homogénéisé et centrifugé à 10,000xg pendant 10 minutes à 4°C. Le dosage protéique est ensuite réalisé sur le surnageant (extrait protéique total) en utilisant le kit BCA (BCA Protein Assay Reagent, Pierce Protein research Products) et en utilisant la sérum albumine bovine pour l'établissement de la courbe étalon.

B - Western blot

Les analyses électrophorétiques sont réalisées en milieu dénaturant par la méthode SDS-PAGE (Sodium Dodécyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis). La densité du gel de polyacrylamide est déterminée selon la taille des protéines à séparer. La migration électrophorétique s'effectue à 15-30 mA/minigel à une intensité fixe. A la fin de l'analyse électrophorétique, les protéines sont transférées soit sur une membrane de nitrocellulose soit sur une membrane de PolyVinylDene Fluoride (PVDF). Le transfert s'effectue à 25 volts et à 50 mA/minigel pendant 1h30. Après le transfert, la membrane est saturée durant 1 heure à température ambiante dans une solution de TNT-lait 3% (p/v) (15mM de tampon Tris pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0,05% Tween et 3% de lait délipidé lyophilisé). La membrane est ensuite incubée avec les anticorps primaires (Cf. [Tableau 7](#)), à la dilution voulue dans du TNT-lait 1.5% (les anticorps utilisés sont présentés dans chaque article), soit pendant 1 à 2 heures à

température ambiante soit durant la nuit à 4°C. Après 3 lavages au TNT, les membranes sont mises en présence de l'anticorps secondaire voulu au 1/50 000ème (anti-IgG de lapin ou de souris, laboratoire Zymed Inc, San Francisco CA) pendant 1 heure à 37°C. Après 3 lavages au TNT, les protéines sont révélées par chimioluminescence grâce au kit « Supersignal West Dura Chemiluminescent » ou « Supersignal West Femto 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 densitométrie, puis le rapport de l'intensité de la protéine d'intérêt divisée par l'intensité d'un rapporteur comme l'actine permet de semi-quantifier l'expression de la protéine d'intérêt.

Anticorps primaire	Société	Dilution	Anticorps secondaire	Poids moléculaire (kDa)
α-actine	Dako	1/100 ^{ème}	Souris	42
β-actine	Sigma	1/2000 ^{ème}	Souris	45
BK	Alomone	1/500 ^{ème}	Lapin	110
IK	Santa Cruz	1/200 ^{ème}	Lapin	45
Orai1	Proscience	1/500 ^{ème}	Lapin	55
RyR1	Alomone	1/400 ^{ème}	Lapin	~450
RyR2	Alomone	1/400 ^{ème}	Lapin	~450
STIM1	Proscience	1/250 ^{ème}	Souris	84
TRPA1	Alomone	1/500 ^{ème}	Lapin	127
TRPC1	Alomone	1/400 ^{ème}	Lapin	100
TRPV6	Santa Cruz	1/200 ^{ème}	Lapin	85 à 100
Vimentine	Santa Cruz	1/200 ^{ème}	Lapin	57

Tableau 7: Liste des anticorps primaires utilisés pour réaliser les études d'expression protéique.

C - Immunofluorescence

Au cours de cette thèse, nous avons mené des études par fluorescence de l'expression protéique des canaux Ca²⁺ et K⁺ au niveau des cellules cancéreuses (lignées et cultures primaires) ainsi qu'au niveau des tissus prostatiques humains. Ces expériences sont réalisées de la façon suivante. Les cellules, cultivées sur des lamelles, sont fixées et perméabilisées dans de l'acétone pendant 15 minutes à -20°C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline). Les lamelles sont alors délimitées avec un stylo hydrophobe et mises à saturer avec une solution contenant du BSA (0.2%), du triton X-100 (0.1%) et du sérum d'âne (2-5%) 30 minutes à température ambiante. La saturation se fait

avec le sérum de l'animal chez qui a été fait l'anticorps secondaire. S'ensuit une incubation d'1h à température ambiante avec l'anticorps primaire d'intérêt. Les cellules sont rincées 3 fois avec la solution de saturation, puis incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps secondaire couplé au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) ou à la Rhodamine RedX dilué au 1/2000ème. Les cellules sont rincées une première fois avec du PBS puis incubées avec du DAPI 10 min à température ambiante et à l'obscurité (dilué dans du PBS à 50 ng/mL) afin de marquer le noyau. Les cellules sont à nouveau rincées deux fois dans le PBS, les lamelles sont alors montées dans du Mowiol. Elles sont finalement observées en microscopie à épifluorescence (AxioImager, Zeiss). Pour les tissus paraffinés, les lames subissent d'abord un déparaffinage : 3 bains successifs de 10 minutes dans un solvant (ClaRal) et des bains décroissants d'alcool (Ethanol 100%, 96%, 70% et 30%, 10 minutes pour chaque). Les lames sont ensuite hydratées par un bain de PBS de 30 minutes à 4°C. On effectue alors le démasquage (étape permettant de rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur et qui modifient la configuration spatiale des épitopes et leur accessibilité aux antigènes) par la méthode thermique : les lames sont incubées dans du Tampon citrate 0.1 M pH 6 et chauffées à la cocotte-minute. Une fois refroidies, les lames de tissus sont rincées dans le PBS et sont soumises au même protocole que les lamelles de cellules.

VIII – Imagerie de fluorescence quantitative du calcium cytoplasmique libre

L'imagerie calcique par fluorescence permet de mesurer des variations de la concentration en calcium intracellulaire de plusieurs cellules simultanément dans un champ déterminé. Cette technique repose sur l'utilisation de sondes calciques fluorescentes. Les premières sondes permettant de mesurer le calcium libre intracellulaire furent synthétisées dans les années 1980 par l'équipe de Tsien (Tsien, 1980, Tsien, *et al.*, 1982). La première qui fut fabriquée s'appelle Quin2 : elle possède la structure d'un chélateur de calcium (tel que l'EGTA ou le BAPTA) couplé à un fluorophore. L'équipe de Tsien a par la suite élaboré de nouvelles sondes, beaucoup moins photosensibles que la sonde Quin2, l'une d'entre elles étant le Fura-2 que nous avons utilisée dans nos travaux pour mesurer les variations de calcium cytoplasmique.

A - Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2

Le Fura-2 se compose d'un fluorophore stilbène associé à un groupement tétracarboxylé et octacoordonné caractéristique des chélateurs calciques tels que l'EGTA et le BAPTA (Grykiewicz, Poenie & Tsien, 1985). Nous avons utilisé le Fura-2 sous une forme lipophile non chargée appelée Fura-2 acétoxyméthylester ou Fura-2/AM. Cette forme peut passer à travers la membrane plasmique des cellules et sera retenue au sein de leur cytoplasme par

hydrolyse du groupement acétoxyméthylester par des estérases endogènes. Le Fura-2 libéré de ce groupement peut se lier au calcium, devient acide et entraîne un déplacement du spectre d'excitation, donnant lieu à une fluorescence proportionnelle à la concentration en calcium libre intracellulaire. La sonde Fura-2 est dite ratiométrique. En effet, lorsque la sonde est libre sa longueur d'onde d'excitation est de 380 nm alors que lorsqu'elle est liée au calcium sa longueur d'onde d'excitation est de 340 nm, avec une longueur d'onde d'émission de fluorescence de 510 nm dans les deux cas. C'est donc le rapport des intensités de fluorescence émises après excitation à 340 et 380 nm qui permet d'estimer les variations de calcium intracellulaire.

B - Système optique

Pour la mesure et l'enregistrement des variations calciques, nous avons utilisé le dispositif suivant : un microscope à épifluorescence (Olympus IX70) couplé à une lampe à Xenon (Applied Imaging, GB), à une caméra digitale CCD (Charge Coupled Device) 12 bits (Micromax 5 MHz, Princeton) et à un ordinateur comprenant le logiciel Metafluor (Universal Imaging) qui permet la stimulation des cellules et l'acquisition des images. Les données obtenues sont ensuite analysées avec le logiciel Origin (Microcal Software Inc., Northampton, MA).

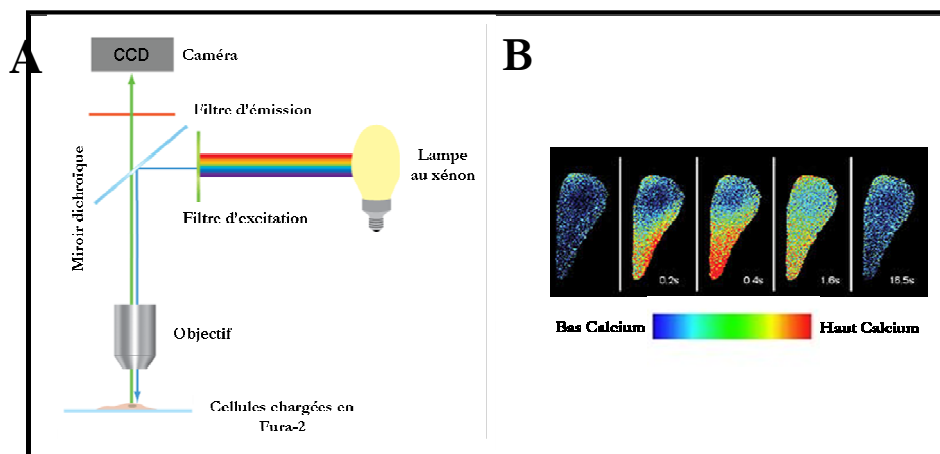


Figure 32 : A, Schéma simplifié d'un poste d'imagerie calcique. B, Spectre de couleurs représentatif des concentrations en calcium intracellulaire.

La lampe arc xénon de 100 W à haute pression émet de la lumière dont la longueur d'onde est réglée à l'aide d'un filtre monochromateur (Fill Photonics). Les rayonnements cheminant *via* une fibre optique et traversent les miroirs dichroïques : les signaux à 380 et 340 nm provenant du monochromateur sont orientés spécifiquement vers la préparation cellulaire, tandis que le signal de réponse à 510 nm, provenant de la préparation cellulaire, est orienté spécifiquement vers la caméra digitale (Figure 32A). Les signaux lumineux à 510 nm sont

capturés par la caméra CCD et convertis en signaux numériques qui sont quantifiés par le système d'analyse et visualisés en fausse couleur en fonction de leur intensité lumineuse sur l'écran de l'ordinateur (gamme allant du bleu au rouge, respectivement pour des concentrations basses à élevées en calcium intracellulaire) (Figure 32B). La fréquence d'acquisition moyenne utilisée est d'une image toutes les 5 secondes.

C - Calibration des signaux de fluorescence

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

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

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

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

D - Milieu d'enregistrement

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

E - Charge des cellules en Fura-2

Les cellules sont chargées pendant 45 minutes, à 37°C et à l'obscurité avec 2 μM de Fura-2/AM (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas). Une fois le temps de charge écoulé, on procède à 3 rinçages successifs avec le milieu HBSS contenant 2 mM de Ca²⁺ (HBSS 2 Ca²⁺).

Chaque cellule présente alors une charge relativement homogène indiquant ainsi que le Fura-2 ne pénètre pas dans les organites intracellulaires connus pour stocker le calcium interne. Les données brutes d'imagerie calcique sont ensuite analysées en utilisant le logiciel d'analyse Origin 5.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA) et présentées sous forme d'une variation du calcium intracellulaire en fonction du temps.

IX – Enregistrements électrophysiologiques : technique de Patch Clamp

Les expériences électrophysiologiques effectuées durant ma thèse ont été réalisées selon la technique du « patch-clamp » qui permet de mesurer les variations du potentiel membranaire (quand le courant est imposé) ou les courants ioniques membranaires (quand le voltage est imposé) d'une cellule vivante (Neher and Sakmann, 1976). Le principe de cette technique repose sur la propriété de pipettes de verre, munies d'une électrode de stimulation/enregistrement, de coller aux membranes biologiques formant ainsi une jonction étanche (« seal ») de forte résistance qui isole électriquement la portion de membrane (« patch ») sous la pipette. Les pipettes, de résistance comprise entre 3 et 5 M Ω et de diamètre interne de 1 μ m, sont obtenues par une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instrument Company, USA) à partir de tubes de verre en borosilicate à paroi fine sans microcapillaire (1B150F-3, World Precision Instruments, USA). Elles sont polies avant leur utilisation par une microforge (MF-900, Narishige, World Precision Instruments, USA) afin d'en émousser l'extrémité. Il existe 4 configurations différentes :

- Dans la configuration « **cellule-attachée** », on réalise une faible aspiration après avoir posée la pipette sur la membrane plasmique de la cellule afin de réaliser une jonction pipette-membrane de haute-résistance appelée « gigaseal » (10 à 100 G Ω) qui augmente le rapport signal/bruit. Ceci permet d'enregistrer l'activité électrique des canaux ioniques présents dans le fragment de membrane délimité par les bords de la pipette (Figure 33).

- Dans les configurations de « patch-excisé », on arrache un fragment de membrane avec la pipette ce qui permet l'enregistrement d'un petit nombre de canaux ioniques. Selon le mode opératoire choisi, on peut exposer soit la face interne (« **inside-out** ») soit la face externe (« **outside-out** ») de la membrane plasmique à la solution extracellulaire désirée.

- Dans la configuration « **cellule entière** », une brève aspiration suffit à rompre le patch et permet de mettre en relation le milieu intracellulaire avec le contenu de la pipette. On peut alors contrôler la composition ionique intracellulaire et enregistrer l'activité électrique de tous les canaux ioniques de la membrane plasmique en potentiel-imposé (« voltage-clamp ») ou le potentiel de membrane en courant-imposé (« current-clamp »). L'un des inconvénients majeurs de cette configuration est la possibilité que certains éléments cytoplasmiques soient susceptibles de diffuser dans le milieu intrapipette et ainsi de perturber la régulation du canal

étudié. Les configurations cellule-attaché et patch-excisé permettent de mesurer des activités de canaux unitaires alors que la configuration cellule-entière s'intéresse à des courants globaux.

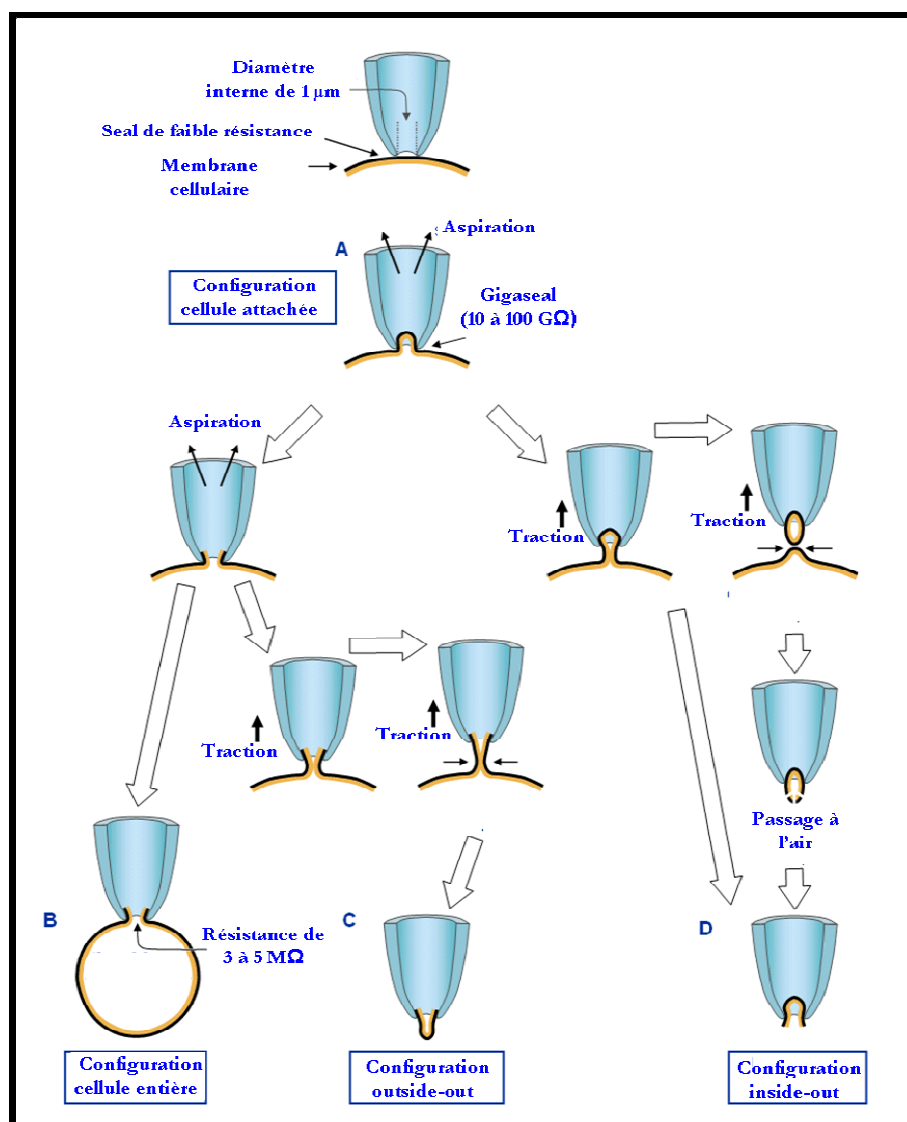


Figure 33 : Les différentes configurations de la technique de patch clamp : cellule attachée (A), cellule entière (B), « outside-out » (C) et « inside-out » (D).

Les études électrophysiologiques présentées dans cette thèse ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Pascal Mariot. Ces études fonctionnelles ont été réalisées par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (« Whole-cell »), le milieu intracellulaire (intrapipette) d'enregistrement contenant 145 mM K-Gluconate, 5 mM HEPES, 1 mM EGTA, 2 mM MgCl₂. Le milieu extracellulaire contenait 2 mM CaCl₂, 5 mM Glc, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES et 10 mM TEA. L'osmolarité et le pH ont été ajustés respectivement à 290 mOsm.l⁻¹ et à 7,2. Les cellules sont perfusées en continu avec la solution extracellulaire de HBSS, seule ou contenant des agents pharmacologiques.

Résultats

Article 1

Bisphenol A stimulates human prostate cancer cells migration *via* remodelling of calcium signalling

Sandra Derouiche, Marine Warnier, Pascal Mariot, Pierre Gosset, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Christian Slomianny, Philippe Delcourt, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki.

(En révision, *Springer Plus*)

L'un des mécanismes par lequel le BPA pourrait favoriser l'avancé des cancers prostatiques serait une modulation de l'homéostasie calcique des cellules cancéreuses prostatiques. En effet, la libération du calcium du réticulum entraîne au niveau de la membrane plasmique une entrée de calcium liée à l'ouverture des canaux calciques de type SOC (Store- Operated Channel). Ce processus appelé « entrée capacitative » ou SOCE (Store- Operated Calcium Entry) est retrouvé dans une grande variété de cellules non excitables et permet à la cellule de reconstituer ses réserves calciques intracellulaires. Cette entrée de calcium via les canaux calciques de type SOC joue un rôle majeur dans la régulation et le contrôle des événements cellulaires conduisant à la prolifération, l'apoptose ou la migration.

Des travaux menés au sein de notre laboratoire ont permis de mettre en évidence cette entrée capacitive de calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines (Skryma, *et al.*, 2000) et d'en identifier les acteurs moléculaires (Flourakis, *et al.*, 2010, Vanden Abeele, *et al.*, 2003b, Vanoverberghe, *et al.*, 2004). Nous nous sommes donc intéressés à l'implication potentielle de ces différents acteurs calciques dans les effets du BPA sur le développement tumoral prostatique.

Dans le cadre de cette étude, nous avons montré par la technique de migration en chambres de Boyden qu'un prétraitement des cellules cancéreuses prostatiques humaines (LNCaP) au BPA (1-10 nM) provoquait leur migration. Par la technique d'imagerie calcique, nous avons également démontré que ces prétraitements au BPA induisaient une amplification de l'influx calcique SOCE (Calcium Store-Operated Calcium Entry) ou entrée capacitive dans les cellules LNCaP. Les techniques de RT-PCR et de Western blot nous ont ensuite permis d'identifier les protéines de canaux ioniques régulées par les prétraitements au BPA dont notamment la protéine Orai1, protéine connue pour être un acteur important du SOCE dans de nombreux systèmes cellulaires, y compris les cellules cancéreuses prostatiques humaines. A l'aide de siARN dirigés contre Orai1, nous avons pu observer que cette protéine jouait un rôle important dans l'amplification de l'influx calcique SOCE induite par le BPA. De manière intéressante, la migration cellulaire induite par le BPA des cellules cancéreuse prostatiques

était supprimée lorsque l'entrée de calcium était réduite par l'utilisation d'inhibiteurs du SOCE ou par chélation du calcium extracellulaire. Ces résultats montrent que le BPA induit la migration des cellules cancéreuses prostatiques par la modulation de l'expression des protéines des canaux ioniques impliquées dans l'entrée capacitive de calcium, notamment le canal Orai1.

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme moléculaire impliqué dans les effets des facteurs environnementaux favorisant la progression des cancer prostatiques en absence d'androgènes. Ces données suggèrent également la nécessité de mesures préventives concernant les exposition aux facteurs environnementaux chez les patients atteints de cancers prostatiques. Cette étude suggère également la possibilité d'utiliser les canaux ioniques impliqués dans l'influx calcique SOCE (Orai1) en tant que cibles thérapeutiques pour empêcher la croissance et les métastases des cellules cancéreuses prostatiques.

Bisphenol A stimulates human prostate cancer cells migration *via* remodelling of calcium signalling

Sandra Derouiche^{*}, Marine Warnier^{*}, Pascal Mariot^{*}, Pierre Gosset^{**}, Brigitte Mauroy[§], Jean-Louis Bonnal[§], Christian Slomianny^{*}, Philippe Delcourt^{*}, Natalia Prevarskaya^{*} and Morad Roudbaraki^{*†}.

^{*1}Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

^{**}Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille

[§]Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert

Running title: Bisphenol A and prostate cancer cell migration.

[†] To whom correspondence should be addressed
Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003
SN3, USTL, 59655 Villeneuve d'Ascq, France
Fax: (33) 3 20 43 40 66
Tel : (33) 3 20 33 64 23
e-mail: morad.roudbaraki@univ-lille1.fr

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA), the principal constituent of reusable water bottles, metal cans, and plastic food containers, was shown to be involved in human prostate cancer cells proliferation. The aim of the present study was to explore the effect of BPA on the migration of the PCa cells and the pathways involved in these processes. Using transwell technique, we clearly show for the first time that the pre-treatment of the cells by BPA (1-10 nM) induces the migration of human prostate cancer cells. By calcium imaging technique, we show that BPA pre-treatment induces an amplification of Store-Operated Calcium Entry (SOCE) in LNCaP cells. RT-PCR and Western blot experiments allowed to identify the ion channels proteins up-regulated by BPA pre-treatments including Orai1 protein known as an important actor of SOCE in different cell systems including human prostate cancer cells. Using siRNA strategy, we observed that BPA-induced amplification of SOCE was Orai1-dependent. Interestingly, the BPA-induced prostate cancer cell migration was suppressed when the calcium entry was impaired by using the inhibitors of SOCE (SKF96365, BTP-2) or when the extracellular calcium was chelated. Taken together, the present work shows that BPA induces prostate cancer cells migration via modulation of ion channels protein expression involved in calcium entry and in cancer cells migration. The present data provide novel insights into the molecular mechanisms involved in the effects of an environmental factor on cancer cells and suggest the necessity of preventive measures and ion channels targeting for the treatment of prostate cancer cells metastasis.

Key words: Environmental factors, Bisphenol A, cell migration, Calcium signalling, ion channels, prostate cancer.

BACKGROUND

Prostate cancer is the most commonly diagnosed malignancy in the United States and the second leading cause of cancer death in men. Early prostate cancers require androgen to survive and proliferate; this dependence is exploited in treatment for disseminated disease where androgen ablation is in the first line of therapeutic intervention. Although these regimens are initially effective, tumors ultimately recur due to reactivation of androgen receptor (AR) signalling, causing treatment failure and patient morbidity. Despite the importance of understanding androgen action in the prostate, little is understood about the mechanisms underlying androgen independence, and the means by which the androgen requirement is bypassed in relapsed tumors. As such, identifying the factors affecting androgen deprivation therapy efficacy is essential to improve the outcome of prostate cancer treatment and thereby to increase patient survival.

Accruing evidence indicates that exposure to environmental compounds, "endocrine disrupting compounds", or EDCs, may adversely impact human health through multiple mechanisms including alteration of hormone receptors function (Henley and Korach, 2006, Welshons, *et al.*, 2003). In humans, a putative link has been established between increased abundance of EDCs in the environment and rising hormone-dependent cancer incidence (Huff *et al.* 1996). Thus, recent investigations have placed particular emphasis on delineating the consequence of EDC exposure on different tissues including the reproductive tissues.

One such environmental factor is bisphenol A (BPA), a non-planar plasticizer leached in microgram quantities from polycarbonate plastics and epoxy resins into food and water supplies (Welshons, *et al.*, 2003). Studies showed that up to 95% of adults have detectable BPA

in their urine (Calafat, *et al.*, 2005), with adult serum concentrations reported to range in nanomolar concentrations [reviewed by (Welshons, *et al.*, 2006)]. Further, BPA has been shown to be involved in prostate carcinogenesis. In recent studies in animals, Ho *et al.* (2006) showed that perinatal exposure to BPA at low doses results in increased sensitivity to estrogen as the male animal ages and an increased risk of developing prostate cancer (Ho, *et al.*, 2006). At environmentally relevant levels (1nM), BPA has been also identified as a mitogen for a subset of prostate cancer cell lines (Wetherill, *et al.*, 2002, Wetherill, *et al.*, 2005, Wetherill, *et al.*, 2006) and has been shown to accelerated tumor growth after androgen ablation (Wetherill, *et al.*, 2006). BPA was shown also to induce the growth and resistance to apoptosis of human breast cancer cells suggesting that hormone-dependent tissues are the target of the environment factor (LaPensee, *et al.*, 2010, Pupo, *et al.*, 2012).

Another aspect of the evolution of the tumor cells is their metastasis, specially the bone metastasis, the major cause of death from prostate cancer. Invasion of cancer cells into surrounding tissue and the vasculature is an initial step in tumor metastasis, a very complicated process during which cancer cells go through a series of steps: (i) cell dissociation from the primary tumor environment, (ii) cells migration to the adjacent tissues, (ii) cell adhesion to the endothelial surface, (iii) cell invasion through the endothelial surface, (iv) cell invasion into new environment, and (v) cell proliferation. The environmental factors such as BPA could affect all steps of the metastasis including the cell migration. But the data on the effects of BPA on human cancer cells migration are missing.

Accumulating data show that cell proliferation, apoptosis and migration are paralleled by altered function and/or expression of ion channels involved in the signalling of those fundamental cellular mechanisms (Lang, *et al.*, 2005, Prevarskaya, *et al.*, 2011). A ubiquitous Ca^{2+} influx pathway that is activated by intracellular Ca^{2+} store depletion is store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) which is activated through a complex interplay between a Ca^{2+} channel at the cell membrane, Orai1, and a Ca^{2+} sensor localized to the endoplasmic reticulum, STIM1 (Courjaret and Machaca, 2012). Recently, a number of known molecular players in cellular Ca^{2+} homeostasis, including Orai1, STIM1 and transient receptor potential (TRP) channels have been implicated in tumour cell migration and the metastatic cell phenotype (for review see Prevarskaya *et al.*, 2011). We previously showed that TRPC1, TRPV6 and Orai1 are the main actors of SOCE in human prostate cancer cells LNCaP.

Here, for the first time, we investigated the impact of BPA on cell migration of the human prostate cancer cells and the mechanisms involved in these cells. In the latter context, we studied the impact of BPA on calcium signalling, on the expression of ion channels involved in SOCE and cell migration of human prostate cancer cells in the absence of androgens.

RESULTS

BPA increases the migration of prostate cancer cells

Previous works showed clearly that BPA induced cell proliferation in androgen-dependent human prostate cancer cells (Wetherill, *et al.*, 2005). In addition to cell growth, cancer metastasis is significantly involved in the progression of the disease and leading to death. Cancer cell migration and invasion play very important roles in cancer metastasis. So, we further studied the effects of BPA on migration and invasion as well as the related calcium signalling in androgen-dependent and independent human prostate cancer cells. Migration assay using transwell chambers showed that BPA at low concentrations of 1 and 10 nM importantly increased the migration of LNCaP cells with an increase rate of 800% and 900%, respectively after the cells were treated for 48 h with BPA before performing the migration assays (Fig. 1A and 1B). We further studied the mechanisms involved in the effects of BPA on prostate cancer cells.

Effects of BPA on calcium signalling in prostate cancer cells

Several studies showed that an increase in intracellular calcium originated from extracellular source greatly promotes the migration of cancer cells (Saidak, *et al.*, 2009, Yang, *et al.*, 2009a). Yang and colleagues (2009) showed clearly that store-operated calcium entry channels (Orai1 and STIM1) are essential for breast tumor cell migration *in vitro* and tumor metastasis in mice. In this context, BPA could induce the activation and/or over-expression of ion channels proteins involved in calcium entry and thus favour the prostate cancer cells migration. First, we examined the direct effects of BPA on the free cytosolic calcium concentration. When different concentrations of BPA were applied to LNCaP cells, an androgen-independent prostate cancer cell line (Fig. 2A) and LNCaP-C4.2 cells, a more invasive cell line derived from LNCaP cells (Fig. 3A), no significant modification of the basal calcium was observed. We further examined the modification of the calcium signalling and remodelling of the expression of the ion channels in prostate cancer cells after a pre-treatment by BPA.

To verify the possible modification of the calcium signalling in BPA-treated cells, a test was used to compare the rate of calcium entry in control and in BPA-treated cells as described in the following section.

Ca^{2+} entry, but not Ca^{2+} release, is increased in BPA-treated LNCaP cells.

We previously showed that the application of the store-depleting SERCA inhibitor thapsigargin (TG) induces a calcium mobilization from intracellular stores and a calcium entry due to SOCE in human prostate cancer cells (Lallet-Daher, *et al.*, 2009).

The two phases of free intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) changes were separated using a Ca^{2+} add-back protocol. Addition of the store-depleting

SERCA inhibitor thapsigargin (TG, 200 nM) in nominally Ca^{2+} -free solution was followed by rapid, transient increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, as measured by calcium imaging (Fig. 2B). Subsequent addition of Ca^{2+} to the extracellular bath resulted in a rapid and sustained increase in cytosolic Ca^{2+} due to SOCE. In these experiments, we observed that when the cells were cultured in steroids-free medium (CS-RPMI), the amplitude of the SOCE was significantly reduced (40 to 50%) compared to that developed in cells cultured in normal RPMI containing steroids (data not shown). TG-mediated Ca^{2+} signalling was then studied in LNCaP treated with BPA for 24, and 48 h. At 24 h (Fig. 2B), the amplitude of the Ca^{2+} entry (SOCE) was increased by $40 \pm 15\%$ compared to that developed in the cells cultured for the same periods in CS-RPMI alone (CTL). These effects of BPA reached $100 \pm 14\%$ when the cells were pre-treated by BPA 1 nM (Fig. 2C and 2D) and 10 nM (Fig. 2E and 2F) for 48 h. Similar amplifications of the SOCE were observed for LNCaP-C4.2, a more invasive cell line derived from LNCaP cells (Fig. 3B and 3C). These observations suggest that BPA modulates the expression of the ion channels involved in the SOCE in human prostate cancer cells. The identification of these ion channels could allow to draw the mechanism by which BPA modulates these cancer cells migration.

BPA up-regulated ion channels expression in prostate cancer cell lines

Our previous studies showed that several ion channels mainly the calcium channels (Orai1/STIM1, TRPV6) and potassium channels (IKCa1, BKCa) were involved in the generation of the SOCE in human prostate cancer cells (Flourakis, *et al.*, 2010, Lallet-Daher, *et al.*, 2009, Vanden Abeele, *et al.*, 2003a, Vanden Abeele, *et al.*, 2003b). Further experiments explored thus the impact of 48 h exposure of the cells to BPA on the expression of these calcium and potassium channels involved in SOCE at the mRNA and protein level by RT-PCR and by western blotting. As shown in Fig. 3, the rate of Orai1 transcript (Fig. 3A) and protein (Fig. 3B) was significantly decreased when the cells were incubated in CS-RPMI, suggesting that the expression of Orai1 is dependent of the steroids. Interestingly, when the cells were treated by 0.1 to 10 nM BPA, the rate of Orai1 protein was greatly increased at the mRNA (Fig. 4A) and protein (Fig. 4B) levels. As shown in Fig. 4C, the expression of Orai1 is induced by the activation of the Androgen Receptor by DHT 1 nM and BPA mimicked these effects of DHT on Orai1 expression suggesting that at least in part, the effects of Orai1 could be mediated by the activation of the AR by BPA. In these experiments, BPA failed to affect significantly the expression of the Orai1 partner, STIM1 (Fig. 4D). The up-regulation of Orai1 protein by BPA is confirmed by immunofluorescence studies performed on LNCaP cells. The incubation of the cells in CS-RPMI (-ST) decreased the expression of the Orai1 staining and the 1 nM BPA treatments of cells for 48 h induced an intense staining of Orai1 protein (Fig. 4E). As these experiments of Orai1 proteins are performed on LNCaP prostate cancer cell line, we studied the expression of Orai1

protein in 3 human prostate cancer tissues of grade 3 by immunofluorescence. As shown in Fig. 4F, the Orai1 immunostaining was observed in epithelial cells of the acini as well as in stromal cells suggesting a role for the protein in both epithelial and stromal cells compartments of the prostate cancer tissues. Further experiments dealing with the modulation of other calcium channels and potassium channels potentially involved in SOCE LNCaP cells showed a clear modification of the expression in BPA-treated cells. In the same manner, the expression of TRPV6 calcium channel (Fig. 5A) and those of BKCa1 and IKCa1 Ca^{2+} -activated potassium channels (Fig. 5B) was clearly induced. The up-regulated potassium channels (BKCa and IKCa1), by hyperpolarizing the membrane potential, may be implicated in the BPA-induced amplification of SOCE by favouring the driving force for the calcium entry through Orai1 and TRPV6.

Involvement of Orai1 in BPA-induced modification of calcium signalling

It has been previously shown that Ca^{2+} influx is essential for the migration of various cell types, including tumor cells (Komuro and Rakic, 1993, Marks and Maxfield, 1990, Nishiyama, *et al.*, 2003, Yang and Huang, 2005) In addition, recent data showed clearly that Orai1 and STIM1, both of which involved in store-operated calcium entry, are essential for tumor cell migration *in vitro* and tumor metastasis in mice (Yang, *et al.*, 2009a). Thus, the BPA-induced up-regulation of the Orai1 might be involved in the effects of the environmental factor on cell migration. In this context, we studied the involvement of the Orai1 protein in the effects of BPA on calcium signalling in LNCaP cells. The cells were treated with Orai1 targeting siRNA (siOrai1, 20 nM) for 48 h during the BPA treatments of the cells and then calcium imaging experiments were performed using the protocol described in Fig. 2. As shown (Fig. 6A and B), the treatment of the cells by siOrai1 suppressed the BPA-induced SOCE amplification by 60 to 80%. In these experiments, the siOrai1 treatments of the cells without BPA treatments did not modify the amplitude of the calcium entry and the siTRPV6 treatments in the presence of BPA 1 and 10 nM failed to inhibit the BPA-induced amplification of the calcium entry induced by TG (data not shown). Taken together, these data suggest that the up-regulation of Orai1 is involved in the amplification of the calcium entry induced by BPA.

Involvement of calcium entry in BPA-induced cell migration

We showed that Orai1 protein was up-regulated under BPA treatments of the LNCaP cells and that Orai1 was involved in the amplification of the calcium entry in these cells. To further investigate the correlation between Ca^{2+} influx and SOCE and cell migration induced by BPA, we studied the effect of blocking Ca^{2+} influx on the cell migration in LNCaP cells. Using transwell migration assay, we observed that when the

cells were incubated in calcium depleted medium by addition of 1 mM EGTA (Calcium chelating agent) reducing the extracellular free calcium to nominally 200 nM, the BPA (10 nM)-induced migration of the LNCaP cells were completely inhibited (*Fig. 7A and B*). In the same manner, to study the involvement of SOCE in BPA-induced migration, cells were treated with an inhibitor of store-operated Ca^{2+} entry (SKF96365, 20 μM) in the presence of BPA (10 nM). As shown in *Fig. 7A and 7B*, SKF96365 blocked the BPA-induced cell migration rate. When the experiments were performed using a pyrazole derivative BTP2 (2 μM) known to inhibit calcium channels involved in SOCE including Orai1 (Eltit, *et al.*, 2010) (*Fig. 7B*), the BPA-induced cell migration was inhibited by $63\pm 11\%$. These pharmacological inhibitors data show that blocking Ca^{2+} influx inhibits BPA-induced migration of LNCaP cells, and that the store-operated Ca^{2+} entry channels including Orai1 are involved in the effects of BPA in cell migration.

BPA increases the migration of androgen-independent prostate cancer cells

Previous studies reported by Wetherill *et al.* (2005) showed that low concentrations of BPA induced the proliferation in AR-dependent cells but the environmental factor failed to affect growth of AR-negative, androgen-independent prostate cancer cell lines (PC-3 and DU-145). In the present study, we examined the effects of BPA on the migration of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. The cells were incubated for 48 h in CS-RPMI complemented or not by BPA at different concentrations. The cells were then wounded using a sterile tip and incubated in the corresponding media for an additional 15 h before the microscopic examinations of the wound healing of the cells. As shown in *Fig. 8A*, these *in vitro* scratch tests of PC-3 cells showed an increase in cell wound closure in response to BPA, suggesting the induction of cell migration by BPA in androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. In order to study the effects of BPA on Orai1 protein expression, Western blot experiments were performed on total proteins of the PC-3 cells treated for 48 h by BPA at different concentrations. As shown in *Fig. 8B*, BPA induced a dose-dependent expression of Orai1 in PC-3 cells.

DISCUSSION

It has been suggested that the environment factor BPA may play an important role in the initiation (Ho, *et al.*, 2006) and progression in of the prostate cancer and in hormonal therapy bypass (Wetherill, *et al.*, 2005). At the level of prostate cancer cells, BPA was able to induce androgen-independent tumor cell proliferation and reduced therapeutic efficacy in xenograft models (Wetherill, *et al.*, 2006). While these data point toward the potential for BPA to assist tumor cells in escaping therapy, the molecular mechanisms of this process were not well known.

This report demonstrates for the first time that low doses (1-10 nM) of the endocrine disruptor BPA induces cell

migration by modulating the cell calcium signalling. The concentrations used in these studies give to this observation environmentally relevant.

Invasion and metastasis are major factors underlying cancer morbidity and mortality (Molloy and Van 't Veer, 2008). Because of the widespread metastasis in advanced cancer patients where a resistance is observed to conventional therapies, mortality rate remains extremely high and warrants new strategies to intervene in the metastatic cascade. Thus, by understanding the molecular events in the pathogenesis of prostate cancer will offer improved diagnosis, prognosis, therapy and prevention measures of the disease that will ultimately help us to eliminate prostate cancer metastasis. A common regulatory point in several signal transduction pathways is intracellular calcium homeostasis. One approach could be to focus on the intracellular signalling pathways underlying the metastatic process. Several data showed clearly the involvement of calcium entry in the cancer and non-cancer cells migration (Bisaillon, *et al.*, 2010, Li, *et al.*, 2011, Schaff, *et al.*, 2010, Yang, *et al.*, 2009a).

In the present work, we clearly show for the first time that pre-treatment of human prostate cancer cells by environmentally relevant concentrations of BPA (1-10 nM) induces their migration (*Fig. 1*). By calcium imaging technique, we show that BPA pre-treatment induces an amplification of Store-Operated Calcium Entry (SOCE) in LNCaP cells (*Fig. 2*). RT-PCR and Western blot experiments allowed us to identify the ion channels proteins up-regulated by BPA pre-treatments including Orai1 protein known to constitute an important actor of SOCE in different cell systems including human prostate cancer cells (*Fig. 3*). Meanwhile, in our studies, we failed to observe any direct effect of BPA on the rate of basal calcium (*Fig. 2*) whereas in other cell systems, BPA or its derivatives induced a calcium increase. In TM4 Sertoli cells, a direct application of a derivative compound of BPA, Tetrabromobisphenol A (TBBPA), a commonly used brominated flame retardant (BFR), induced an increase in basal free calcium rate originated from internal stores (Ogunbayo, *et al.*, 2008). In pituitary tumor cells (GH3/B6/F10 rat Somatomammotropes), Kochukov *et al.* (2009) showed that BPA at 1 nM concentration induced a great increase in Ca^{2+} oscillations frequency, the activation of MAPK pathways (ERK1/2) and subsequently a PRL release (Kochukov, *et al.*, 2009). Similar results were reported by Bulayeva *et al.* (2005) and Wozniak *et al.*, (2005) where the authors demonstrated that the BPA-induced Ca^{2+} influx was strictly dependent on membrane Estrogen Receptor (mER- α) and mediated by L-type voltage-gated Ca channels in pancreatic β cells (Bulayeva, *et al.*, 2005, Wozniak, *et al.*, 2005). The LNCaP cells used in our present work do not express L-type voltage-gated Ca^{2+} channels (non-excitabile cells). This is probably the reason why a direct application of BPA on LNCaP and LNCaP C4.2 cells failed to induce a direct calcium response.

In the present work, when the human prostate cancer cells were pre-treated by BPA (1-10 nM), an increase in SOCE and a remodelling of ion channels expression was observed. The alterations of the ion channels expression could be mediated by stimulation of a signal transduction pathways leading to the activation of nuclear transcription factors. Published data suggest several transduction pathways activated by BPA. In prostate cancer cells, BPA was shown to be an agonist for mutant androgen receptor (AR-T877A) expressed in recurrent prostate cancer (Wetherill, *et al.*, 2002, Wetherill, *et al.*, 2005, Wetherill, *et al.*, 2006) and in LNCaP cell line used in our studies. According to the authors, BPA induces cell proliferation in cells expressing the mutated AR. The clinical ramifications of BPA activating tumor-derived mutant ARs and inducing androgen-independent tumor cell proliferation may be substantial, as BPA can reduce therapeutic efficacy in xenograft models (Wetherill, *et al.*, 2006). In our experiments, the DHT induced the expression of Orai1 (Fig. 4C) and BPA appears to mimic these effects of canonical AR ligand (DHT). However, all the effects of BPA could not be mediated by the activation of AR. In a recent work, Hess-Wilson *et al.* (2007) showed clearly that BPA and DHT elicited distinct transcriptional signatures in prostate cancer cells expressing the BPA-responsive mutant AR-T877A even if some common genes were activated by both DHT and BPA in LNCaP cells (Hess-Wilson, *et al.*, 2007). These observations could explain the cell migration and Orai1 expression induced by BPA in an androgen-independent human prostate cancer cells PC-3 (Fig. 8) where the AR is absent. BPA could thus activate other signal transduction pathways than the AR activation to induce the effects observed in our studies on androgen-insensitive prostate cancer cells PC-3. In this context, BPA was reported to induce the phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and *c-Jun* N-terminal kinase (JNK), and nuclear translocation of nuclear factor (NF)- κ B, in mouse hippocampal HT-22 cells (Lee, *et al.*, 2008). Interestingly, functional NF- κ B-binding sites in promoter regions of STIM1 and Orai1 were identified and the expression of the Orai1 calcium channel was reported to be positively modulated by the NF- κ B (Eylenstein, *et al.*, 2012). Subsequently, the store-operated Ca^{2+} entry was similarly increased by overexpression of p65/p50 or p65/p52 and decreased by treatment with NF- κ B inhibitor Wogonin. BPA could thus interfere with the growth factors signal transduction to activate PI3K/Akt pathway and induce the activation of NF- κ B transcription factor leading to up-regulation of the ion channels expression including Orai1. Several works showed also the stimulation of the PKA/CREB pathways by nanomolar concentrations of BPA through the activation of the mER- α (Bouskine, *et al.*, 2009, Quesada, *et al.*, 2002). But the involvement of this pathway in the expression of the ion channels needs further investigations.

Receptor-mediated activation of phospholipases C by the factors present in the serum leads to IP_3 -mediated depletion of Ca^{2+} from the ER, which in turn stimulates

Ca^{2+} influx through the plasma membrane involving Orai/STIM1 complex formation (Varnai, *et al.*, 2009). Recent works elegantly demonstrated that STIM1, Orai1, and SOCE play critical roles in the migration of a number of cell types in cancer and non-cancer cells (Bisaillon, *et al.*, 2010, Li, *et al.*, 2011). These observations support our data where BPA, by up-regulating the ion channels an increase in SOCE developed by prostate cancer cells in response to factors present in serum.

The BPA-induced cell migration was dependent on the calcium entry and the use of pharmacological tools suggest the involvement of SOCE channels in the BPA effects on cell migration (Fig. 7). Increase in cytoplasmic calcium induced by BPA may have several types of impacts to trigger the cell migration including the induction of the up-regulation of their gene and protein expression, their secretion and the activation of the enzymes such as metalloproteinases (MMP2, MMP9) involved in cell migration. The MMP proteins are clearly shown to be dependent to calcium for their expression (calcium/Calcineurin/NFAT) processing and activity (Collier, *et al.*, 1988, Mukhopadhyay, *et al.*, 2004, Stetler-Stevenson, *et al.*, 1989). These observations suggest that the increase in calcium entry induced by BPA pre-treatment could favour all these processes leading to cell migration.

For the first time, we show also the expression of Orai1 proteins in human prostate cancer tissues (Fig. 4F). As shown, a strong immunostaining of Orai1 protein was found in epithelial cells and also in stromal cells. Thus, the stromal cells could also be influenced by BPA impregnation. Given the importance of the epithelium-stroma (reactive stroma) interactions in the progression of cancer, the potential effects of BPA on calcium signalling and secretion of growth factors by these cells need further investigations.

CONCLUSIONS

BPA is consistently detected in almost all individuals in developed nations (Welshons, *et al.*, 2006), suggesting that humans are exposed to BPA continuously. In addition, the rapid metabolic clearance of BPA and its detectable levels in human blood and urine suggest that the intake of BPA may be higher than indicated by diverse studies and that long-term daily intake may lead to its bioaccumulation leading to adverse effects on human health and on cancer progression. These observations suggest that the BPA concentrations used in the present study is achievable in humans. The present data provide novel insights into the molecular mechanisms involved in the effects of environmental factors which can promote the progression of the cancer in an androgen-independent manner, highlights the urge of preventive measures and suggest potential therapeutic opportunities targeting the ion channels involved in SOCE (Orai1) as a target to prevent the prostate cancer cells growth and metastasis.

METHODS

Chemicals and antibodies

Bisphenol A (BPA) was obtained from Sigma-Aldrich and dissolved in DMSO. Antibodies raised against human ion channel proteins were obtained from commercial sources as follows: Rabbit anti-Orai1 (ProSci Inc.), Rabbit anti-STIM1 (ProSci Inc.), Rabbit anti-TRPC1 (Alomone Labs), Rabbit anti-TRPV6 (Santa Cruz Biotechnology) and Rabbit anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Cell Culture

LNCaP, LNCaP-C4.2 and PC-3 prostate cancer cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), were cultured in RPMI 1640 and serum as described by Gackière *et al.* (Gackiere, *et al.*, 2006). For BPA experiments, the cells were treated Phenol red-free RPMI 1640 containing charcoal-stripped Foetal Calf Serum (FCS) (CS-RPMI). In order to avoid the interference of BPA added for our studies and those leached from RPMI 1640 commercialized in polycarbonate bottles, the medium was prepared in glass bottles using RPMI 1640 powder commercialized by SIGMA (L'Isle d'Abeau, France) in ultrapure water and then filtered on 0.2 μ m filter (Thermo Scientific Nalgene, Fontenay-sous-Bois France).

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA isolation and RT-PCR experiments were performed as described earlier (Roudbaraki, *et al.*, 1999). The PCR primers (Orai1: 5'-CTTCTTCGACCTCGTCCTCCT-3' and 5'-CGTAAGGCCAAAGCATGGAA-3'; β -actin : 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' and 5'-GTTGAAGGTCTCAAACATGATC-3' used in this study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The amplified PCR products were of 406 and 212 bp respectively.

siRNA transfections

For siRNA experiments, equal numbers of cells from the same culture were seeded transfected overnight with 20 nM of control siRNA (targeting Luciferase mRNA) (Eurogentec, Belgium) or raised against Orai1 mRNA (siOrai1) (5'-UGAGCAACGUGCACAAUCU (dTdT)-3') using Hyperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) in CS-RPMI containing 10% SVF according to the manufacturer's instructions. Medium was changed after 24 h and cells were incubated for a further 48h with or without BPA before performing calcium imaging experiments. We previously showed the efficiency of the siOrai1 used in the present study to down-regulate the expression of the Orai1 protein in LNCaP cells (Flourakis, *et al.*, 2010).

Orai1 immunofluorescence studies

The protein expression studies of the ion channels in PCa cells was determined by indirect immunofluorescence

analysis performed on acetone fixed cells. Cells grown on glass coverslips were incubated with PBS containing 0.2% BSA, 0.1% TritonX-100 and 5% donkey serum for 30 min at room temperature, in order to block the non-specific bindings and to permeabilize the cells. They were then incubated overnight at 4°C with PBS/5% non-immunized serum containing a 1:50e dilution of the primary affinity-purified rabbit anti-Orai1 polyclonal antibody. Cells were then washed with PBS and were incubated with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (A-21206; Molecular Probes; dilution 1:2000e) diluted in PBS for 1 h at room temperature. After rinsing three times in PBS, the slides were mounted with Mowiol and the distribution of the labelled proteins was analysed by confocal immunofluorescence microscopy (Zeiss LSM 510; acquisition parameters: objective 40x/1.3; thickness of confocal slide, 1 μ m).

For immunofluorescence studies of Orai1 protein in human prostate cancer, tissues were obtained from consenting patients following the local ethical considerations. The tissues were diagnosed as cancerous or not by anatomopathological examinations. Tissues were from patients prior to any anticancer therapy (chemotherapy, radiotherapy) and were obtained following an office procedure, frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and kept in "Tissue-Tek®" at -80°C before 10 μ m cryosections were realized at -20°C with a cryostat and mounted on glass slides for immunofluorescence studies. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number "CP 01/33", issued by the "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche. The immunofluorescence experiments for the detection of Orai1 on 7 μ m cryosections was realised following the same procedure as for the PCa cell lines using anti-Orai1 antibody and analysed by confocal microscopy.

Western Blot Assay

Cells cultured at 80% confluence were harvested and total proteins extracted. 40 micrograms of each sample were analysed by SDS-PAGE on 10% acrylamide and processed for western-blotting using antibody as described by (Vanoverberghe, *et al.*, 2004) using BKca (Alomone, 1:500e), TRPV6 (Alomone, 1:500e), TRPC1 (Alomone, 1:500e), Orai1 (ProSci 1:500e), STIM1 (ProSci, 1:500e), IKCa1 (Santa Cruz, 1:200e). Western blotting was performed with the ECL chemiluminescence kit (Millipore). Quantitative evaluation of protein expression was analyzed by ImageJ software.

[Ca²⁺]_i Measurements

Cells were grown on glass coverslips for [Ca²⁺]_i imaging experiment and, before each experiment, the cells were loaded with Fura-2 by adding 2 μ M Fura-2 AM (Fura-2 Acetoxymethyl ester) (Calbiochem, Meudon , France) in the culture medium for 45 min at 37°C. After incubation, cells were washed three times in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution; 142 mM

NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 340 μM Na₂PO₄, 440 μM KH₂PO₄, 10 mM Hepes, 5.6 mM glucose and buffered to pH 7.4). When a Ca²⁺-free medium was required, CaCl₂ was omitted and replaced by equimolar MgCl₂. The fluorescent intensity of Fura-2 in each cell was monitored and recorded at 340 and 380 nm. To represent the variation of the intracellular free calcium concentration, either the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic Ca²⁺ concentration or a calibration is used to represent the variations in concentrations (nM). All measurements shown are averages of 35–45 cells from a minimum of four experiments on different cell cultures.

Cell migration assays

Cell migration assays were performed in duplicate in modified Boyden chambers consisting in counting cells migrating through a porous membrane containing 8 μm pores (BD Biosciences, Oxford Science Park, Oxford, UK). After trypsinisation, cells in suspension (1 × 10⁵) were loaded in the upper chamber in phenol-red RPMI without FCS. The lower chamber contained RPMI and 10% charcoal-stripped (CS)-FCS (CS-RPMI). The upper and lower chambers contained the same concentration of BPA when tested. After 16 h to 24 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator, cells that had attached but not migrated were scraped from the upper surface, membranes were fixed in 70% methanol at -20°C and the migrated cells were stained for nuclei with Hoechst 33342 dye (1 μg/mL) (blue fluorescent) and evaluated by counting cell nuclei in 10 randomly chosen fields under fluorescence microscopy. The results are presented as a percentage of control (CTL) where cells were incubated in CS-RPMI culture medium alone. Alternatively, the Wound Healing Assay was also used to study the prostate cancer cells migration. The cells were seeded in a 12-well plate (15 × 10⁴). After the cells formed a confluent mono layer, scratches were performed using a 100 μl tip. The wells were washed with PBS followed by addition of BPA at different concentrations in CS-RPMI. The closure of scratch was analyzed under the microscope and images were captured at 1 and 15 or 24 h after incubations in the presence or absence of BPA.

Statistical analysis

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

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by grants from Région Nord Pas-de-Calais, INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mrs Elodie Richard for the technical assistances in image analysis by confocal microscopy and Michèle Masurelle for assistance in the preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Bisaillon JM, Motiani RK, Gonzalez-Cobos JC, Potier M, Halligan KE, Alzawahra WF, Barroso M, Singer HA, Jourdeuil D & Trebak M (2010) Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, 298, C993-1005.
- Bouskine A, Nebout M, Brucker-Davis F, Benahmed M & Fenichel P (2009) Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect*, 117, 1053-8.
- Bulayeva NN, Wozniak AL, Lash LL & Watson CS (2005) Mechanisms of membrane estrogen receptor-alpha-mediated rapid stimulation of Ca²⁺ levels and prolactin release in a pituitary cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E388-97.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J & Needham LL (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 113, 391-5.
- Collier IE, Wilhelm SM, Eisen AZ, Marmer BL, Grant GA, Seltzer JL, Kronberger A, He CS, Bauer EA & Goldberg GI (1988) H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem*, 263, 6579-87.
- Courjaret R & Machaca K (2012) STIM and Orai in cellular proliferation and division. *Front Biosci (Elite Ed)*, 4, 331-41.
- Eltit JM, Feng W, Lopez JR, Padilla IT, Pessah IN, Molinski TF, Fruen BR, Allen PD & Perez CF (2010) Ablation of skeletal muscle triadin impairs FKBP12/RyR1 channel interactions essential for maintaining resting cytoplasmic Ca²⁺. *J Biol Chem*, 285, 38453-62.

- Eylenstein A, Schmidt S, Gu S, Yang W, Schmid E, Schmidt EM, Alesutan I, Sztejn K, Regel I, Shumilina E & Lang F (2012) Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. *J Biol Chem*, 287, 2719-30.
- Flourakis M, Lehen'kyi V, Beck B, Raphael M, Vandenberghe M, Abeele FV, Roudbaraki M, Lepage G, Mauroy B, Romanin C, Shuba Y, Skryma R & Prevarskaya N (2010) Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis*, 1, e75.
- Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N & Mariot P (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium*, 39, 357-66.
- Henley DV & Korach KS (2006) Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology*, 147, S25-32.
- Hess-Wilson JK, Webb SL, Daly HK, Leung YK, Boldison J, Comstock CE, Sartor MA, Ho SM & Knudsen KE (2007) Unique bisphenol A transcriptome in prostate cancer: novel effects on ERbeta expression that correspond to androgen receptor mutation status. *Environ Health Perspect*, 115, 1646-53.
- Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J & Prins GS (2006) Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res*, 66, 5624-32.
- Kochukov MY, Jeng YJ & Watson CS (2009) Alkylphenol xenoestrogens with varying carbon chain lengths differentially and potently activate signaling and functional responses in GH3/B6/F10 somatomammotropes. *Environ Health Perspect*, 117, 723-30.
- Komuro H & Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260, 95-7.
- 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, Bonnall JL, Skryma R & Prevarskaya N (2009) Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene*, 28, 1792-806.
- Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, Vereninov A & Huber SM (2005) Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol*, 205, 147-57.
- LaPensee EW, LaPensee CR, Fox S, Schwemberger S, Afton S & Ben-Jonathan N (2010) Bisphenol A and estradiol are equipotent in antagonizing cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Cancer Lett*, 290, 167-73.
- Lee S, Suk K, Kim IK, Jang IS, Park JW, Johnson VJ, Kwon TK, Choi BJ & Kim SH (2008) Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci Res*, 86, 2932-42.
- Li J, Cubbon RM, Wilson LA, Amer MS, McKeown L, Hou B, Majeed Y, Tumova S, Seymour VA, Taylor H, Stacey M, O'Regan D, Foster R, Porter KE, Kearney MT & Beech DJ (2011) Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ Res*, 108, 1190-8.
- Marks PW & Maxfield FR (1990) Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol*, 110, 43-52.
- Molloy T & Van 't Veer LJ (2008) Recent advances in metastasis research. *Curr Opin Genet Dev*, 18, 35-41.
- Mukhopadhyay S, Munshi HG, Kambhampati S, Sassano A, Platanius LC & Stack MS (2004) Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*, 279, 33139-46.
- Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier-Lavigne M, Poo MM & Hong K (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*, 423, 990-5.
- Ogunbayo OA, Lai PF, Connolly TJ & Michelangeli F (2008) Tetrabromobisphenol A (TBBPA), induces cell death in TM4 Sertoli cells by modulating Ca²⁺ transport proteins and causing dysregulation of Ca²⁺ homeostasis. *Toxicol In Vitro*, 22, 943-52.
- Prevarskaya N, Skryma R & Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer*, 11, 609-18.
- Pupo M, Pisano A, Lappano R, Santolla MF, De Francesco EM, Abonante S, Rosano C & Maggiolini M (2012) Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ Health Perspect*, 120, 1177-82.
- Quesada I, Fuentes E, Viso-Leon MC, Soria B, Ripoll C & Nadal A (2002) Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J*, 16, 1671-3.

- Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H & Denef C (1999) Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology*, 140, 4874-85.
- Saidak Z, Boudot C, Abdoune R, Petit L, Brazier M, Mentaverri R & Kamel S (2009) Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp Cell Res*, 315, 2072-80.
- Schaff UY, Dixit N, Procyk E, Yamayoshi I, Tse T & Simon SI (2010) Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood*, 115, 657-66.
- Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC & Liotta LA (1989) Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem*, 264, 17374-8.
- Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R & Prevarskaya N (2003a) Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1. *J Biol Chem*, 278, 15381-9.
- Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverberghe K, Mariot P, Skryma R & Prevarskaya N (2003b) Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium*, 33, 357-73.
- Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, Mauroy B, Shuba Y, Skryma R & Prevarskaya N (2004) Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ*, 11, 321-30.
- Varnai P, Hunyady L & Balla T (2009) STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci*, 30, 118-28.
- Welshons WV, Nagel SC & vom Saal FS (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*, 147, S56-69.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM & vom Saal FS (2003) Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect*, 111, 994-1006.
- Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW & Knudsen KE (2005) Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res*, 65, 54-65.
- Wetherill YB, Hess-Wilson JK, Comstock CE, Shah SA, Buncher CR, Sallans L, Limbach PA, Schwemberger S, Babcock GF & Knudsen KE (2006) Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Mol Cancer Ther*, 5, 3181-90.
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A & Knudsen KE (2002) The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther*, 1, 515-24.
- Wozniak AL, Bulayeva NN & Watson CS (2005) Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect*, 113, 431-9.
- Yang S & Huang XY (2005) Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem*, 280, 27130-7.
- Yang S, Zhang JJ & Huang XY (2009) Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell*, 15, 124-34.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. BPA induces prostate cancer cells migration. Cell migration was measured via the Transwell chamber assay. (A) Following the BPA treatments for 48 h, LNCaP cells were trypsinized and equal number of live cells were plated into inserts and allowed to migrate for 24 h. Cells in the insert (non migrated cells) were eliminated by scrapping and migrated cells were fixed and nuclei were stained by Hoechst 33342 dye (Blue) and examined under fluorescence microscopy. At least ten different fields per condition were examined and cells counted. Experiments were performed in duplicate and repeated at least twice. (B) Mean data for number of cells migrating in Boyden chambers ('migrated') in control (CTL) conditions where cells were incubated in CS-RPMI alone or with different concentrations of BPA. *, $P < 0.001$ relative to CTL condition.

Figure 2. Effects of BPA on basal calcium and Store-operated Ca²⁺ Entry (SOCE) in LNCaP cells. (A) Cells grown on glass coverslips and cultured in complete medium and then direct effects of BPA at different concentrations on [Ca²⁺]_i were studied by calcium imaging. (B, C, E) Cells grown on glass coverslips and cultured in CS-RPMI alone (CTL) or containing BPA at 1 or 10 nM BPA for 24 h (B) or 48 h (C, E) and then processed by calcium imaging to estimate the amplitude of SOCE. For Ca²⁺ recording,

cells were treated with 200 nM thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) as indicated. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50–80 cells as mean \pm s.e are presented. A quantification of the SOCE for each experiment is presented in (D) and (E) (mean \pm s.e., n=50–80 cells), *P<0.01. The TG application is shown by arrow and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0 Ca^{2+}) to 2 mM (2 Ca^{2+}) are marked by horizontal bars.

Figure 3. Effects of BPA on basal calcium and Store-operated Ca^{2+} Entry (SOCE) in LNCaP C4.2 cells. (A) Cells were grown on glass coverslips and cultured in complete medium and then direct effects of BPA at different concentrations on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were studied by calcium imaging. (B) Cells grown on glass coverslips and cultured in CS-RPMI alone (CTL) or containing BPA at 1 nM BPA for 48h and then processed by calcium imaging to estimate the amplitude of SOCE. For Ca^{2+} recording, cells were treated with 200 nM thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) as indicated. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50–80 cells as mean \pm s.e are presented. A quantification of the SOCE for each experiment is presented in (D) and (E) (mean \pm s.e., n=50–80 cells), *P<0.01. The TG application is shown by arrow and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0 Ca^{2+}) to 2 mM (2 Ca^{2+}) are marked by horizontal bars. The graphs represent the mean peak amplitudes of calcium mobilization and SOCE \pm S.E. of at least three independent experiments and are expressed as the percentage above control value.

Figure 4. Effects of BPA on Orai1 and STIM1 expression in prostate cancer cells. (A), Total RNA was extracted and semi-quantitative RT-PCR experiments performed to study the expression of Orai1 (406 bp) mRNA using specific primers. β -actin mRNA expression (212 bp) was used as an internal standard. PCRs were carried out as described in *Methods* using 40 ng ARN equivalent cDNA from CTL and treated samples. H₂O and samples without reverse transcriptase (not shown) were used as negative controls. Amplified fragments were resolved on 1.5% agarose gel by electrophoresis and visualized by EtBr staining. M, 1-kb DNA ladder, a molecular weight marker. (B, C, D), Effects of BPA on the ion channels proteins expression in LNCaP cells. Following the BPA treatments for 48 h, total proteins were extracted and 10 μ g proteins were analysed on 10% acrylamide gel (SDS-PAGE), transferred on PVDF membranes. Immunoblots were then performed as described in *Methods* for the detection of Orai1 and STIM1. β -actin expression was used for the loading control of the samples. Experiments were performed at least two times in two independent cell cultures and representative figures are presented. Under the panel is

shown the fold variation of the Orai1 and STIM1 proteins in different samples normalized to β -actin expression. (E), Immunofluorescence studies of the effects of BPA on the expression of Orai1 in LNCaP. Cells were cultured for 48 h in the complete medium containing steroids (CTL +ST) or in the same medium without steroids (CS-RPMI, CTL -ST) or in CS-RPMI containing 1 nM BPA. (F), Expression of Orai1 protein in human prostate cancer tissue. Prostate cancer tissue Cryosections were processed by Immunofluorescence for the detection of Orai1. S, Stroma; A, Acinus.

Figure 5. Effects of BPA on the ion channels proteins expression in LNCaP cells. Following the BPA treatments for 48 h, total proteins were extracted and 10 μ g proteins were analysed on 10% acrylamide gel (SDS-PAGE), transferred on PVDF membranes. Immunoblots were then performed as described in *Methods* for the detection of TRPV6 (A), BKCa and IKCa1 (B). β -actin expression was used for the loading control of the samples. Experiments were performed at least two times in two independent cell cultures and representative figures are presented. Under the panel is shown the fold variation of the proteins in different samples normalized to β -actin expression.

Figure 6. Effect of Orai1 knock down on Ca^{2+} entry induced by BPA treatments in LNCaP cells. (A, B) Forty-eight hours prior to recording Ca^{2+} signals by calcium imaging, LNCaP cells were divided into paired groups and transfected with control siRNA (siCTL) or siOrai1 in the presence of BPA 1 and 10 nM. For Ca^{2+} recording, cells were treated with 200 nM thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) as indicated. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50–80 cells as mean \pm s.e are presented. A quantification of the SOCE for each experiment is presented in (B) and (C) (mean \pm s.e., n=50–80 cells), *P<0.001. The TG application is shown by arrow and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0 Ca^{2+}) to 2 mM (2 Ca^{2+}) are marked by horizontal bars.

Figure 7. BPA-induced SOCE is involved in prostate cancer cells migration.

Cell migration was measured via the Transwell chamber assay. (A) Following the 10 nM BPA treatment for 48 h, LNCaP cells were trypsinized and equal number of live cells were plated into inserts and allowed to migrate for 24h in the presence or absence of BPA 10 nM with or without the presence of a Ca^{2+} chelator EGTA (1 mM) or the SOCE inhibitors (SKF, 20 μ M; BTP-2, 2 μ M). Cells in the insert (non migrated cells) were then eliminated by scrapping and migrated cells were fixed and nuclei were stained by Hoechst 33342 dye (Blue) and examined under fluorescence microscopy. At least ten different fields per condition were examined and cells counted. Experiments were

performed in duplicate and repeated at least twice. (B) Mean data for number of cells migrating in Boyden chambers ('migrated') in control (CTL) conditions where cells were incubated in CS-RPMI alone or with different concentrations of BPA in the presence or absence of the EGTA or SOCE inhibitors. *, $P < 0.001$ relative to CTL condition; ** $P < 0.001$ BPA 10 nM *versus* BPA 10 nM + inhibitors

Figure 8. BPA induces the cell migration of androgen-independent prostate cancer cells. (A) Cell migration was studied via the *in vitro* wound healing assay. The PC-3 cells grown to confluent monolayers were incubated for 48 h in CS-RPMI complemented or not by BPA at different concentrations. The cells were then wounded using a sterile tip and incubated in the corresponding

media for an additional 15 h before the microscopic examinations of the wound healing of the cells. Wound healing was examined at 1 and 15 h post-introduction of scratch in at least 3 different previously identified (Blue line) fields per scratch and representative figures for each condition is presented here. (B) Western blot analysis of whole cell lysate proteins of Orai1 in PC-3 cells treated with BPA at different concentrations. The figure is a representative experiment showing the variation of Orai1 protein under BPA treatments. β -actin is used as a sample loading control. Under the panel is shown the fold variation of the Orai1 protein in different samples normalized to β -actin expression. Results shown are representative of at least three independent experiments.

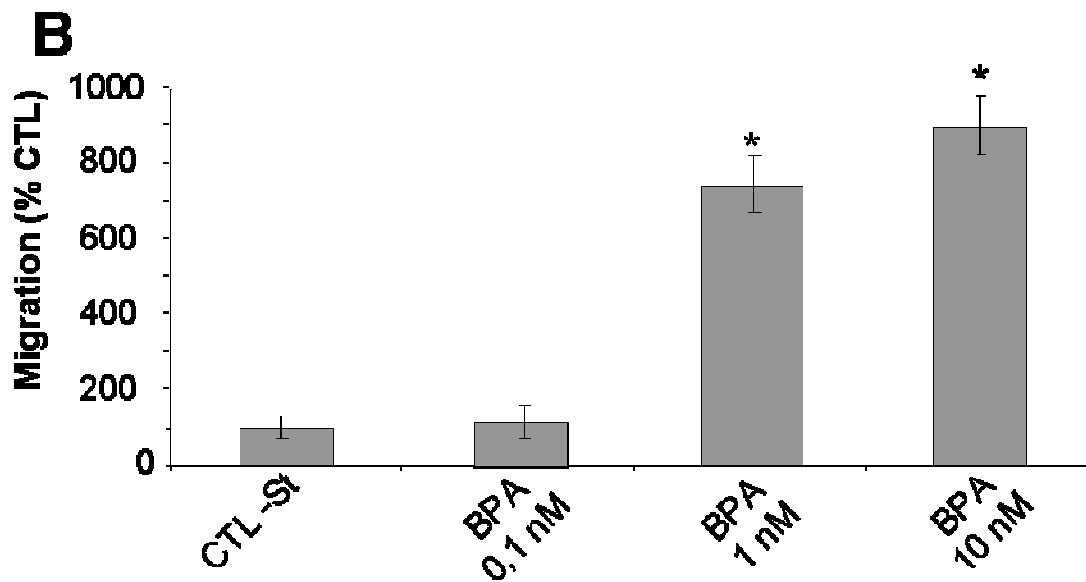
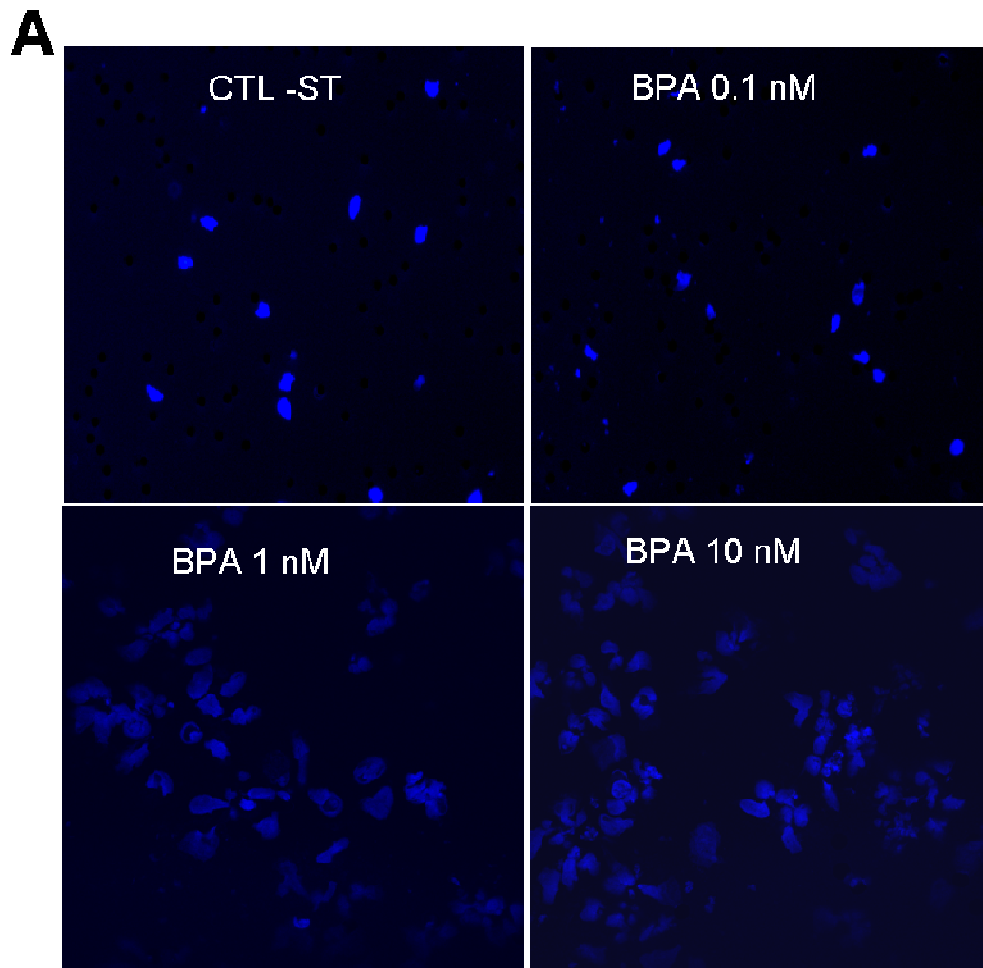


Figure 1: Derouiche et al., 2012

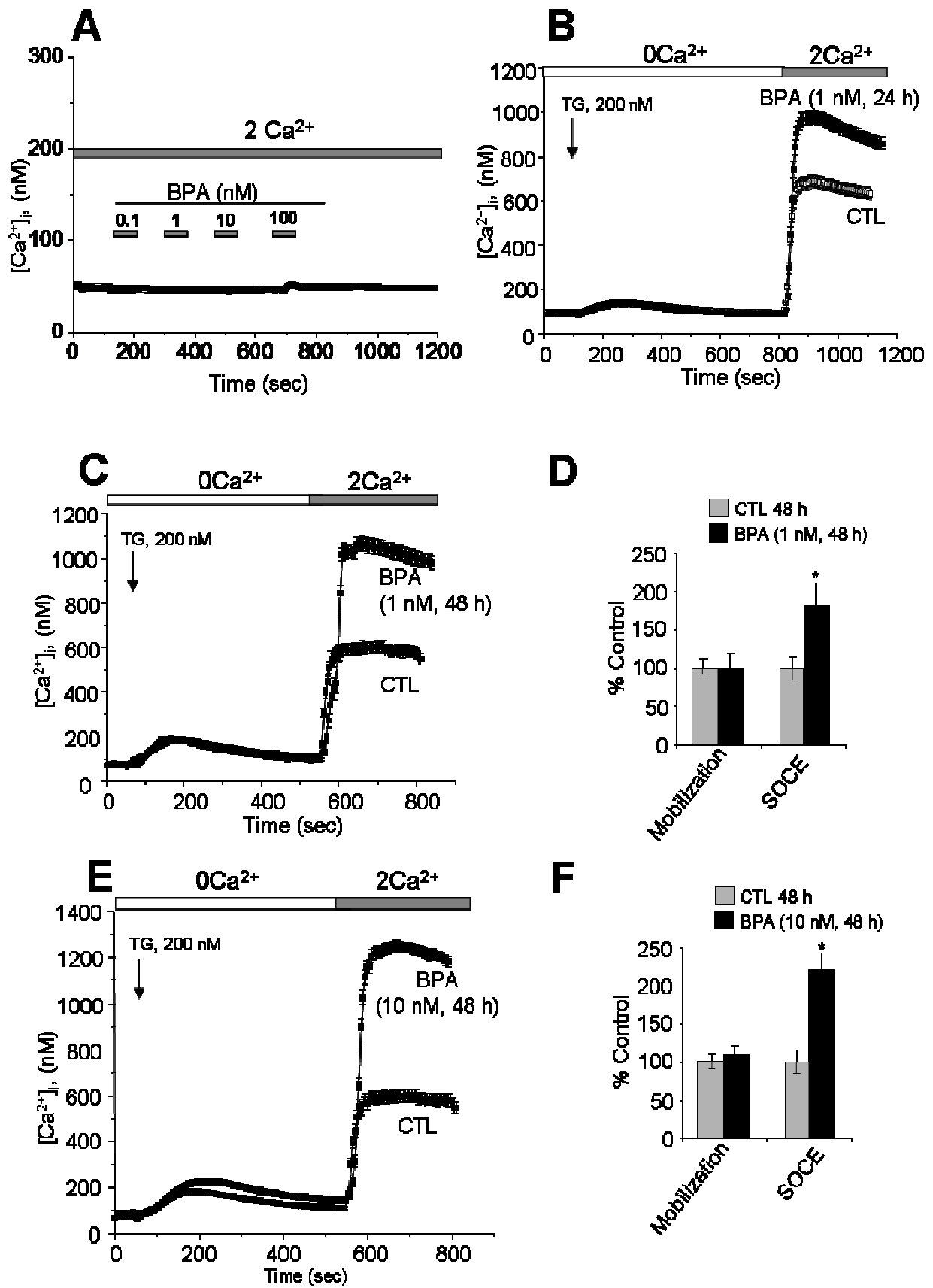


Figure 2: Derouiche et al., 2012

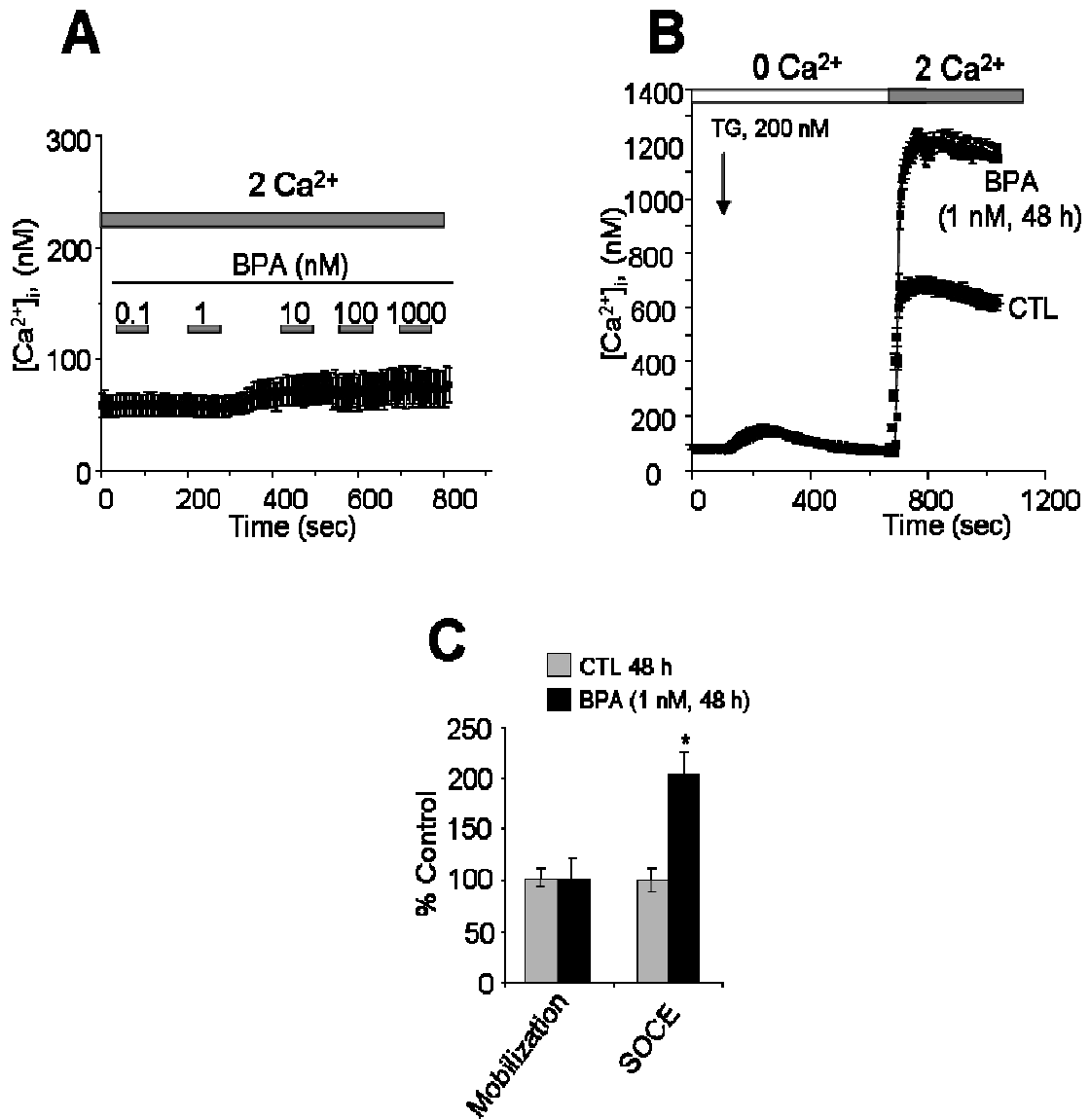


Figure 3: Derouiche et al., 2012

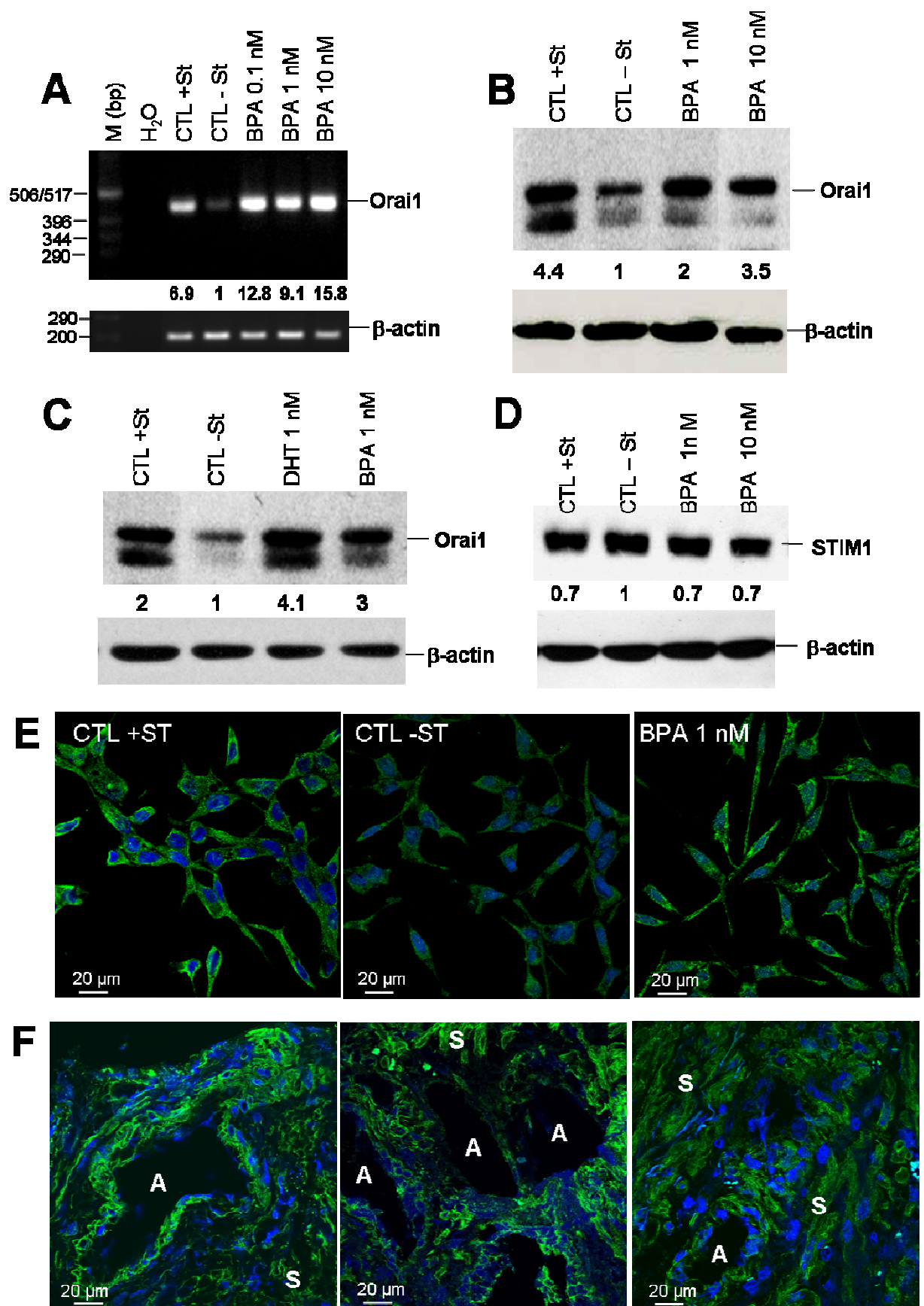


Figure 4 : Derouiche et al., 2012

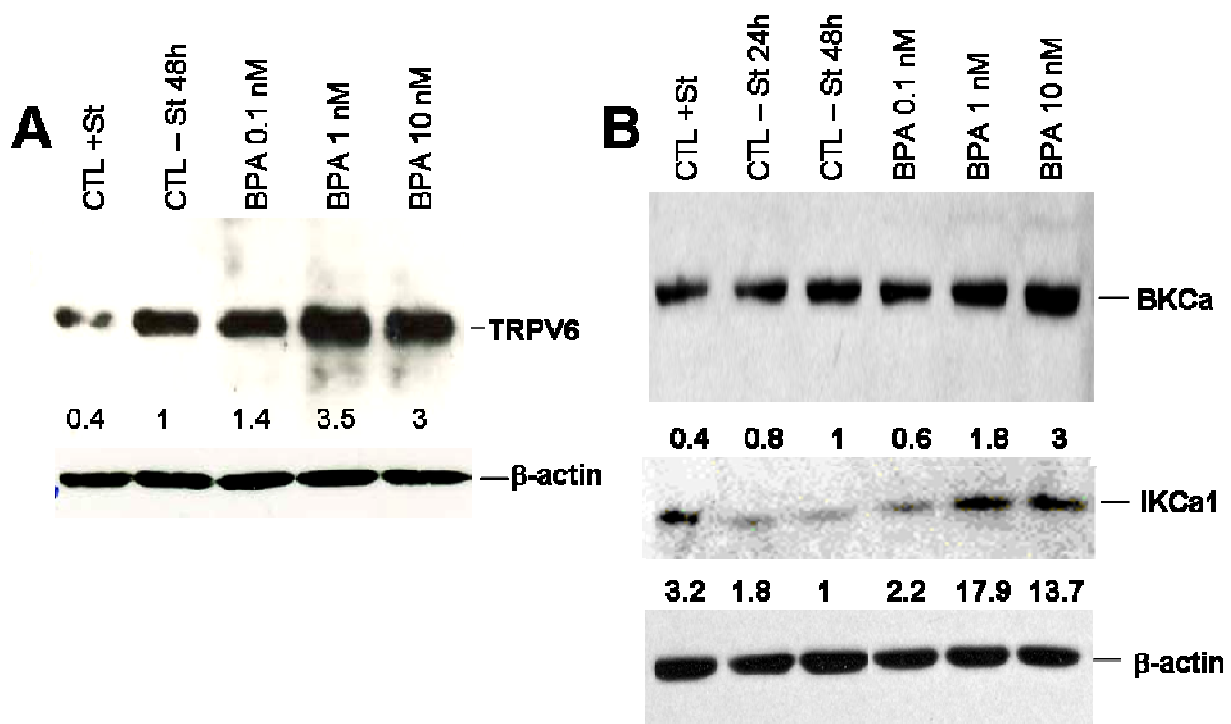


Figure 5 : Derouiche et al., 2012

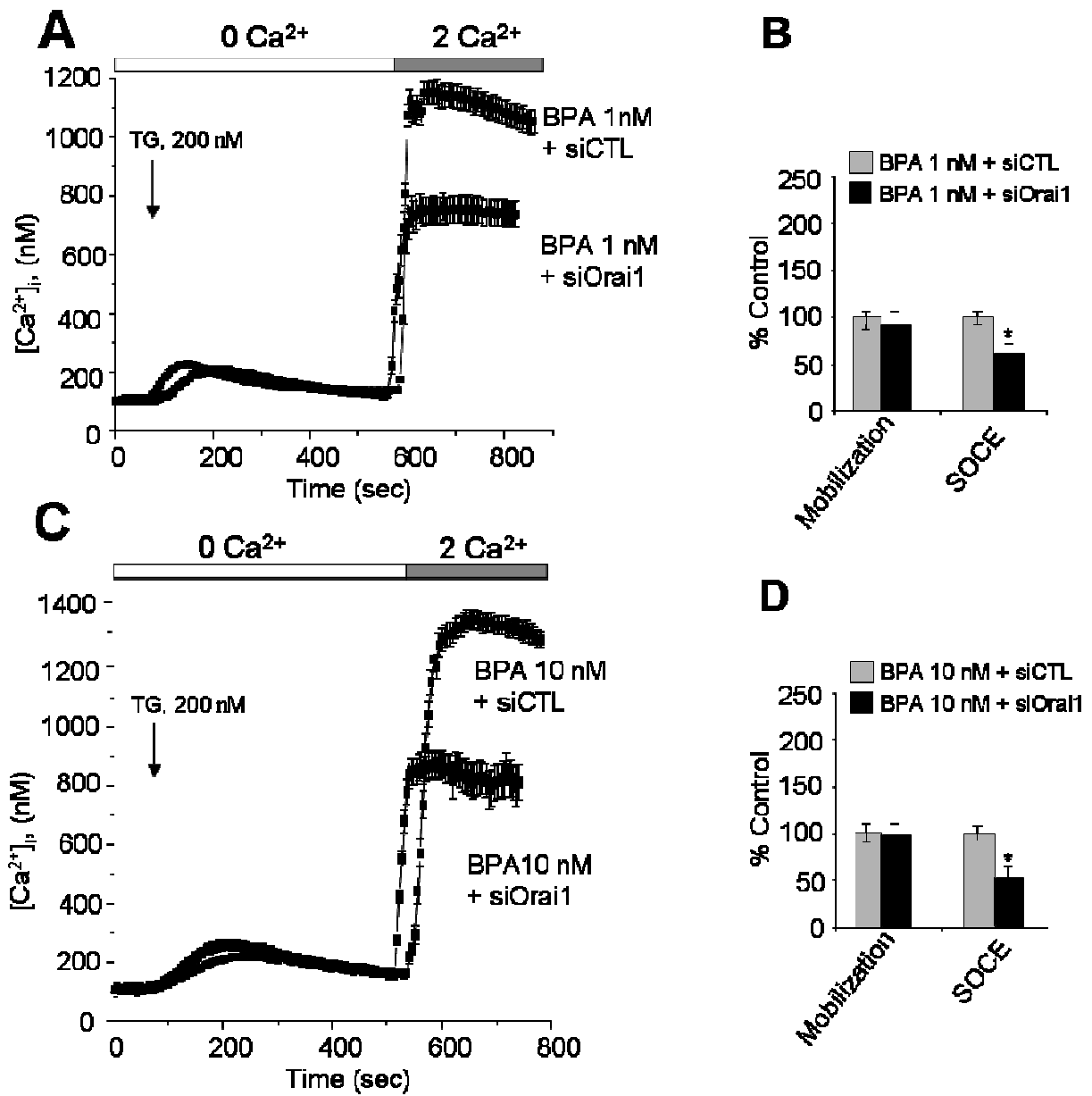


Figure 6 : Derouiche et al., 2012

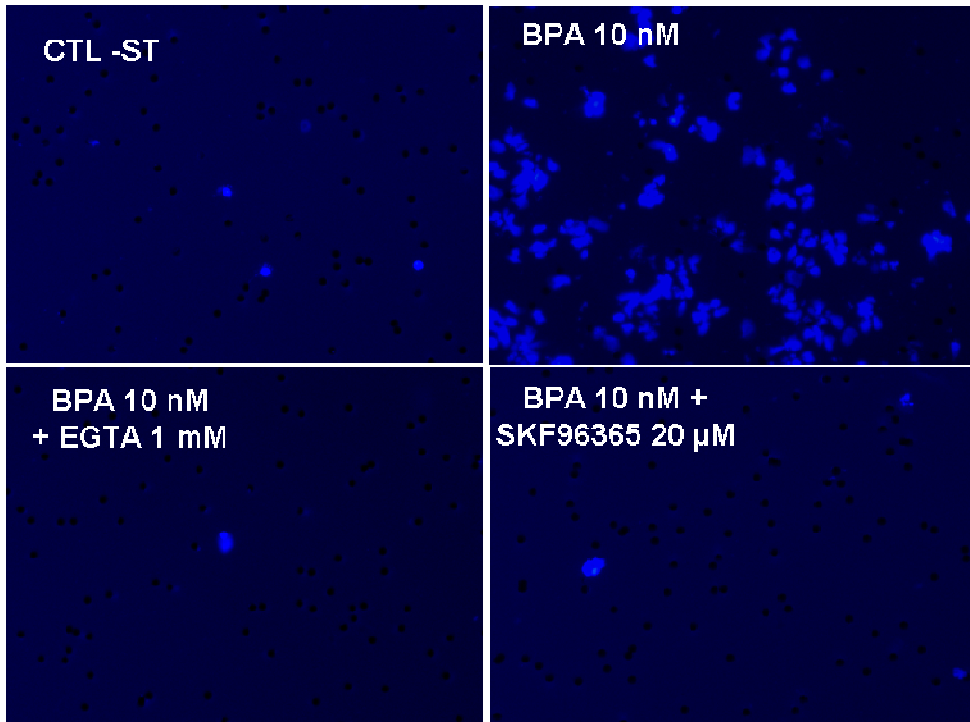
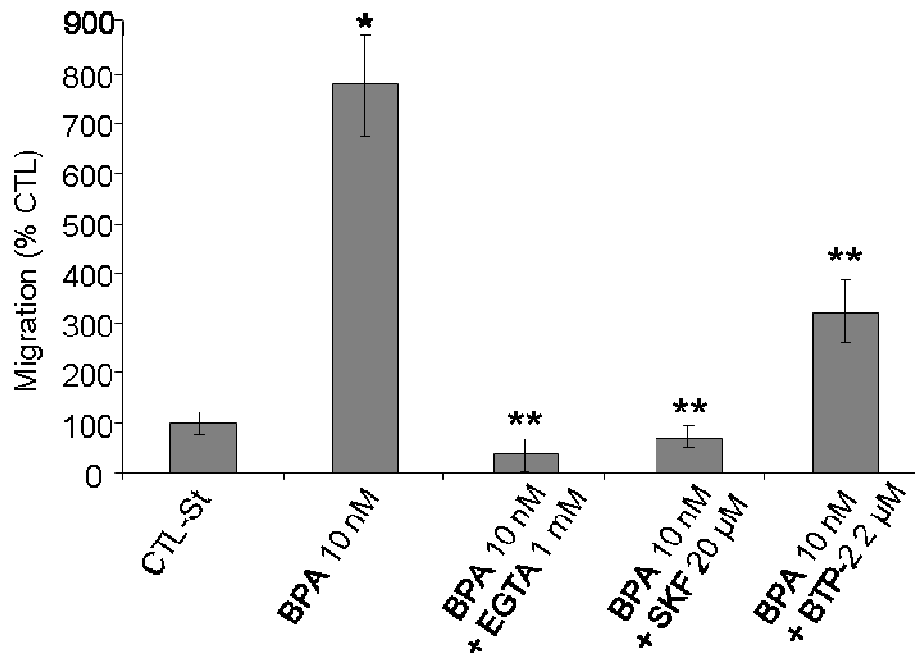
A**B**

Figure 7 : Derouiche et al., 2012

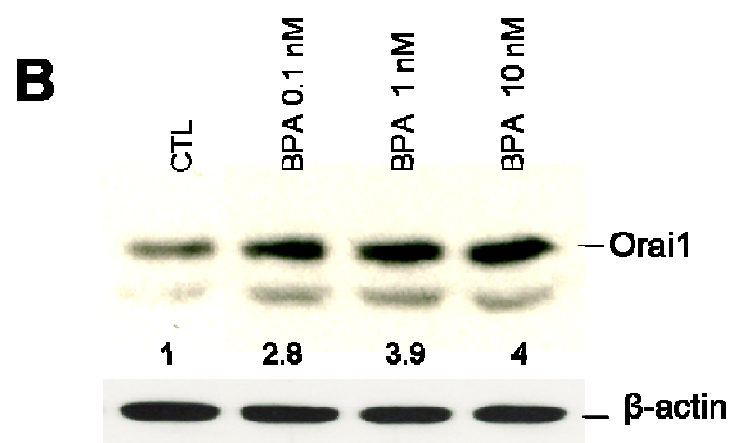
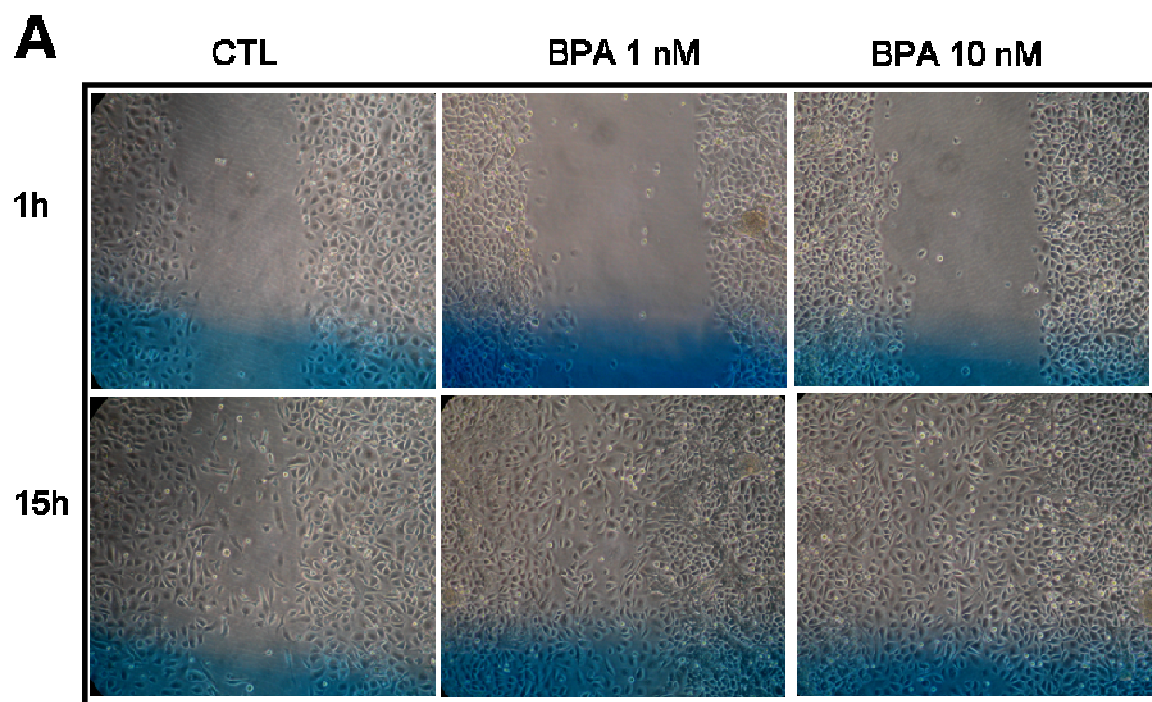


Figure 8 : Derouiche et al., 2012

Article 2

Triclosan induces calcium signalling and prevents apoptosis in human prostate cancer cells

Sandra Derouiche, Marine Warnier, Pascal Mariot, Pierre Gosset, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Christian Slomianny, Philippe Delcourt, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki.

(Soumis, *Environmental Health Perspectives*)

Nous venons de montrer l'impact du BPA sur le développement tumoral prostatique *via* une perturbation de l'homéostasie calcique dans les cellules cancéreuses prostatiques. D'autres perturbateurs endocriniens seraient susceptibles d'influencer la cancérogénèse et la progression tumorale de la prostate *via* ce mécanisme. Nous nous sommes intéressés à une autre classe de perturbateurs endocriniens, les antimicrobiens Triclosan (TCS) et Triclocarban (TCC), pour laquelle il avait déjà été mis en évidence un impact sur la signalisation calcique de différents types cellulaires (Ahn, *et al.*, 2008, Cherednichenko, *et al.*, 2012, Tamura, *et al.*, 2011).

Par des études d'imagerie calcique, nous avons montré que le TCC ne modifiait pas le taux de calcium intracellulaire basal alors que le TCS (1 – 10 μ M) induisait une mobilisation du calcium à partir des stocks intracellulaire *via* l'activation des canaux ioniques RyR. Dans le cadre de l'étude de l'impact de cette signalisation calcique induite par le TCS sur la croissance cellulaire et l'apoptose, nous avons observé que les effets du TCS étaient accompagnés d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'une inhibition de l'apoptose induite par la thapsigargine (TG) dans les cellules androgéno-dépendantes LNCaP. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude des mécanismes impliqués dans cette inhibition par le TCS de l'apoptose induite par la TG. Il a été démontré que la TG induit l'apoptose par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire suite à une mobilisation des stocks intracellulaires et une entrée de calcium (SOCE). Nous avons donc étudié l'impact du TCS sur ces deux phénomènes. Ces études ont permis de mettre en évidence que le TCS inhibait de façon importante l'entrée de calcium SOCE induite par la TG. Les résultats obtenus montrent clairement que cette inhibition du SOCE est due à l'inhibition de la translocation de STIM1, induite par le TCS, empêchant ainsi la formation du complexe STIM1/Orai1 impliqué dans l'entrée calcique. Les données bibliographiques suggèrent une implication importante des protéines Kinases C et A (PKC, PKA), des voies MAP Kinases et des tyrosine kinases dans les interactions STIM1/Orai1. Il est donc possible que le TCS active l'une ou plusieurs de ces enzymes pour aboutir à l'absence de la translocation de STIM1 et l'inhibition du SOCE induit par la TG. Dans ce travail, nous avons vérifié l'implication des PKC α , PKC β et PKA dans ce phénomène. Nos résultats suggèrent que les PKA ne

sont pas impliquées alors que les PKC semblent jouer un rôle très important l'inhibition par le TCS de l'entrée SOCE induite par la TG.

Ces résultats mettent en évidence un nouveau mécanisme de perturbateur endocrinien favorisant la progression tumorale prostatique. Il se pourrait que les effets du TCS, combinés à ceux du BPA, soient à l'origine des échappements thérapeutiques et contribuent au développement des formes plus agressives du cancer de la prostate.

Triclosan induces calcium signalling and prevents apoptosis in human prostate cancer cells

Sandra Derouiche*, Marine Warnier*, Pascal Mariot*, Pierre Gosset**, Brigitte Mauroy§, Jean-Louis Bonnal§, Christian Slomianny*, Philippe Delcourt*, Natalia Prevarskaya* and Morad Roudbaraki*†.

AFFILIATIONS

*Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

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

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

Running title: Triclosan inhibits prostate cancer cells apoptosis

† To whom correspondence should be addressed

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003

SN3, Université Lille I Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Fax: (33) 3 20 43 40 66

Tel : (33) 3 20 33 64 23

e-mail: morad.roudbaraki@univ-lille1.fr

ABSTRACT

Background

Concerns have been raised about the biological and toxicologic effects of the antimicrobial triclosan (TCS) in personal care products. Few studies have evaluated the biological activities of TCS in mammalian cells to assess its potential for adverse effects.

Objectives

In this study, we assessed the impact of TCS on calcium signalling, proliferation and apoptosis of human prostate cancer cells.

Materials and methods

We studied the effects of TCS on calcium signalling by calcium imaging technique using Fura-2/AM calcium probe, on prostate cancer cell proliferation by MTT technique and on apoptosis by nuclear Hoechst 33342 staining and by DNA laddering techniques. Western blot and immunostaining techniques were used to study the effects of TCS on the expression and on sub-cellular localization of the ion channels.

Results

The antimicrobial TCS (1–10 μ M) induced a calcium mobilization from internal stores by activation of RyR ion channels. These effects TCS were accompanied by a decrease in cell proliferation and inhibition of thapsigargin (TG)-induced apoptosis. We showed that TCS inhibits the translocation of STIM1 protein and the activation of Orai1 plasma membrane channel leading to the inhibition of TG-induced Store-Operated Calcium Entry (SOCE) and apoptosis. Our data suggest that the Proteins Kinases C (PKC), probably activated by TCS-induced internal calcium mobilization, is involved in the latter inhibitory actions of TCS in human prostate cancer cells.

Conclusions

The antimicrobial TCS induced a basal cell calcium increase by activating RyR ion channels, a modulation of the ion channels protein expression and localization and resistance to apoptosis probably by the activation of PKC.

Keywords: Triclosan (TCS), Prostate cancer, Ryanodine Receptor (RyR), Orai1, STIM1, Ion channels, Apoptosis

Introduction

Prostate cancer is the most commonly diagnosed malignancy and the second leading cause of cancer deaths in men in Western industrialized countries. To date, no therapy exists that surpasses androgen withdrawal for men with advanced disease, with symptomatic and/or objective response in ~80% of patients. However, progression to androgen independence ultimately occurs in nearly all of these cases (Denis and Murphy, 1993). Several hundred clinical studies using traditional cytotoxic chemotherapeutic agents document objective response rates of <10% and no improved survival rates (Oh and Kantoff, 1998). Accordingly, progression to androgen independence remains the main obstacle to improving the survival and quality of life in patients with advanced disease, emphasizing the need for novel therapeutic strategies that target the molecular mechanism of the androgen- and chemoresistant phenotype of prostate cancer. As such, identifying the factors affecting androgen deprivation therapy efficacy is essential to improve the outcome of prostate cancer treatment and thereby to increase patient survival. In this context, recent data suggest that the environmental factors may impact the carcinogenesis by inducing the proliferation of prostate and breast cancer cells (LaPensee, *et al.*, 2010, Pupo, *et al.*, 2012, Wetherill, *et al.*, 2002, Wetherill, *et al.*, 2005, Wetherill, *et al.*, 2006) and resistance to apoptosis by

antagonizing the cytotoxicity of multiple chemotherapeutic agents (LaPensee, *et al.*, 2010). Triclosan (TCS; 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether; a chlorophenol) is an antimicrobial and preservative agent commonly used in personal care products such as soaps, shampoos, detergents, disinfectants, cosmetics and pharmaceutical products (Cabana, *et al.*, 2007, Darbre, 2006, Lakeram, *et al.*, 2007). The continuous use of these chemicals results in their accumulation at detectable concentrations within different parts of our body like blood, milk, and various organs and tissues (Darbre, 2006, Dayan, 2007, Heidler, *et al.*, 2006, Nakada, *et al.*, 2006). TCS has been reported to be absorbed mainly by either across the skin or through the gastrointestinal tract (Dayan, 2007). Considering this systemic exposure, TCS was detected in human plasma (at concentration of 1-10 μM) and the daily exposure by TCS of breast tissue was estimated to be of 5.5 μM (Ahn, *et al.*, 2008, Kumar, *et al.*, 2009). It was shown that at such levels, TCS was able to modulate the growth of mammary cancer cells (Gee, *et al.*, 2008). In the other hand, studies have documented that triclosan disrupts thyroid systems in rats and frogs (Crofton, *et al.*, 2007, Veldhoen, *et al.*, 2006, Zorrilla, *et al.*, 2009). Recent data showed that TCS exerts its effects *via* several mechanisms. *In vitro* evidences suggest that triclosan may be an antagonist (Ahn, *et al.*, 2008, Gee, *et al.*, 2008) or weak agonist (Houtman, *et al.*, 2004) of the estrogen receptor and/or a weak antagonist of the androgen receptor (Chen, *et al.*, 2007). TCS was also shown to modulate the activity of an adenylyl cyclase enzyme (Kumar, *et al.*, 2008) and recently, the effects of TCS on cell calcium signalling were reported (Ahn, *et al.*, 2008, Cherednichenko, *et al.*, 2012). Taken together, these data demonstrate that some widely used antimicrobial compounds like TCS have different effects according to the considered cell systems and warrant thus further investigations to understand their impact on human health.

It is now well established that a variation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ triggers diverse cellular functions (Campanella, *et al.*, 2004, Franks and Sejnowski, 2002, Gill, *et al.*, 1996, Lynch and Michalak, 2002, Macrez and Mironneau, 2004, Shuttleworth, 1997). Of cellular Ca^{2+} functions, the oscillations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (the Ca^{2+} oscillation) activate several transcription factors for gene expression (Dolmetsch, *et al.*, 1998, Lewis, 2003, Li, *et al.*, 1998). Accumulating data show that cell proliferation, migration and apoptosis are paralleled by altered function and/or expression of ion channels involved in the signalling of those fundamental cellular mechanisms (Lang, *et al.*, 2005, Prevarskaya, *et al.*, 2011). A ubiquitous Ca^{2+} influx pathway that is activated by intracellular Ca^{2+} store depletion is store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) which is activated through a complex interplay between a Ca^{2+} channel at the cell membrane, Orai1, and a Ca^{2+} sensor localized to the endoplasmic reticulum, STIM1 (Courjaret and Machaca, 2012). Recently, a number of known molecular players in cellular Ca^{2+} homeostasis, including Orai1, STIM1 and transient receptor potential (TRP)

channels have been implicated in tumour cell proliferation, cell migration and apoptosis (for review *see* Prevarskaya *et al.* 2011). We previously showed that TRPC1, TRPV6 and Orai1/STIM1 are the main actors of SOCE in human prostate cancer cells LNCaP. An effect of the environmental factors on expression and/or functionality of these calcium signalling actors in prostate cancer tissue could impact the evolution of the carcinogenesis and the efficiency of the chemotherapies. In the present work, for the first time we investigated the impact of TCS on calcium signalling, cell proliferation and apoptosis in human prostate cancer cells and the mechanisms involved in the effects of the environmental factor in these cells.

METHODS

Chemicals and antibodies

Triclosan (Irgasan), Triclocarban and Bisphenol A (BPA) were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) and dissolved in DMSO as stock solutions. Ryanodine, 4-Chloro-m-Cresol (4CmC), 4 α -phorbol 12-myristate 13-aceta (PMA), Dentrolene were from Tocris (Tocris bioscience, france). Antibodies raised against human ion channel proteins were obtained from commercial sources as follows: Rabbit anti-Orai1 (ProSci Inc.), Rabbit anti-STIM1 (ProSci Inc.), Rabbit anti-TRPC1 (Alomone Labs), Rabbit anti-TRPV6 (Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti-BKca (Alomone Labs), Rabbit anti-IKCa1 (Santa Cruz Biotechnology), Rabbit anti-RyR1 (Alomone Labs), Rabbit anti-RyR2 (Alomone Labs) and Rabbit anti- α -actin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Cell Culture

LNCaP and PC-3 prostate cancer cell lines, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), and were routinely maintained in RPMI 1640 medium (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), penicillin/streptomycin (5 mg/ml), and L-glutamine (200 mM) as described by Gackière *et al.* (Gackiere, *et al.*, 2006). For TCS pretreatment experiments, the cells were cultured in RPMI 1640 containing 2% Foetal Calf Serum (FCS) (RPMI) in the presence or absence of TCS at indicated concentrations in Results sections.

Tissue specimens and primary cell cultures

Human PCa tissues were obtained from consenting patients following the local ethical considerations at Saint-Philibert Hospital (Lille, France). All experiments involving patient tissues were carried out under approval number 'CP 01/33', issued by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille'. A portion of prostate tissue suspicious for carcinoma was incised, and one-half of the sliced tissue was submitted for immediate microscopic examination on cryostat sections. After establishment of the diagnosis of adenocarcinoma, the remaining half of the tissue was used for primary culture. The tissue was cut into multiple

minute cubicles, placed on a plastic surface, and grown in keratinocyte medium supplemented with 50 mg/ml bovine pituitary extract, 5 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 100 mg/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) and 2% FCS for the epithelial cells growth. As soon as outgrowths formed around the tissue fragments, cells were trypsinized and cultured on glass coverslips for calcium imaging and immunofluorescence studies and in Petri dishes for using in electrophysiology, RT-PCR and western blot experiments.

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA isolation and RT-PCR experiments were performed as described earlier (Roudbaraki, *et al.*, 1999). The PCR primers (RyR1: 5'-GTCTGATCATCGACGCTTTT-3' and 5'-TGGGAAGAAATCCCAACATC-3'; RyR2: 5'-ACATCTTTGGCCTGGATCTG-3' and 5'-GGCTTGTCACTTTGGCATT-3'; β -actin : 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' and 5'-GTTGAAGGTCTCAAACATGATC-3') used in this study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Eurogentec (Liège Science Park, Belgium). The amplified PCR products were of 269, 507, and 212 bp respectively.

Immunofluorescence studies

The protein expression studies of the Orai1 and the STIM1 partner in LNCaP PCa cells was determined by indirect immunofluorescence analysis performed on acetone fixed cells and . Cells grown on glass coverslips were incubated with PBS containing 0.2% BSA, 0.1% TritonX-100 and 5% donkey serum for 30 min at room temperature, in order to block the non-specific bindings and to permeabilize the cells. They were then incubated overnight at 4°C with PBS/5% non-immunized serum containing a 1:50e dilution of the primary affinity-purified rabbit anti-Orai1 polyclonal antibody. Cells were then washed with PBS and were incubated with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (A-21206; Molecular Probes; dilution 1:2000e) diluted in PBS for 1 h at room temperature. After rinsing three times in PBS, the slides were mounted with Mowiol and the distribution of the labelled proteins was analysed by confocal immunofluorescence microscopy (Zeiss LSM 510; acquisition parameters: objective 40x/1.3; thickness of confocal slide, 1 μ m).

For immunofluorescence studies of RyR1 and RyR2 proteins in human prostate cancer, we used formalin fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues from consenting patients following the local ethical considerations as described above. The tissues were diagnosed as cancerous or not by anatomo-pathological examinations. Tissues were from patients prior to any anticancer therapy (chemotherapy, radiotherapy) and immunofluorescence experiments were performed as previously described (Lallet-Daher, *et al.*, 2009) and analysed by confocal microscopy.

Western Blot Assay

Cells cultured at 80% confluence were harvested and total proteins extracted. 40 micrograms of each sample were analysed by SDS-PAGE on 10% acrylamide and processed for western-blotting using antibody as described by (Vanoverberghe, *et al.*, 2004) using BKca (Alomone, 1:500e), TRPV6 (Alomone, 1:500e), TRPC1 (Alomone, 1:500e), Orai1 (ProSci 1:500e), STIM1 (ProSci, 1:500e), IKCa1 (Santa Cruz, 1:200e). Western blotting was performed with the ECL chemiluminescence kit (Millipore). Quantitative evaluation of protein expression was analyzed by ImageJ software.

[Ca²⁺]_i Measurements

Cells were grown on glass coverslips for [Ca²⁺]_i imaging experiment and, before each experiment, the cells were loaded with Fura-2 by adding 2 μ M Fura-2 AM (Fura-2 Acetoxymethyl ester) (Calbiochem, Meudon, France) in the culture medium for 45 min at 37°C. After incubation, cells were washed three times in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution; 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 340 μ M Na₂PO₄, 440 μ M KH₂PO₄, 10 mM Hepes, 5.6 mM glucose and buffered to pH 7.4). When a Ca²⁺-free medium was required, CaCl₂ was omitted and replaced by equimolar MgCl₂. The fluorescent intensity of Fura-2 in each cell was monitored and recorded at 340 and 380 nm. To represent the variation of the intracellular free calcium concentration, either the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic Ca²⁺ concentration or a calibration is used to represent the variations in concentrations (nM). All measurements shown are averages of 35–45 cells from a minimum of four experiments on different cell cultures.

Cell proliferation assays

Prostate cancer epithelial cells were seeded in 96-well plates (3000 cells/well) and cultured in RPMI/10% FCS for 24h. The medium was then replaced by 200 μ l of RPMI/2% FCS medium alone (CTL) or with TCS and incubated for 4 days. Cell growth was then determined using 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) as previously described (Lallet-Daher, *et al.*, 2009).

Apoptosis Assays

For Hoechst staining of cell nuclei, treated and untreated cells were harvested by trypsinization for 2 min, combined with the floating cell population, pelleted by centrifugation at 1000 rpm for 5 min, washed with 1 ml PBS, and attached on glass slides by Cytospin and fixed in 70% methanol at -20°C for 15 min. The cells were then stained for nuclei with Hoechst 33342 dye (4 μ g/mL) (blue fluorescent) for 15 min at room temperature in the dark, mounted with mowiol and examined by fluorescence microscopy by counting the apoptotic and non-apoptotic cell nuclei in 10 randomly chosen fields. The results are presented as a percentage of control (CTL) where cells were incubated in RPMI/2%FCS culture medium alone or

in the presence of TCS at different concentrations or TCS in combination by Thapsigargin (TG).

For DNA fragmentation analysis, treated and untreated LNCaP cells grown in 6-cm tissue culture dishes were harvested in cold PBS by gently scraping the cells off the plate and brief centrifugation. The cell pellet was resuspended in 500 μ l lysis buffer (0.5% Triton X-100, 5 mM Tris, pH 8.0, 20 mM EDTA, 20mM EGTA), and the lysate was treated with 400 μ g/ml proteinase K 20 μ g/ml overnight at 37°C and then with DNase-free RNase at 37°C for 1 hr. A phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) extraction was then performed and the DNA fraction was precipitated with EtOH at -20°C overnight and resuspended in TE-buffer, pH 8. Approximately 10 μ g DNA was loaded in each well and run on a 1% agarose gel containing Ethidium bromide (0,5 μ g/ml) at 100 V for 1 hr. The fragmented DNA was then visualized under UV transillumination.

Statistical analysis

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

Results

Triclosan has a direct impact on intracellular calcium of prostate cancer cells.

We studied the impact of triclosan on the calcium signaling of the prostate cancer cell lines LNCaP and PC3, by measuring modification of basal $[Ca^{2+}]_i$ following direct application of TCS. $[Ca^{2+}]_i$ was continuously monitored in a normal HBSS medium containing 2 mM $CaCl_2$ and then, at the time indicated, we added TCS in the medium. In the androgen-dependent LNCaP cells, triclosan (10 μ M) induced a transient increase in $[Ca^{2+}]_i$ reaching a maximal value of 122 ± 4 nM ($n=121$) from a baseline level of 84 ± 3 nM (Fig. 1A). These observations suggest that triclosan is able to induce either a calcium entry or a Ca^{2+} release from intracellular stores. To determine the origin of the Ca^{2+} increase induced by TCS, the same experiment was also conducted in a Ca^{2+} -free HBSS medium. In the LNCaP cells, the triclosan was still able to produce an increase in $[Ca^{2+}]_i$, similarly as the control in medium containing calcium (Fig. 1B), indicating the capacity of triclosan to mobilize Ca^{2+} from intracellular stores. As it was already showed that triclosan could activate Type 1 and type 2 Ryanodine Receptors (RyR1, RyR2) and then induce a calcium release from the endoplasmic reticulum in primary skeletal myotubes (Ahn, *et al.*, 2008, Cherednichenko, *et al.*, 2012), we further investigated the mechanism by which triclosan is able to mobilize Ca^{2+} from intracellular stores in LNCaP cells. In order to assess if RyRs are also

involved in triclosan signaling in these cells, we used Ryanodine at high concentrations (10-20 μ M) which is known to inhibit RyRs. In the presence of the ryanodine (20 μ M) in Ca^{2+} -free medium, TCS failed to induce a calcium response (Fig. 1C), suggesting that triclosan could mobilize Ca^{2+} from endoplasmic reticulum via one of the Ryanodine Receptors in LNCaP cells.

In the same manner, the TCS elicited a dose dependent response in PC3 cells blocked by Ryanodine (20 μ M) suggesting the involvement of RyR in TCS-induced calcium response in these androgen-independent cells (data not shown). The effects of TCS were also investigated on the prostate cancer primary cultured epithelial cells (hPEC). As shown in Fig. 1D, TCS induced a mobilization of calcium from internal stores, an effect inhibited by Dantrolene (10 μ M), an inhibitor of RyR1 and the RyR3, but not the RyR2 channels (Zhao, *et al.*, 2001).

These effects of TCS seem to be dependent of its molecular structure as the structural analogue of TCS, the Triclocarban (TCC) and another environmental factor, Bisphenol A (BPA), were ineffective to induce a calcium increase in LNCaP cells at the concentrations tested (Fig. 1E and 1F).

We then studied in LNCaP cells the interrelation between the internal pools triggered by the TCS and other calcium-mobilizing agents, thapsigargin (TG), an inhibitor of Ca^{2+} -ATPase (SERCA) pump of the endoplasmic reticulum and 4-Chloro-m-Cresol (4CmC), an activator of RyR1 and RyR 2 (James *et al.*, 2003; Rosker *et al.*, 2009). When TG (200 nM) was applied to the cells in Ca^{2+} -free HBSS medium, a calcium response with a mean amplitude of 80 ± 15 nM which returned to the baseline after 500 to 600 sec. When applied after the TG effect, TCS (10 μ M) failed to induce a calcium response (Fig. 2A). When applied after the TCS (10 μ M) effects, TG still induced a calcium response but with a significant lower amplitude (50 ± 11 nM) (Fig. 2B). These observations suggest that a common intracellular calcium pool is triggered by both TG and TCS. We further evaluated the impact of the sequential applications of the TCS (10 μ M) and 4CmC (0.5-1mM). In these experiments, TCS still induced a calcium response after the mobilization calcium response induced by 4CmC (Fig. 2C). Interestingly, when 4CmC was applied in the presence of TCS, the amplitude of the calcium response was increased (Fig. 2D) compared to that observed with 4CmC alone (Fig. 2C), suggesting a potentiation of the 4CmC-induced calcium release by TCS in LNCaP cells.

Expression of the RyR in prostate cancer cells and tissues

We showed that TCS is able to activate the RyR channel and induce a calcium mobilization from internal stores in prostate cancer epithelial cells. We further studied the expression of the RyR1 and RyR2 in human PCa epithelial cell lines (LNCaP, DU145, PC-3), in no-cancer epithelial cells (PNT1A) and in primary cultured epithelial cells originated from cancer patients prostate tissues. By RT-PCR analysis, we observed the expression of RyR1 in

all cell types examined but the expression of RyR2 appeared to be restricted to the PCa epithelial cells with an absence of expression in PNT1A cells (Fig. 3A). We further studied by immunofluorescence staining the expression of RyR1 and RyR2 proteins in different regions (non cancer (Benign hyperplasia of prostate, BHP) and cancer (PCa)) of the human prostate tissues using formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. In these studies we observed that the RyR1 and RyR2 were expressed in epithelial cells of cancer regions of prostate tissues whereas their expression was absent in non-cancer (BHP) regions (Fig. 3B to 3E). The RyR3 might be the isoform expressed in epithelial cells of BHP tissues, but this aspect needs further investigations. Interestingly, the major cell type expressing RyR channels is the stromal cells in cancer and non-cancer prostate tissues, suggesting that the stromal cells are the major target for TCS. These observations suggest that the effects of TCS on RyR channels of stromal cells could be of importance in cancer and non-cancer prostate tissue. By inducing a calcium increase, TCS might modulate the contraction of the smooth muscle cells of prostate tissues and/or induce secretion of paracrine factors important for the epithelium-stroma interactions favouring the carcinogenesis or the progression of cancers.

TCS protects the cancer cells from apoptosis

We further investigated if the calcium signalling induced by TCS could impact the prostate cancer cells growth and apoptosis. To study the impact of TCS on cell proliferation, LNCaP cells were treated with different concentrations of TCS (1 nM to 10 μ M) for 4 days in RPMI 1640 containing 2%FCS and then the growth rate was estimated by MTT technique.

In these experiments the TCS failed to increase the proliferation of the LNCaP cells but induced somehow a dose-dependent inhibition of the cell growth with a significant decrease at a concentration of 10 μ M ($60 \pm 7\%$ versus CTL) (Fig. 4A). We further examined if TCS could have an impact on apoptosis induced by Thapsigargin (TG). We previously showed that TG induced apoptosis in LNCaP cells by inducing a mobilization of the calcium from internal stores and a SOCE involving plasma membrane calcium channels (Orai/STIM, TRPV6 and TRPC1) (for review see Prevarskaya et al., 2011). To study the impact of TCS on TG-Induced apoptosis, LNCaP cells were treated with TG (0.5 and 1 μ M) or TCS (1 and 10 μ M) alone or with TG and TCS in combination in RPMI 1640/2%FCS for 48h. As shown in Fig. 4B, TCS alone did not show any significant effect on the basal apoptotic rate of LNCaP cells whereas, as expected, TG induced apoptosis in 30 to 37% of cells after 48h. When TG (0.5 and 1 μ M) and TCS (1 and 10 μ M) were incubated with LNCaP cells, the TG-induced apoptosis was inhibited by 50 to 75%. To confirm these results, we performed additional experiments by using the DNA laddering technique, another method allowing the visualization of the apoptotic process. As shown in Fig. 4C, the TG induced a clear DNA laddering resulting from DNA fragmentation, a hallmark of apoptosis. The co-

incubations of TG with TCS (1 and 10 μ M) qualitatively reduced the TG-induced DNA fragmentation confirming the inhibition of the TG-induced apoptosis by TCS.

These data prompted us to determine the mechanism involved in the TCS-induced inhibition of TG-induced apoptosis. TCS could elicit an inhibition of the expression and/or the functionality of the ion channels involved in SOCE in the TG response.

Effects of TCS on the expression of the ion channels involved in SOCE in LNCaP cells

Further experiments explored thus the impact of a 48 h exposure of the cells to TCS (in 2%FCS) on the protein expression of calcium channels (Orai1/STIM1, TRPV6, TRPC1) and potassium channels (IKCa1, BKCa) involved in the generation of the SOCE in human prostate cancer cells LNCaP. As shown in Fig. 5, western blot experiments shows a dose-dependent effects of TCS on ion channels expression with an increase for the TRPC1, TRPV6 channels and for STIM1 a partner of Orai1, whereas the expression of Orai1 and the potassium channels were not affected. These effects of TCS on ion channels expression is probably due to the calcium release induced by the activation of RyR channels as described before. To study the repercussion of these ion channels remodelling on the SOCE, the cells were treated with TCS (1 μ M) for 48h and then the effects of TG (200 nM) on the SOCE were evaluated in the absence of TCS. In Ca^{2+} -free bath solution, application of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) inhibitor thapsigargin (TG) induced an increase in basal free calcium concentration $[Ca^{2+}]_i$ in LNCaP cells loaded with Fura-2/AM. The Ca^{2+} decayed to basal level in a few minutes, which indicated Ca^{2+} release from intracellular stores. Re-introduction of Ca^{2+} into bath solution induced another Ca^{2+} response, which was due to the SOCE (Fig. 5C). Using this strategy, we could monitor $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by intracellular Ca^{2+} release and external Ca^{2+} influx (SOCE) separately. As shown in Fig. 5C and D, when the cells were pretreated by TCS (1 μ M), the amplitude of SOCE induced by TG is increased by 70-80%, suggesting that the inhibition by TCS of TG-induced apoptosis is not due to the down-regulation by TCS of the ion channels involved in SOCE. It is thus possible that TCS affects the functionality of these ion channels.

TCS inhibits the TG-induced SOCE in human prostate cancer cells.

To evaluate the impact of TCS on the functionality of the ion channels involved in SOCE, we studied the effects of TCS on the SOCE developed by TG (200 nM). The Calcium mobilization and SOCE induced by TG were studied in the absence and in the presence of TCS (10 μ M). As shown in Fig. 6A, TCS inhibited the TG-induced SOCE by at least 90% compared to SOCE developed in the absence of TCS. Similar results were obtained in androgen-insensitive prostate cancer cells PC-3 (Fig. 6B). These effects of TCS might be due to a direct inhibition of calcium channels involved in SOCE. To verify this possibility, we induced the SOCE by previously described protocol and then applied the TCS on the calcium

response. As shown in Fig. 6C, the application of TCS after the development of SOCE failed to have an inhibitory effect. These observations suggest that TCS might act to inhibit the formation of the protein complex like Orai1/STIM1 necessary for the development of SOCE. This might be the reason why after induction of calcium mobilisation by activating RyR channels, TCS failed to induce SOCE in LNCaP cells (Fig. 6D).

TCS inhibits the TG-induced translocation of STIM1

We thus further studied the mechanisms involved in TCS-induced inhibition of SOCE in human prostate cancer cells. As described earlier, SOCE can be activated through a complex interplay between a Ca^{2+} channel at the cell membrane, Orai1, and a Ca^{2+} sensor localized to the endoplasmic reticulum, STIM1 (Courjaret and Machaca, 2012). After the depletion of intracellular calcium pool, STIM1 is associated to Orai1 to induce its activation. The mechanisms inhibiting these associations could inhibit SOCE. Recent studies demonstrated that Protein kinase C (PKC) regulates the activity of SOC channels via phosphorylation of Orai1 protein (Gao, *et al.*, 2012, Kawasaki, *et al.*, 2010) and inhibition of the association with STIM1 protein. It is possible that TCS induce the activation of a PKC to inhibit the translocation and association of STIM1 with Orai1. We thus investigated by immunofluorescence the translocation of Orai1 and STIM1 after TG treatments in the presence and absence of TCS in LNCaP cells. As shown in Fig. 7, the Orai1 protein presents a predominantly intracellular localization in control conditions. When the cells are challenged with TG in the same conditions as for the development of SOCE ($0\text{Ca}^{2+}/2\text{Ca}^{2+}$), the Orai1 immunoreactivity was clearly concentrated at plasma membrane level (Fig. 7B). In these experiments, the presence of TCS did not prevent the TG-induced Orai1 translocation (Fig. 7C and 7D). When the immunofluorescence studies for STIM1 were performed in the same experimental conditions (Fig. 8), we observed clearly the translocation of STIM1 after $0\text{Ca}^{2+}/2\text{Ca}^{2+}$ protocol (Fig. 8B). Interestingly, this STIM1 translocation was completely blocked by TCS (Fig. 8C and 8D). These observations suggest that TCS inhibits the translocation of STIM1 after the depletion of intracellular stores and prevents the SOCE induced by TG. These effects of TCS might be involved in its inhibition of TG-induced apoptosis in LNCaP cells. We further explored the mechanisms involved in TCS induced inhibition of STIM1 clustering at the plasma membrane after the depletion of the intracellular calcium stores.

Involvement of protein kinases in TCS-induced inhibition of SOCE

Several recent data show the involvement of Protein kinase C (PKC) in the development of SOCE by an activating or inhibiting effect depending on cell types and PKC isoforms involved (Gao, *et al.*, 2012, Kawasaki, *et al.*, 2010). According to Kawasaki and colleagues (2010), PKC suppresses store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) by phosphorylation (at N-terminal Ser-27 and Ser-30

residues) of Orai1 and by inhibiting the Orai1/STIM1 complex formation. In these studies, PKC inhibitors and knockdown of PKC β both resulted in increased SOCE. We hypothesised that TCS may induce the PKC activation which subsequently phosphorylates Orai1 and inhibits the Orai1/STIM1 association conducting to the inhibition of TG-induced SOCE and apoptosis. We thus explored the involvement of PKC in TCS-induced SOCE inhibition. First, we studied the impact of PKC activation on the TG-induced SOCE. As shown in Fig., 9A, when the LNCaP cells were challenged by PMA (1 μM) and TG (200 nM), the amplitude of SOCE was decreased by 60% compared to SOCE developed by TG alone. These observations suggest that PMA-activated PKC inhibit SOCE in LNCaP cells. By immunofluorescence technique we studied the TG-induced STIM1 translocation in the absence (Fig. 9D) and presence of PMA (1 μM) (Fig. 9E), As illustrated, we observed a clear inhibition of the STIM1 translocation in the presence of PMA. These data suggest that the activation of PKC inhibits the STIM1 translocation and SOCE developed by TG. We then used an indolocarbazole Gö6976, a selective Inhibitor of PKC Isozymes. At the concentrations (100 nM) used in our studies, Gö6976 inhibits both PKC α and PKC β (Martiny-Baron, *et al.*, 1993). When the LNCaP cells were challenged with TG (200 nM) and TCS (10 μM) in the presence of Gö6976 (100 nM), the SOCE was partially restored (Fig. 9B). In fact, in LNCaP cells, the TG-induced SOCE is presented as a plateau after the development whereas the SOCE in the presence of Gö6976/TG/TCS was transient but with the same pic amplitude than what was developed by TG alone. To study the eventual involvement of the PKA, another negative modulator of SOCE (Chen, *et al.*, 2011) in the TCS-induced inhibition of SOCE, the latter experiments were performed in the presence of the PKA inhibitor H89. As shown in Fig. 9F, the inhibition of the PKA by H89 (10 μM) failed to restore the SOCE inhibited by TCS, excluding thus the involvement of PKA in the TCS effects.

DISCUSSION

In the present study, for the first time, we show that the antimicrobial TCS (1–10 μM) induced a calcium mobilization from internal stores by activation of RyR ion channels in human prostate cancer cells. These effects of TCS were accompanied by a decrease in cell proliferation and inhibition of thapsigargin (TG)-induced apoptosis. We showed that TCS inhibits the translocation of STIM1 protein and the activation of Orai1 plasma membrane channel leading to the inhibition of TG-induced Store-Operated Calcium Entry (SOCE) and apoptosis. Our data suggest that the Protein Kinases C (PKC), probably activated by TCS-induced internal calcium mobilization, is involved in the latter inhibitory actions of TCS in human prostate cancer cells.

The TCS-induced intracellular free calcium concentration increase may induce gene expression by different pathways. It is now well established that a variation in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ triggers diverse cellular functions (Campanella, *et al.*, 2004, Franks and Sejnowski, 2002, Gill, *et al.*, 1996,

Lynch and Michalak, 2002, Macrez and Mironneau, 2004, Shuttleworth, 1997). Of cellular Ca^{2+} functions, the oscillation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (the Ca^{2+} oscillation) activates several transcription factors for gene expression (Dolmetsch, *et al.*, 1998, Lewis, 2003, Li, *et al.*, 1998). The modulation of the ion channels gene expression induced by TCS in LNCaP cells might be due to the activation of the RyR and subsequent release of the calcium from internal stores. The study of the specific sources of calcium signals involved in regulation of gene expression in skeletal muscle has been addressed only recently. In this tissue, most cytoplasmic and nuclear calcium signals originate from calcium release from internal stores, mediated either by ryanodine receptor (RyR) or IP3 receptor (IP3R) channels located both in the reticulum membrane and in the nuclear membrane, and their activation results also in long-lasting nuclear calcium increase. The calcium signals mediated by RyR and IP3R are very different in kinetics, amplitude and subcellular localization; an open question is whether these differences are differentially sensed by transcription factors.

Several studies show that RyR-mediated calcium release controls the expression of certain skeletal muscle proteins (Adams and Goldman, 1998, Vali, *et al.*, 2000), mediated at least partially by CaMKII (Macpherson, *et al.*, 2002, Tang, *et al.*, 2004). A role for RyR-mediated calcium release in gene expression has also been described in the non-contracting skeletal muscle cell line L6 (Ojuka, *et al.*, 2002, Ojuka, *et al.*, 2003). Addition of caffeine increases the expression of several mitochondrial enzymes and transcription factors involved in their regulation, and this effect is antagonized by dantrolene. The increase in expression of several mitochondrial proteins induced by caffeine is antagonized by an inhibitor of CaMKs (Ojuka, *et al.*, 2003).

Accumulating data show that cell proliferation, migration and apoptosis are paralleled by altered function and/or expression of ion channels involved in the signalling of those fundamental cellular mechanisms (Lang, *et al.*, 2005, Prevarskaya, *et al.*, 2011).

In our studies performed on LNCaP cells, despite the effects of TCS on calcium signalling and ion channels gene expression, we did not observe any stimulatory effects on cell proliferation but an inhibitory effect at the highest concentration used in our studies (Fig. 4A).

For the first time, we show also the expression of RyR1 and RyR2 proteins targets of TCS in human prostate cancer tissues (Fig. 3B-3E). As shown, the immunostaining of RyR proteins was found in epithelial cells and more intensely in stromal cells. Thus, the stromal cells could also be influenced by TCS impregnation. Given the importance of the epithelium-stroma (reactive stroma) interactions in the progression of cancer, the potential effects of TCS on calcium signalling and secretion of growth factors are actually under investigations in our laboratory.

A ubiquitous Ca^{2+} influx pathway that is activated by intracellular Ca^{2+} store depletion is store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) which is activated through a complex interplay between a Ca^{2+} channel at the cell membrane,

Orai1, and a Ca^{2+} sensor localized to the endoplasmic reticulum, STIM1 (Courjaret and Machaca, 2012). Recently, a number of known molecular players in cellular Ca^{2+} homeostasis, including Orai1, STIM1 and transient receptor potential (TRP) channels have been implicated in tumour cell proliferation, cell migration and apoptosis (for review see Prevarskaya *et al.*, 2011). The store-operated Ca^{2+} channels are involved in the generation of Ca^{2+} oscillation (Feske, *et al.*, 2001, Lewis, 2003). The Ca^{2+} oscillation enhances efficiency of signalling to nucleus and its frequency contributes to specificity of nuclear signalling, activation of transcription factors and gene expression (Dolmetsch, *et al.*, 1998, Lewis, 2003, Li, *et al.*, 1998). Therefore, it can be suggested that TCS disturbs some gene expressions via the inhibitory action on store-operated Ca^{2+} channels.

When considered the effects of TCS on the TG-induced SOCE, we showed that the environmental factor acted differently when applied before or after development of SOCE.

In the present study, we showed that when applied before the TG-induced SOCE, TCS exhibits an inhibitory action on the Ca^{2+} influx through store-operated Ca^{2+} channels (Figs. 6). As STIM1 forms clusters near the plasma membrane to activate SOCE channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1 (Park, *et al.*, 2009a), the effects of TCS are probably mediated by the inhibition of STIM1 translocation and punctae formation and association with Orai1 (Fig. 8). Several proposed mechanisms could be involved in the TCS-induced inhibition of SOCE. The function of PKC in the regulation of SOCE has been investigated in various cell types, with the observed effects of PKC on SOC channel function being very variable depending of the cell types considered (Gao, *et al.*, 2012, Haverstick, *et al.*, 1997, Kawasaki, *et al.*, 2010, Parekh and Penner, 1995, Petersen and Berridge, 1994). This may be due to the different PKC subtypes (Nishizuka, 1988, 1992) and potentially different SOC channels expressed in the cell types studied. In the present study, using pharmacological tools (an activator, PMA and a PKC inhibitor, Gö6976), we show that members of the Ca^{2+} -activated PKC subfamily, PKC α and PKC β , are responsible for SOCE regulation (Fig. 9A and 9B). However, extensive studies are needed to confirm the involvement of the PKC isoforms in the TCS-induced SOCE inhibition.

Recent data show that protein phosphorylation could impact also the STIM1 protein to modulate its translocation. The inhibition of the STIM1 translocation might be due also to its phosphorylation status.

Studies revealed the involvement of members of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in TG-induced apoptosis. MAPKs regulate the activity of transcription factors or downstream kinases by phosphorylation, thereby controlling a variety of physiological processes. MAPKs including ERKs (Futami, *et al.*, 2005). An increase in basal cell calcium due to the mobilization from internal stores activates the MAP kinases pathways leading to the activation of

extracellular-signal regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2). In a recent work, STIM1 was found to be a target of ERK1/2 at a specific sequence, at serine 575. An alanine substitution mutants of ERK1/2 target on STIM1 sites reduced Orail/STIM1 association and SOCE, suggesting that phosphorylation of these residues are required to fully accomplish SOCE (Lee, *et al.*, 2012, Pozo-Guisado, *et al.*, 2010, Smyth, *et al.*, 2009). Recently an interesting work shows STIM1 tyrosine phosphorylation during the first steps of SOCE activation (Lopez, *et al.*, 2012). STIM1 tyrosine phosphorylation appears to be a key event for the association of STIM1 with plasma membrane Ca(2+) channels such as Orail, hence it is required for conducting SOCE activation. TCS could either directly or indirectly inhibit the ERK1/2 or a tyrosine kinase to prevent the phosphorylation and translocation of STIM1 to further inhibit SOCE. In this context, an inhibitory effect of TCS on adenylyl cyclase, an effector enzymatic system of transduction pathways, is already shown in rat Leydig cells (Kumar, *et al.*, 2008). When considered the effects of TCS after the development of SOCE, our data did not show any inhibition of the SOCE (Fig. 6C). Taken together, our data suggest that the TG-induced SOCE inhibition is not due to the inhibitory effects of the TCS on SOCE channels but to the inhibition of SOCE channels complex formation.

Another important finding presented in the present work is the resistance to TG-induced apoptosis of prostate cancer cells LNCaP in the presence of TCS. These data suggest that the environmental factors including TCS might be involved in the chemotherapy failures in the treatments of cancers in general and particularly prostate cancer. The treatment of metastatic castrate-resistant prostate cancer has been historically challenging, with few therapeutic successes. Docetaxel was the first cytotoxic therapy associated with a survival benefit in castrate-resistant prostate cancer. Unfortunately, a significant proportion of men with castrate-resistant prostate cancer will not respond to docetaxel-based therapy and all patients will ultimately develop resistance. The understanding of the mechanisms underlying docetaxel resistance may allow to several new treatment approaches for the future. Thus, the study of the involvement of TCS in Docetaxel mechanisms of action is of importance and needs further investigations to propose methods targeting ion channels and rendering more efficient the Docetaxel action in the chemotherapies of prostate cancers.

In summary, in the present work, we show that the antimicrobial TCS induced a calcium mobilization from internal stores by activation of RyR ion channels. These effects of TCS were accompanied by a decrease in cell proliferation and inhibition of thapsigargin (TG)-induced apoptosis. We showed that TCS inhibits the translocation of STIM1 protein and the activation of Orail plasma membrane channel leading to the inhibition of TG-induced calcium entry and apoptosis. Our data suggest that the Proteins Kinases C (PKC), probably activated by TCS-induced internal calcium mobilization, is involved in

the latter inhibitory actions of TCS in human prostate cancer cells. TCS is consistently detected in human blood, urine, milk, and various organs and tissues (Darbre, 2006, Dayan, 2007, Heidler, *et al.*, 2006, Nakada, *et al.*, 2006). TCS has been reported to be absorbed mainly by either across the skin or through the gastrointestinal tract (Dayan *et al.*, 2006). Considering this systemic exposure, TCS was detected in human plasma (at concentration of 1-10 μM) and the daily exposure by TCS of breast tissue was estimated to be of 5.5 μM (Ahn, *et al.*, 2008, Kumar, *et al.*, 2009). The long-term daily intake may lead to its bioaccumulation leading to adverse effects on human health and probably on cancer progression. These observations suggest that the TCS concentrations used in the present study are achievable in humans. The present data provide novel insights into the molecular mechanisms involved in the effects of environmental factors which can promote the progression of cancer and highlight the urge of preventive measures in the treatments of prostate cancers.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This work was supported by grants from Région Nord Pas-de-Calais, INSERM, the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mrs Elodie Richard for the technical assistances in image analysis by confocal microscopy and Michèle Masurelle for assistance in the preparation of the manuscript.

References

- Denis L, Murphy GP. 1993. Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer* 72(12 Suppl): 3888-3895.
- Oh WK, Kantoff PW. 1998. Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. *J Urol* 160(4): 1220-1229.
- LaPensee EW, LaPensee CR, Fox S, Schwemberger S, Afton S, Ben-Jonathan N. 2010. Bisphenol A and estradiol are equipotent in antagonizing cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Cancer Lett* 290(2): 167-173.
- Pupo M, Pisano A, Lappano R, Santolla MF, De Francesco EM, Abonante S, *et al.* 2012. Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ Health Perspect* 120(8): 1177-1182.

- Wetherill YB, Fisher NL, Staubach A, Danielsen M, de Vere White RW, Knudsen KE. 2005. Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res* 65(1): 54-65.
- Wetherill YB, Hess-Wilson JK, Comstock CE, Shah SA, Buncher CR, Sallans L, et al. 2006. Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 5(12): 3181-3190.
- Wetherill YB, Petre CE, Monk KR, Puga A, Knudsen KE. 2002. The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 1(7): 515-524.
- Cabana H, Jiwan JL, Rozenberg R, Elisashvili V, Penninckx M, Agathos SN, et al. 2007. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriopsis polyzona*. *Chemosphere* 67(4): 770-778.
- Darbre PD. 2006. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20(1): 121-143.
- Lakeram M, Lockley DJ, Sanders DJ, Pendlington R, Forbes B. 2007. Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems. *J Biomol Screen* 12(1): 84-91.
- Dayan AD. 2007. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. *Food Chem Toxicol* 45(1): 125-129.
- Heidler J, Sapkota A, Halden RU. 2006. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ Sci Technol* 40(11): 3634-3639.
- Nakada N, Tanishima T, Shinohara H, Kiri K, Takada H. 2006. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res* 40(17): 3297-3303.
- Ahn KC, Zhao B, Chen J, Cherednichenko G, Sanmarti E, Denison MS, et al. 2008. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. *Environ Health Perspect* 116(9): 1203-1210.
- Kumar V, Chakraborty A, Kural MR, Roy P. 2009. Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reprod Toxicol* 27(2): 177-185.
- Gee RH, Charles A, Taylor N, Darbre PD. 2008. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *J Appl Toxicol* 28(1): 78-91.
- Crofton KM, Paul KB, Devito MJ, Hedge JM. 2007. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environ Toxicol Pharmacol* 24(2): 194-197.
- Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, et al. 2006. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat Toxicol* 80(3): 217-227.
- Zorrilla LM, Gibson EK, Jeffay SC, Crofton KM, Setzer WR, Cooper RL, et al. 2009. The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicol Sci* 107(1): 56-64.
- Houtman CJ, Van Oostveen AM, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J. 2004. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. *Environ Sci Technol* 38(23): 6415-6423.
- Chen J, Ahn KC, Gee NA, Gee SJ, Hammock BD, Lasley BL. 2007. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* 221(3): 278-284.
- Kumar V, Balomajumder C, Roy P. 2008. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology* 250(2-3): 124-131.
- Cherednichenko G, Zhang R, Bannister RA, Timofeyev V, Li N, Fritsch EB, et al. 2012. Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(35): 14158-14163.
- Campanella M, Pinton P, Rizzuto R. 2004. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease. *Biol Res* 37(4): 653-660.
- Franks KM, Sejnowski TJ. 2002. Complexity of calcium signaling in synaptic spines. *Bioessays* 24(12): 1130-1144.
- Gill DL, Waldron RT, Rys-Sikora KE, Ufret-Vincenty CA, Graber MN, Favre CJ, et al. 1996. Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep* 16(2): 139-157.
- Lynch J, Michalak M. 2002. Ca²⁺-dependent signaling pathways in the heart: potential drug targets for cardiac disease. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2(1): 1-11.
- Macrez N, Mironneau J. 2004. Local Ca²⁺ signals in cellular signalling. *Curr Mol Med* 4(3): 263-275.
- Shuttleworth TJ. 1997. Intracellular Ca²⁺ signalling in secretory cells. *J Exp Biol* 200(Pt 2): 303-314.
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. 1998. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 392(6679): 933-936.
- Lewis RS. 2003. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 5): 925-929.
- Li W, Llopis J, Whitney M, Zlokarnik G, Tsien RY. 1998. Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature* 392(6679): 936-941.
- Lang F, Foller M, Lang KS, Lang PA, Ritter M, Gulbins E, et al. 2005. Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol* 205(3): 147-157.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. 2011. Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 11(8): 609-618.
- Courjaret R, Machaca K. 2012. STIM and Orai in cellular proliferation and division. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 331-341.
- Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P. 2006. A role for voltage gated T-type calcium channels in

mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 39(4): 357-366.

Roudbaraki M, Lorsignol A, Langouche L, Callewaert G, Vankelecom H, Deneff C. 1999. Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lacto-somatotroph lineage. *Endocrinology* 140(10): 4874-4885.

Lallet-Daher H, Roudbaraki M, Bavencoffe A, Mariot P, Gackiere F, Bidaux G, et al. 2009. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* 28(15): 1792-1806.

Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL, et al. 2004. Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 11(3): 321-330.

Zhao F, Li P, Chen SR, Louis CF, Fruen BR. 2001. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem* 276(17): 13810-13816.

Gao Y, Zou J, Geng S, Zheng J, Yang J. 2012. Role of protein kinase C in the activation of store-operated Ca(2+) entry in airway smooth muscle cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 32(3): 303-310.

Kawasaki T, Ueyama T, Lange I, Feske S, Saito N. 2010. Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 285(33): 25720-25730.

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, et al. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 268(13): 9194-9197.

Chen Y, Yue S, Xie L, Pu XH, Jin T, Cheng SY. 2011. Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem* 286(15): 13502-13511.

Adams L, Goldman D. 1998. Role for calcium from the sarcoplasmic reticulum in coupling muscle activity to nicotinic acetylcholine receptor gene expression in rat. *J Neurobiol* 35(3): 245-257.

Vali S, Carlsen R, Pessah I, Gorin F. 2000. Role of the sarcoplasmic reticulum in regulating the activity-dependent expression of the glycogen phosphorylase gene in contractile skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 185(2): 184-199.

Macpherson P, Kostrominova T, Tang H, Goldman D. 2002. Protein kinase C and calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMK II) suppress nicotinic acetylcholine receptor gene expression in mammalian muscle. A specific role for CaMK II in activity-dependent gene expression. *J Biol Chem* 277(18): 15638-15646.

Tang H, Macpherson P, Argetsinger LS, Cieslak D, Suhr ST, Carter-Su C, et al. 2004. CaM kinase II-dependent phosphorylation of myogenin contributes to activity-dependent suppression of nAChR gene expression in developing rat myotubes. *Cell Signal* 16(5): 551-563.

Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Holloszy JO. 2003. Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J* 17(6): 675-681.

Ojuka EO, Jones TE, Han DH, Chen M, Wamhoff BR, Sturek M, et al. 2002. Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(5): E1040-1045.

Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. 2001. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2(4): 316-324.

Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, et al. 2009. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 136(5): 876-890.

Haverstick DM, Dicus M, Resnick MS, Sando JJ, Gray LS. 1997. A role for protein kinase CbetaI in the regulation of Ca²⁺ entry in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 272(24): 15426-15433.

Parekh AB, Penner R. 1995. Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7907-7911.

Petersen CC, Berridge MJ. 1994. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 269(51): 32246-32253.

Nishizuka Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334(6184): 661-665.

Nishizuka Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258(5082): 607-614.

Futami T, Miyagishi M, Taira K. 2005. Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors. *J Biol Chem* 280(1): 826-831.

Lee HJ, Bae GU, Leem YE, Choi HK, Kang TM, Cho H, et al. 2012. Phosphorylation of Stim1 at serine 575 via netrin-2/Cdo-activated ERK1/2 is critical for the promyogenic function of Stim1. *Mol Biol Cell* 23(7): 1376-1387.

Pozo-Guisado E, Campbell DG, Deak M, Alvarez-Barrientos A, Morrice NA, Alvarez IS, et al. 2010. Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *J Cell Sci* 123(Pt 18): 3084-3093.

Smyth JT, Petranka JG, Boyles RR, DeHaven WI, Fukushima M, Johnson KL, et al. 2009. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* 11(12): 1465-1472.

Lopez E, Jardin I, Berna-Erro A, Bermejo N, Salido GM, Sage SO, et al. 2012. STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets. *Cell Signal* 24(6): 1315-1322.

Allmyr M, Adolfsson-Erici M, McLachlan MS, Sandborgh-Englund G. 2006. Triclosan in plasma and

milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci Total Environ* 372(1): 87-93.

Bhargava HN, Leonard PA. 1996. Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control* 24(3): 209-218.

Daughton CG, Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6: 907-938.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30(4): 293-342.

Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. 2010. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones (Athens)* 9(1): 9-15.

Yamamura H, Ohi Y, Muraki K, Watanabe M, Imaizumi Y. 2001. BK channel activation by NS-1619 is partially mediated by intracellular Ca^{2+} release in smooth muscle cells of porcine coronary artery. *Br J Pharmacol* 132(4): 828-834.

Liu B, Wang Y, Fillgrove KL, Anderson VE. 2002. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase in vitro and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 49(3): 187-193.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effect of TCS, TCC and BPA on basal $[Ca^{2+}]_i$ of LNCaP prostate cancer cells. LNCaP cells grown on glass coverslips and cultured in complete medium and then direct effects of TCS (10 μ M) in a 2 mM Ca^{2+} -bath solution (2 Ca^{2+}) (A) or in a Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) (B) were studied by calcium imaging. To assess the origin of the TCS-induced calcium increase, LNCaP cells grown on glass coverslips in complete medium were incubated for ten minutes in a Ca^{2+} -free bath solution containing 20 μ M Ryanodine prior calcium experiment (C). The direct effects of TCC (D) and BPA (E) at the different concentrations indicated were also studied by calcium imaging in a 2 mM Ca^{2+} -bath solution (2 Ca^{2+}). Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50-80 cells as mean \pm s.e are presented. * P <0.01. The drugs applications are marked by horizontal bars.

Figure 2. Source of calcium in TCS-induced Ca^{2+} response. LNCaP cells grown on glass coverslips in complete medium and then incubated in a Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) to be processed by calcium imaging to test which Ca^{2+} pool is involved in TCS-induced Ca^{2+} increase. TCS was added after (A) or prior (B) application of Thapsigargin (TG, 200 nM), a SERCA pump inhibitor, and also after (C) or prior (D) application of 4-Chloro-m-Crésol (4cmc, 1 mM), a known activator of RyRs. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50-80

cells as mean \pm s.e are presented. * P <0.01. The drugs applications are marked by horizontal bars.

Figure 3. Expression of Ryanodine Receptors in Prostate Cancer. The RyR1 and RyR2 channels expression was first assessed by RT-PCR in prostate cancer cell lines (androgen-dependent LNCaP and androgen-independent PC-3 and DU145 cell lines), primary cancer epithelial cells (hPEC) and normal epithelial cell line (PNT1a) (A). Immunofluorescence studies using a RyR1 or RyR2 specific antibody (green) were performed on grade 3 PCa formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (B and C) and on Benign Prostate Hyperplasia (BPH) formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (D and E). A: Acinus, S: Stroma.

Figure 4. Impact of TCS on cell proliferation and apoptosis resistance of LNCaP cells. (A) LNCaP cells (5×10^3) grown in 96 well plate in complete medium were treated with 2% FBS medium containing or not TCS at the indicated concentrations for 4 days, and cell proliferation was then measured via the MTS assay. *, P < 0.001 relative to CTL condition (B) The impact of TCS on apoptosis resistance was first assessed by Hoechst staining experiment. LNCaP cells treated for 48h with TCS (1 or 10 μ M) and/or TG (500 nM or 1 μ M) were stained with Hoechst and apoptotic cells (with nuclear condensation) were evaluated under a fluorescence microscope. The number of cells with apoptotic morphology was counted in 5 randomly chosen fields per one coverslip (150 - 200 cells). *, P < 0.001 relative to CTL condition, ** P < 0.001 relative to TG conditions. (C) Apoptosis resistance induced by TCS was also evaluated by DNA fragmentation experiment. LNCaP cells treated for 48h with TCS (1 or 10 μ M) and/or TG (500 nM) were lysed and their total genomic DNA was extracted and analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel.

Figure 5. Induction of SOCE modulation by TCS pretreatments. Western blot experiment was performed on LNCaP cells treated or not with TCS (0.1, 1 or 10 μ M) for 48h to evaluate its impact on calcium channels (A) and potassium channels (B) expression, channels known to be involved in SOCE. (C) Fourty-eight hours prior to recording Ca^{2+} signals by calcium imaging, LNCaP cells were treated with TCS (1 μ M) or not (CTL). For Ca^{2+} recording, cells were treated with 200 nM thapsigargin (TG) in Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) as indicated. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50-80 cells as mean \pm s.e are presented. A quantification of the SOCE for this experiment is presented in (D) (mean \pm s.e., n=50–80 cells), * P <0.001 relative to CTL condition. The TG application is shown by arrow and extracellular Ca^{2+} increase from 0 (0 Ca^{2+}) to 2 mM (2 Ca^{2+}) are marked by horizontal bars.

Figure 6. Direct modulation of SOCE by TCS. To test whether TCS could directly modulate SOCE, LNCaP cells (A) and PC-3 cells (B) grown on glass coverslips were submitted to calcium imaging under the following conditions : they were treated with 200 nM thapsigargin (TG) in a Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) either in the absence or presence of TCS (10 μM) To verify if TCS was able to inhibit directly SOCE calcium channels, the same experiment was conducted and TCS (10 μM) was added right after the 2 mM extracellular Ca^{2+} exposition (C). The panel D shows the control Ca^{2+} recordings of LNCaP cells treated with TCS (10 μM) in a Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) (D) Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50-80 cells as mean \pm s.e are presented.

Figure 7: TCS induces Orai1 translocation to the plasma membrane. LNCaP cells grown on glass coverslips in complete medium were submitted to the same protocol as the one for Ca^{2+} recordings described in Fig. 6A and D. They were then fixed for immunofluorescence studies and Orai1 protein expression was detected using a specific antibody (green) (A, B, C, D).

Figure 8: TCS does not modify STIM1 recruitment. LNCaP cells grown on glass coverslips in complete

medium were submitted to the same protocol as the one for Ca^{2+} recordings described in Fig. 6A and D. They were then fixed for immunofluorescence studies and STIM1 protein expression was detected using a specific antibody (green) (A, B, C, D).

Figure 9: Involvement of PKC in TCS-inhibited SOCE. For Ca^{2+} recording, LNCaP cells grown on glass coverslips were treated with 200 nM thapsigargin (TG) in a Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) either in the absence or presence of PMA (1 μM), a known activator of PKC, as indicated (A). To test the involvement of PKA, LNCaP cells were also treated with 200 nM thapsigargin (TG) in a Ca^{2+} -free bath solution (0 Ca^{2+}) and exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2 Ca^{2+}) either in the absence or presence of TCS (10 μM) and H89, a known inhibitor of PKA. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on a field of 25–40 cells and representative experiments performed on 50-80 cells as mean \pm s.e are presented. LNCaP cells grown on glass coverslips in complete medium were submitted to following protocol : cells were treated or not (C) with 200 nM thapsigargin (TG) in a Ca^{2+} -free bath solution (0Ca) and then exposed to 2 mM extracellular Ca^{2+} (2Ca) either in the absence (D) or presence (E) of PMA (1 μM). They were then fixed for immunofluorescence studies and STIM1 protein expression was detected using a specific antibody (green).

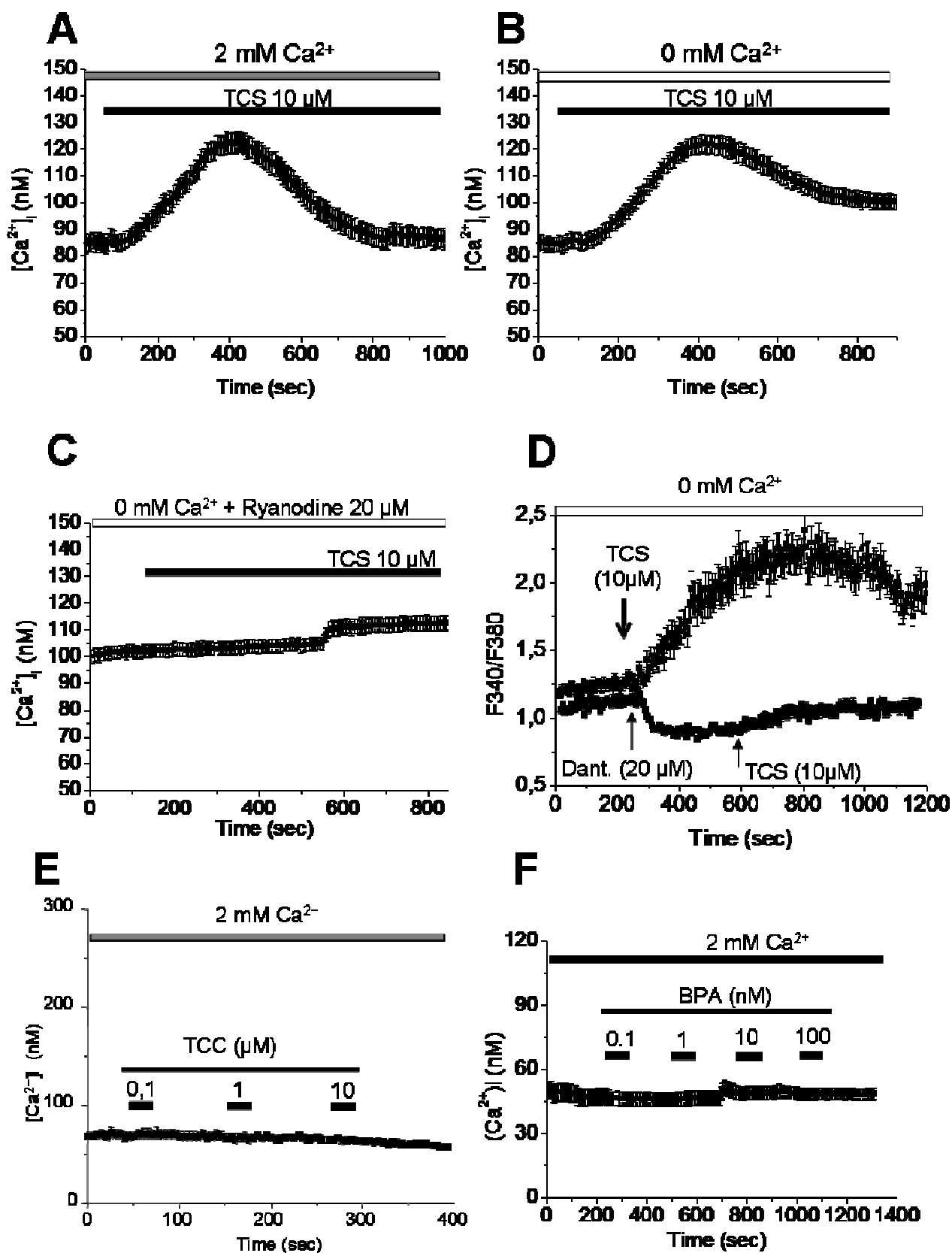


Figure 1: Derouiche et al., 2012

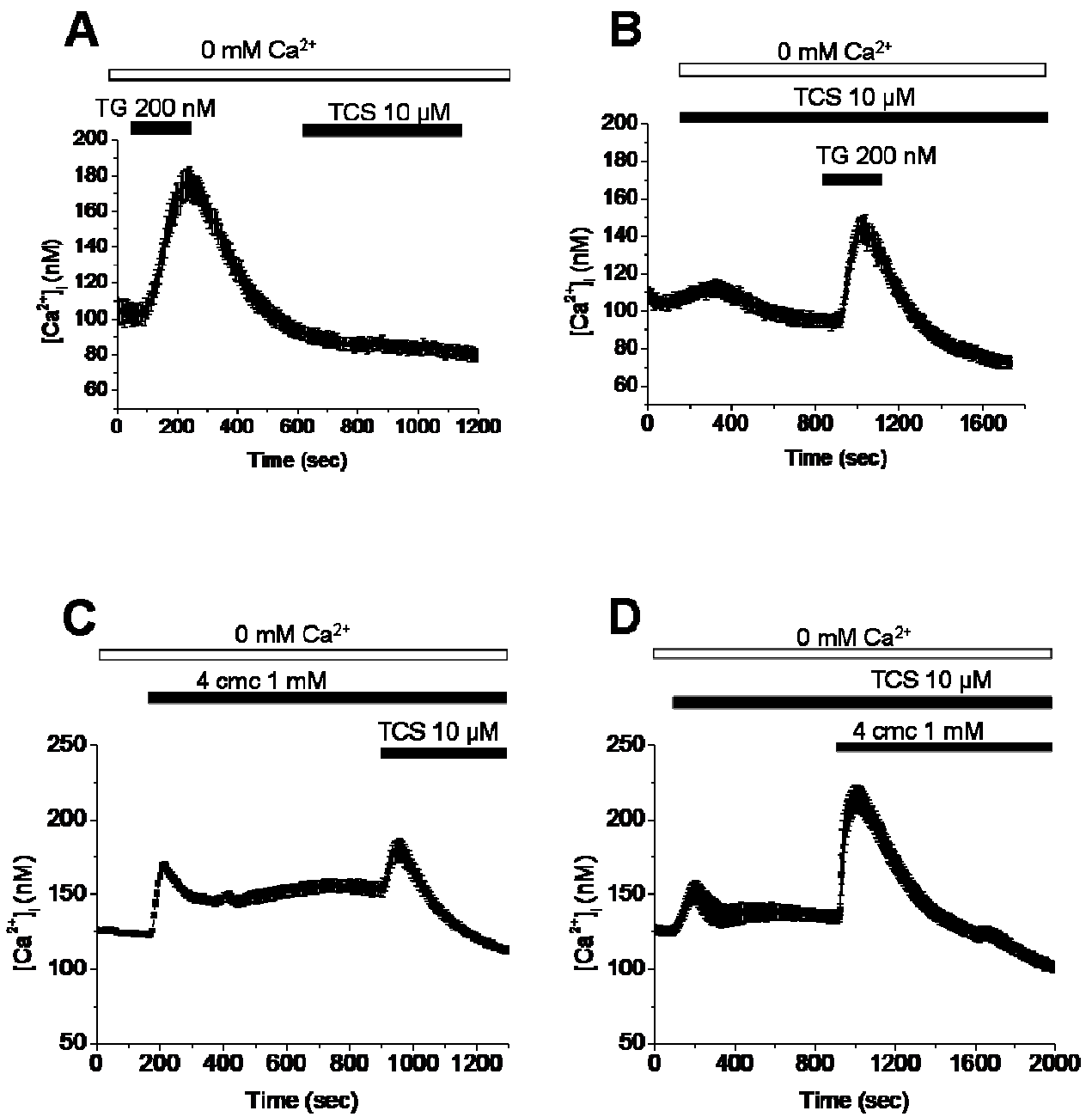


Figure 2: Derouiche et al., 2012

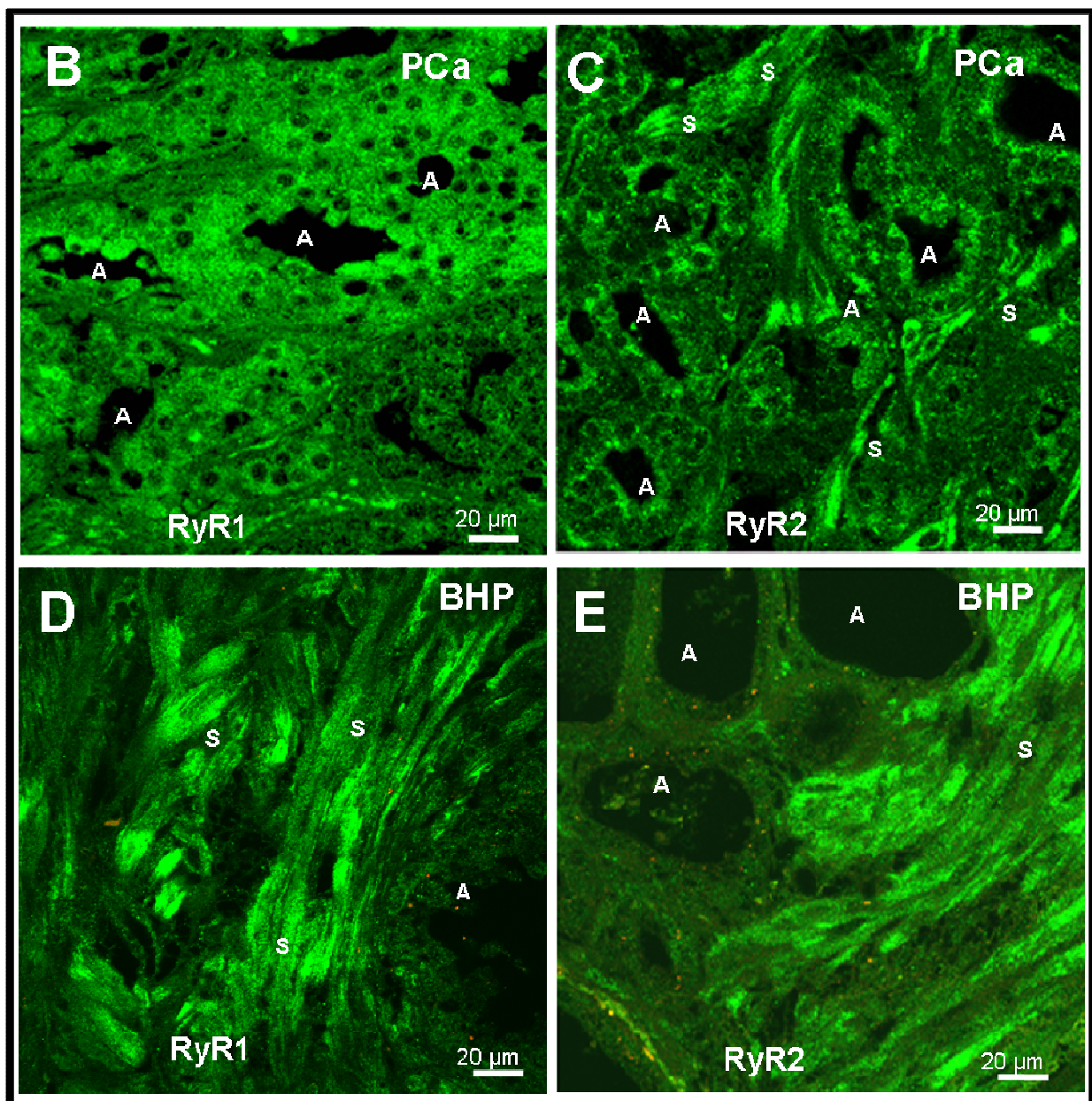
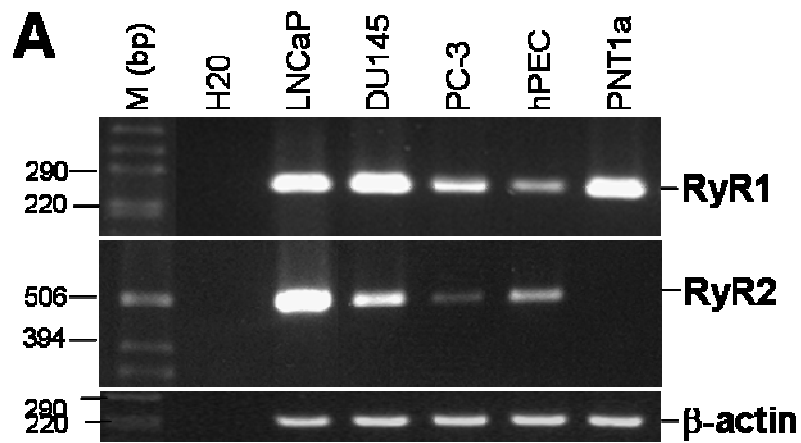
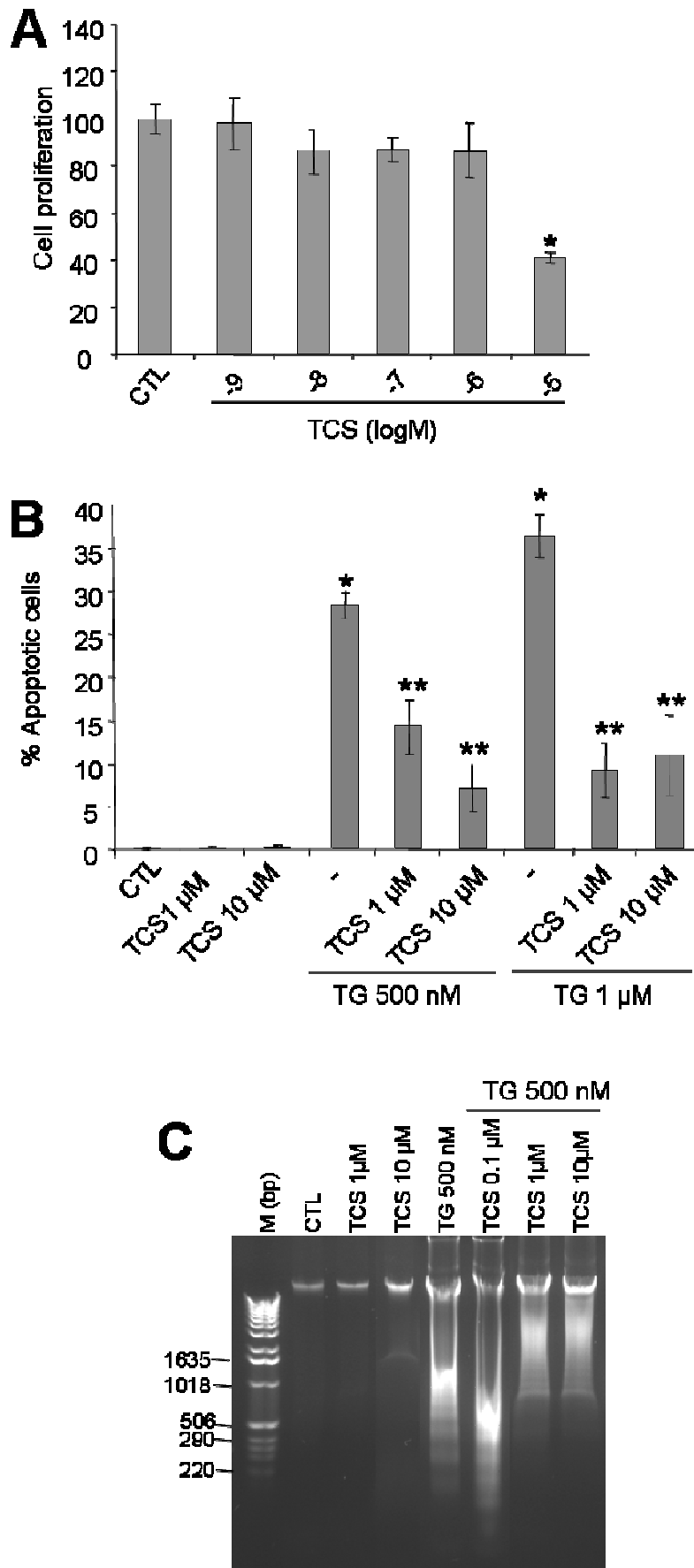


Figure 3: Derouiche et al., 2012



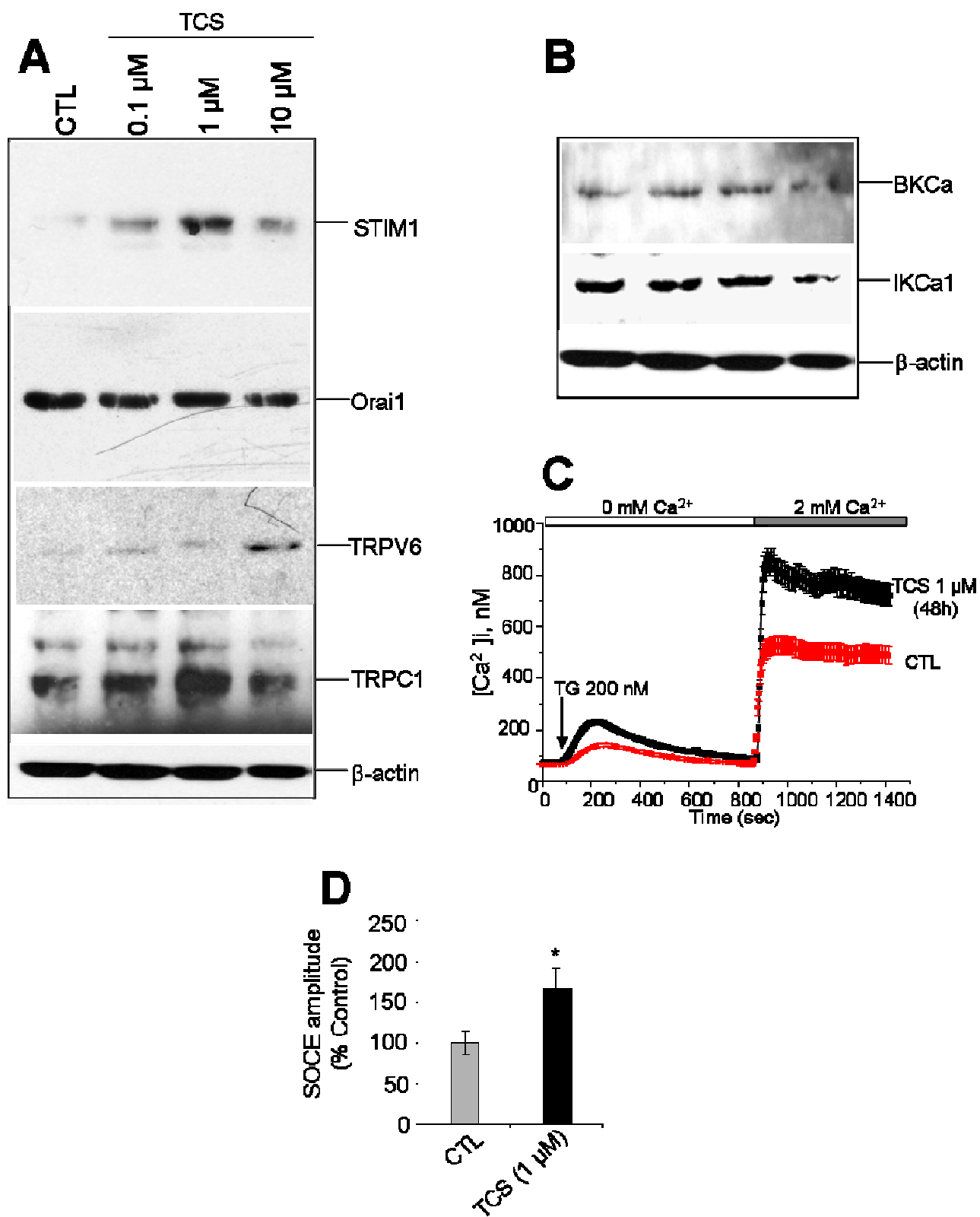


Figure 5: Derouiche et al., 2012

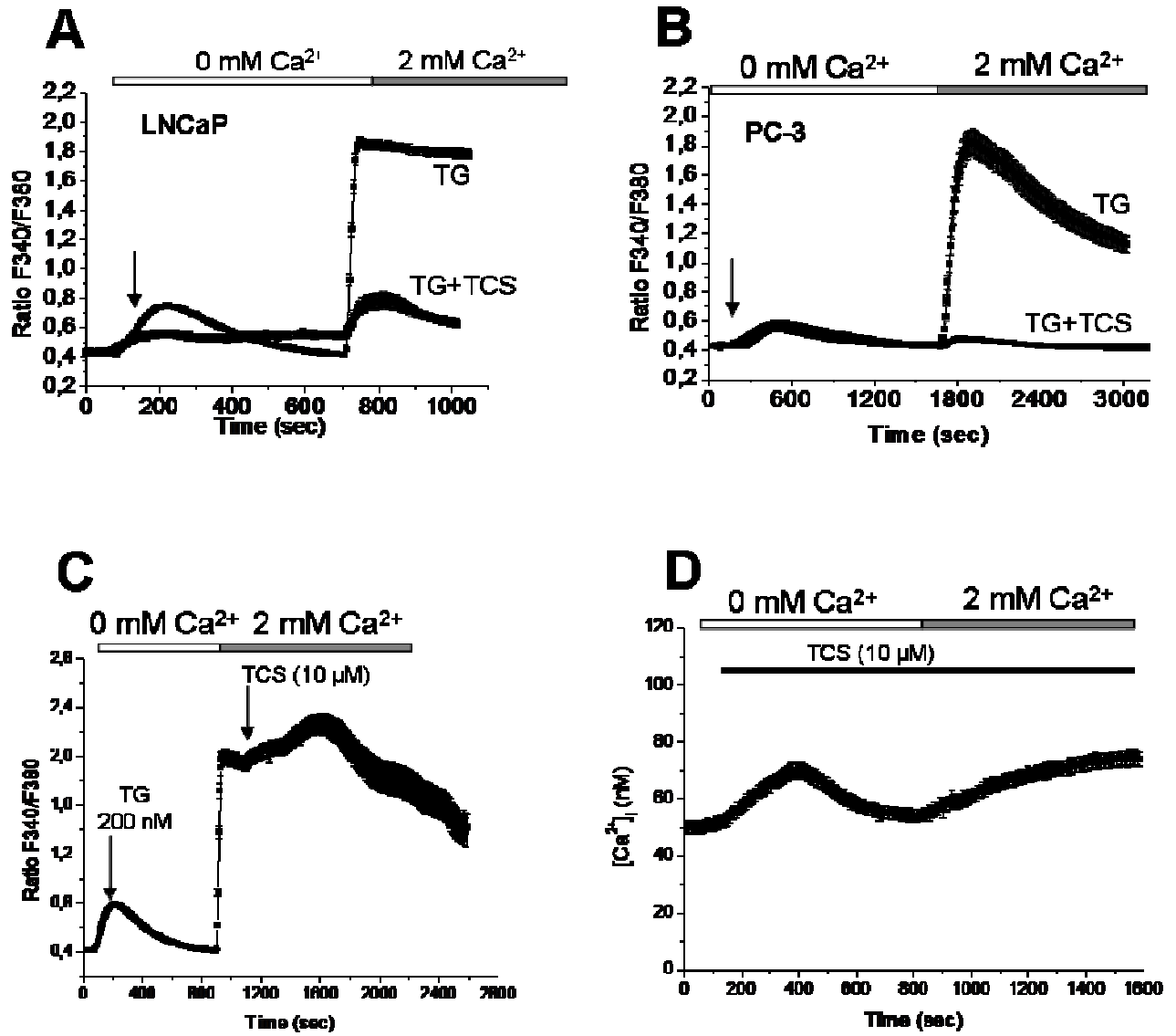


Figure 6: Derouiche et al., 2012

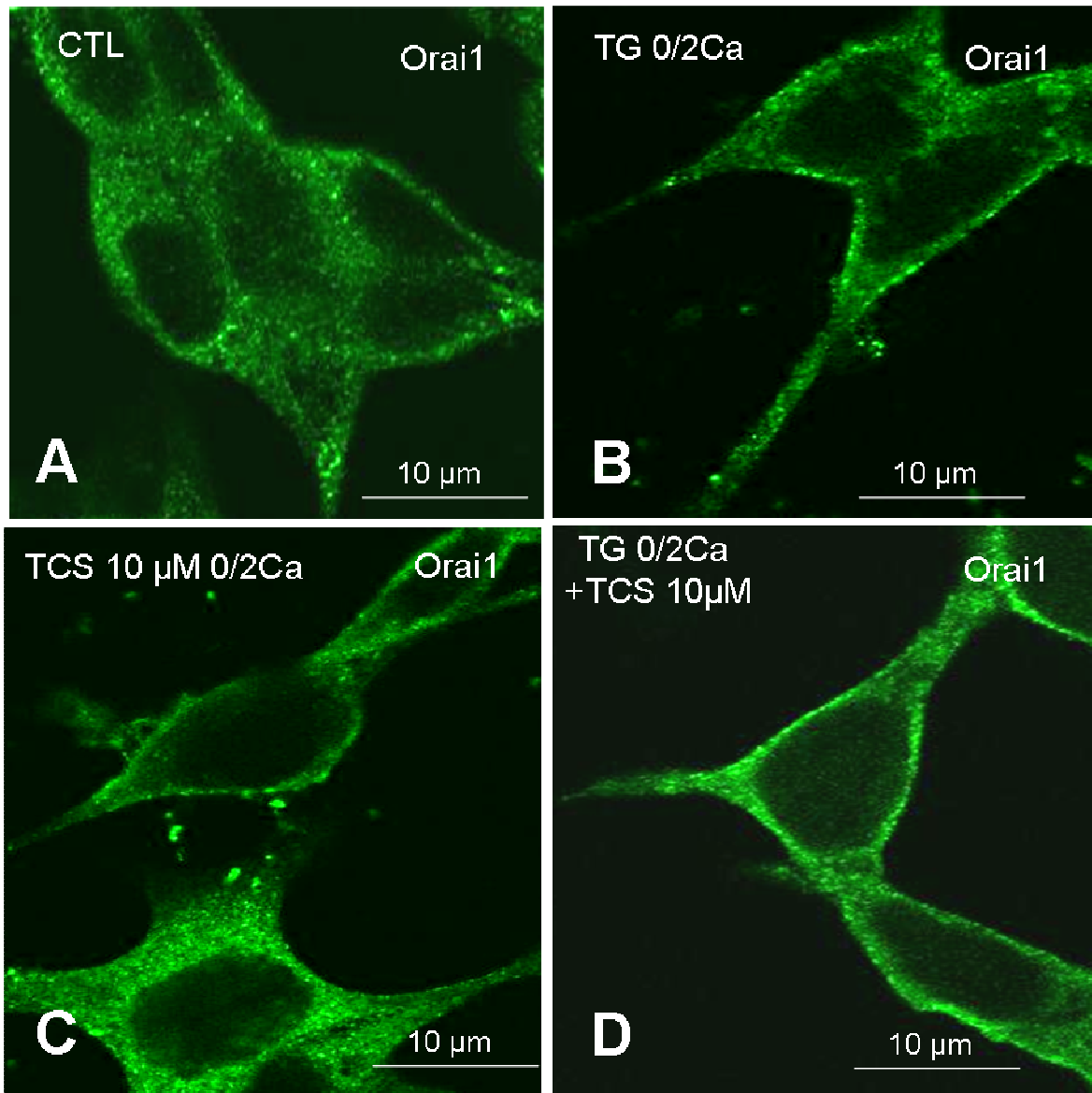


Figure 7: Derouiche et al., 2012

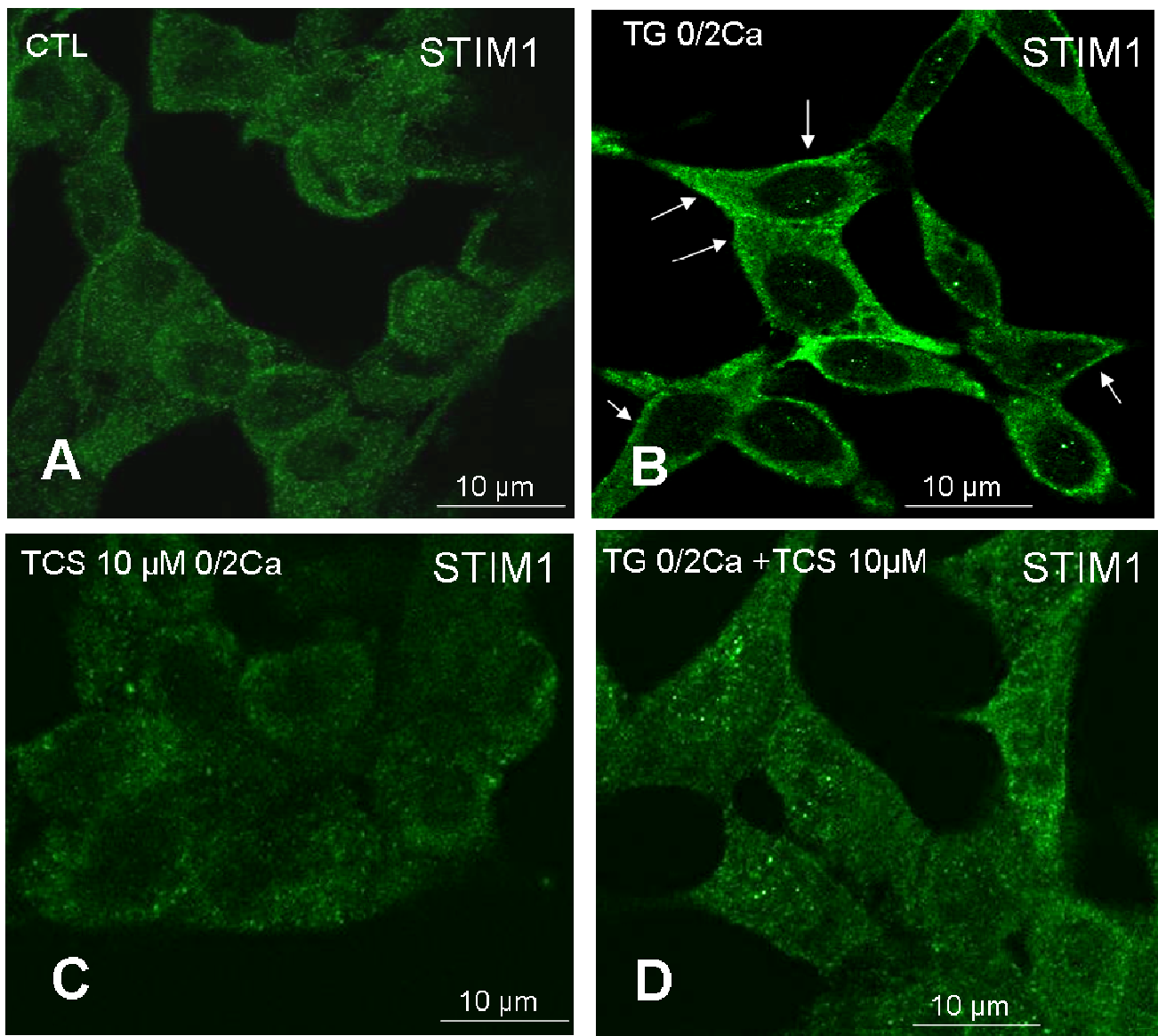


Figure 8: Derouiche et al., 2012

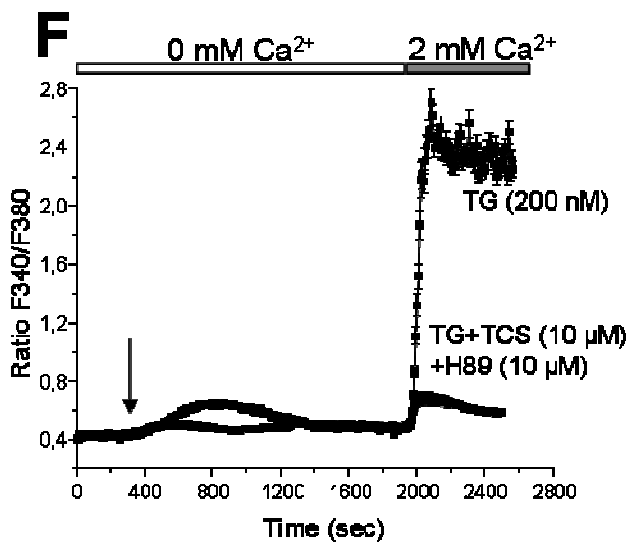
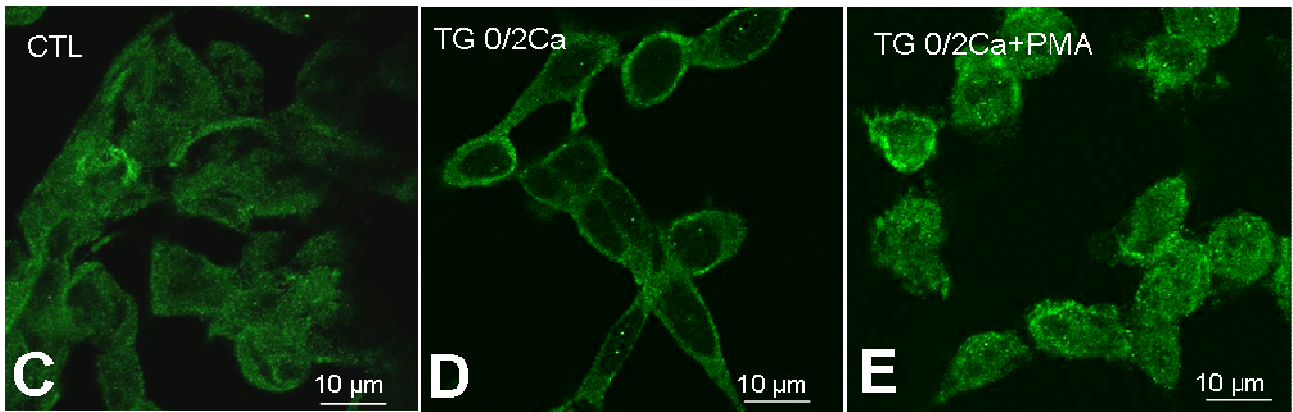
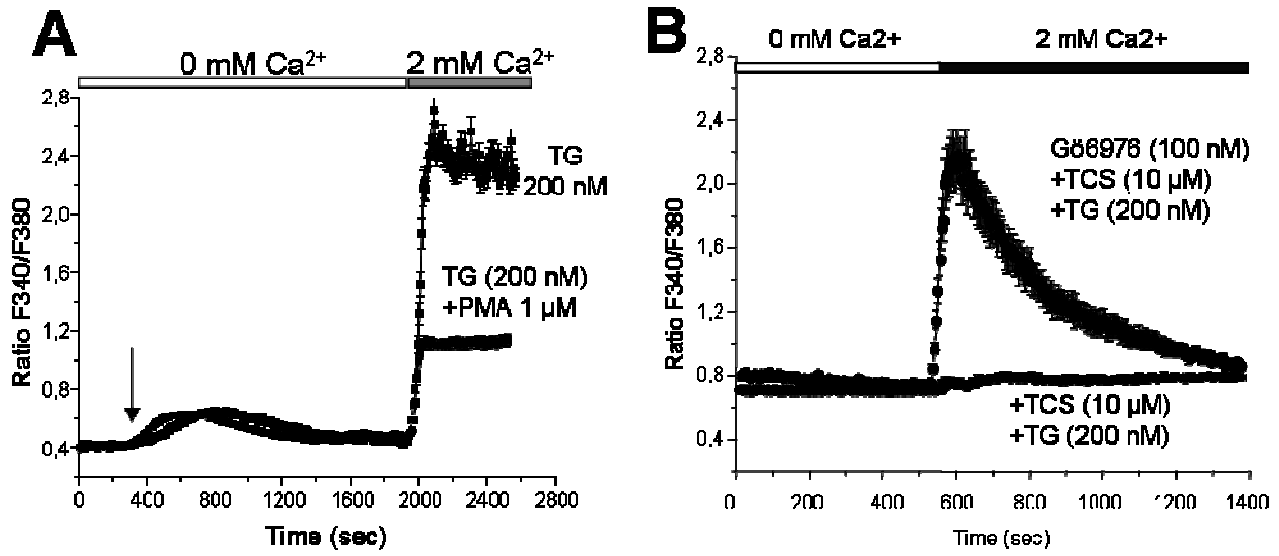


Figure 9: Derouiche et al., 2012

Article 3

Triclosan activates TRPA1 channel and VEGF secretion in human prostate cancer stromal cells

Sandra Derouiche, Marine Warnier, Pascal Mariot, Gabriel Bideaux, Pierre Gosset, Brigitte Mauroy, Jean-Louis Bonnal, Christian Slomianny, Philippe Delcourt, Natalia Prevarskaya and Morad Roudbaraki.

(Soumis, *Cancer Cell*)

Dans l'étude précédemment décrite, nous avons mis en évidence l'expression des canaux calciques RyRs dans les cellules stromales de régions cancéreuses prostatiques. Ayant montré que ces canaux étaient la cible du perturbateur endocrinien TCS dans les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques, nous nous sommes demandés quel pouvait être son impact sur les cellules stromales issues de l'environnement tumoral.

Les cellules stromales du microenvironnement tumoral étant connues pour leur capacité de sécrétion de facteurs solubles pour le développement des cellules cancéreuses épithéliales (Josson, *et al.*, 2010, Mücke and Ostman, 2004, Orr, *et al.*, 2012, Pollak, *et al.*, 1998), nous avons orienté nos recherches sur l'impact du TCS sur l'homéostasie calcique des cellules stromales et le potentiel effet sur la capacité de sécrétion de ces cellules.

Nous avons ainsi montré que dans les cellules stromales issues de cancer prostatique humain le TCS déclenchait un mécanisme différent de celui observé dans les cellules épithéliales cancéreuses. Par des études d'imagerie calcique combinées à l'utilisation d'une large pharmacologie ou la stratégie de siARN, nous avons démontré que des concentrations environnementales pertinentes du TCS induisaient une entrée importante de calcium en activant un membre de la famille des canaux TRP, le canal cationique TRPA1. Des études menées par immunofluorescence nous ont permis de mettre en évidence que ce canal était préférentiellement exprimé dans les cellules stromales de régions cancéreuses. Par ailleurs, le dosage par la technique ELISA de différents facteurs de croissance dans le milieu conditionné des cellules stromales exposées au TCS nous a permis de montrer que l'activation du canal TRPA1 par le TCS était associée à la sécrétion par les cellules stromales du VEGF, un facteur angiogénique et mitogénique qui permet le développement des cellules endothéliales et/ou épithéliales.

Nos résultats suggèrent donc que le ciblage du canal TRPA1 pourrait être un avantage pour limiter la progression tumorale. La mise en évidence de ces effets directs du Triclosan sur le canal TRPA1 exprimé dans le cancer pourrait permettre d'envisager de nouvelles thérapies ou thérapies complémentaires ciblant ce canal, et/ou des mesures préventives dans le traitement des cancers prostatiques qui tiennent compte de l'impact de ces facteurs environnementaux.

Antibacterial agent Triclosan promotes prostate cancer progression via TRPA1 channel activation in stromal cells and VEGF secretion

Sandra Derouiche¹, Pascal Mariot¹, Marine Warnier¹, Gabriel Bidaux¹, Pierre Gosset², Brigitte Mauroy^{1,3}, Jean-Louis Bonnal^{1,3}, Christian Slomianny¹, Philippe Delcourt¹, Natalia Prevarskaya¹ and Morad Roudbaraki^{1*}.

¹Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Université Lille I Sciences et Technologies, Villeneuve d'Ascq, France

²Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du groupement hospitalier de l'Institut Catholique de Lille, Faculté Libre de Médecine, Lille

³Service d'Urologie de l'hôpital St-Philibert

Running title: Triclosan activates TRPA1 ion channel

Key words: Triclosan, Prostate cancer, Endocrine disruptor, VEGF, Ion channels, TRPA1

*To whom correspondence should be addressed:

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003

SN3, Université Lille I Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

Fax: (33) 3 20 43 40 66

Tel : (33) 3 20 33 64 23

e-mail: morad.roudbaraki@univ-lille1.fr

SUMMARY

Accruing evidence indicates that exposure to environmental compounds may adversely impact human health, and promote carcinogenesis. Triclosan (TCS) is an antimicrobial agent widely used as a preservative in personal care products. However, it has been shown to act as an endocrine disruptor in hormone dependent tissues such as prostate and breast. Here we demonstrate a new molecular mechanism by which TCS stimulates the secretion by human prostate cancer stromal cells of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), a factor known to promote tumour growth. This mechanism involves an increase in intracellular calcium levels, due to the direct activation of the TRPA1 (Transient Receptor Potential Ankyrin 1) channel. Our data demonstrate an impact of the environmental factor on the tumor's microenvironmental interactions, by activating a tumor stroma-specific ion channel.

SIGNIFICANCE

Tumor stroma play decisive roles in pivotal processes such as tumor cell proliferation, vascularization and invasion. By modulating the function of the stromal cells, the environmental molecules, including an antibacterial agent Triclosan (TCS), may

impact prostate cancer development and progression. We show here that TCS activates the TRPA1 calcium channel, induces a calcium increase in human prostate cancer stromal cells and VEGF secretion and epithelial cell proliferation. The data may allow new preventive measures to be considered for prostate cancers. The exclusive expression of the TRPA1 channel in prostate cancer stromal cells highlighted in this study could constitute a potential target for therapeutic intervention in order to inhibit tumor progression and to provide a new potential marker for tumor stroma.

HIGHLIGHTS

- Triclosan activates TRPA1 and calcium increase in human prostate cancer stromal cells
- TRPA1 channel is exclusively expressed in prostate cancer stromal cells.
- TRPA1 activation by TCS induces VEGF secretion by stromal cells.
- TCS-induced secretion favors prostate cancer epithelial cell proliferation.

INTRODUCTION

Prostate cancer (PCa) is one of the major causes of cancer-related death in the western world. Androgen-deprivation therapy (ADT) to prevent androgens

binding to the androgen receptor (AR) has been the norm of prostate cancer treatment for the last decades. Despite early success in suppressing prostate tumor growth, ADT eventually fails leading to recurrent tumor growth in a hormone-refractory manner suggesting the involvement of potential pathways other than the AR activity.

Carcinomas, which originate from epithelial tissues, are the most common type of human cancer. In cancer tissue, following epithelial changes, the surrounding stroma is inevitably modified by cancer cell-derived cytokines, such as transforming growth factor- β (TGF- β). These modifications drive the emergence of the characteristic reactive stroma, which promotes the invasive and metastatic properties of cancer. Carcinoma-reactive stromal tissues include non-epithelial cells such as fibroblasts, inflammatory cells (lymphocytes, macrophages and mast cells) and vasculature-related cells (endothelial cells, pericytes and smooth muscle cells). These modified stromal cells secrete extracellular matrix (ECM) proteins and soluble factors, which in turn play important roles in carcinoma development, as they not only permit but also induce the initiation and progression of certain carcinomas (Bhowmick, *et al.*, 2004, Bhowmick and Moses, 2005, Hu and Polyak, 2008, West and van de Rijn, 2007). Because the growth of tumor cells is regulated by stromal cells through diffusible factors secretion and cell-cell interactions, tumor-stromal cell interactions significantly contribute to the development of different carcinomas, such as breast and prostate cancers (Grossfeld, *et al.*, 1998, Tuxhorn, *et al.*, 2001, Wernert, 1997, Wiseman and Werb, 2002). Many growth factors and cytokines are known to be involved in the regulation of tumor-stromal cell interactions (Micke and Ostman, 2004, Pollak, *et al.*, 1998, Tuxhorn, *et al.*, 2001). Accumulating evidence indicates that exposure to environmental compounds may adversely impact human health. The continuous use of a number of antimicrobial agents and preservatives present in personal care products such as soaps, shampoos, detergents, disinfectants, cosmetics and pharmaceutical products (Cabana, *et al.*, 2007, Darbre, 2006, Lakeram, *et al.*, 2007) results in their accumulation at detectable concentrations within different parts of our body like blood, milk, and various organs and tissues (Darbre, 2006, Dayan, 2007, Heidler, *et al.*, 2006, Nakada, *et al.*, 2006). Triclosan (TCS; 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether; a chlorophenol) is an antimicrobial agent widely used as preservative in toothpastes, soaps, shampoos, and cosmetics (Black, *et al.*, 1975). In general, TCS has been known to be a highly toxic chemical for aquatic flora and fauna (Tatarazako, *et al.*, 2004) and thus has been included in the probable list of endocrine disruptors on account of its resemblance with known non-steroidal estrogens or their mimetics (e.g. diethylestradiol, bisphenol A). The mode of action of TCS as an EDC is controversial and various studies indicate it to be either estrogenic, or weak androgenic or even anti-androgenic (Foran, *et al.*, 2000). Another study reported that the metabolite of TCS may be a weak estrogenic compound (Ishibashi, *et al.*, 2004). TCS has also been shown to function as an anti-androgen since it inhibits

testosterone-induced transcriptional activity (Chen, *et al.*, 2007). This chemical has been reported to be absorbed mainly by two routes: either across the skin or through the gastrointestinal tract (Dayan, 2007). Considering this systemic exposure, it was not surprising that TCS was detected in human plasma (at concentration of 1-10 μ M) and that daily exposure to TCS of breast tissue was estimated to be of 5.5 μ M (Ahn, *et al.*, 2008, Kumar, *et al.*, 2009). It was shown that at such levels, TCS was able to modulate the growth of mammary cancer cells (Gee, *et al.*, 2008). Recent data showed that TCS exerts its effects via several mechanisms of action including the modulation of AR via an anti androgenic action (Chen, *et al.*, 2007), the modulation of the activity of an adenylyl cyclase enzyme (Kumar, *et al.*, 2008) and recently, via activation of calcium signalling (Ahn, *et al.*, 2008). Taken together, these data demonstrate that some widely used antimicrobial compounds like TCS have different effects according to the considered cell systems and thus warrant further investigations to understand their impact on human health.

As the epithelial stromal interactions play a pivotal role in the progression of the prostate cancers, the environment factors like TCS may impact these interactions to favour this progression. The present report was designed to determine the effects of TCS and TCC on both epithelial and stromal cells derived from prostate cancer tissues. Our work was then focused on the effects of these environmental factors on calcium signalling, an important parameter controlling the secretion of the mitogenic and/or angiogenic factors by stromal cells known to trigger the epithelial and endothelial cells. The data presented here demonstrate that a widely used antimicrobial compounds like TCS could have an important impact on prostate carcinogenesis through the activation of TRPA1 calcium permeable channels and subsequent release of VEGF.

RESULTS

Triclosan induces calcium signalling in human prostate cancer stromal cells (PrSC)

We first assessed the effects of Triclosan (TCS) and its structural analogue, triclocarban (TCC), on prostate cancer stromal cells. After obtaining a primary culture by the explant method, PrSC were first characterized for the expression of stromal cells markers. This was done by immunofluorescence studies using antibodies to α -actin and vimentin, two known stromal cell markers (Fig. 1C and 1D, inserts). Seven different cultures originating from 7 patients were included in this study.

We began by using calcium imaging to study the effects of triclosan (TCS) and its

structural analogue, triclocarban (TCC) (see chemical structures in insets in Fig. 1A and 1B), on the cytosolic free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) present in these characterized human prostate cancer stromal and epithelial cells. The $[Ca^{2+}]_i$ was continuously monitored as a F340/F380 fluorescence ratio, using a Fura-2/AM calcium probe in a normal HBSS medium containing 2 mM $CaCl_2$ and then, at the times indicated, TCS or TCC was applied to the cells. In these experiments, TCS induced a rapid and dose-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ with a high amplitude in stromal cells (PrSC) (Fig. 1A). These observations suggest that triclosan is able to induce either calcium entry and/or a Ca^{2+} release from intracellular stores. These effects appear to be specific to TCS as in the same experimental conditions, TCC, which shares a similar structure (see insets in Fig. 1A and 1B), failed to elicit any significant modulation in basal $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 1B). In these calcium-imaging experiments, TCS induced two different types of response with regards to kinetics and amplitudes (Fig. 1C and 1D). TCS induced a short initial rapid phase, followed by a sustained plateau, characterized by either a high (Fig. 1C) or a low amplitude (Fig. 1D). The combined calcium-imaging and immunofluorescence studies using α -actin and vimentin antibodies, suggest that these two different types of calcium response are correlated in stromal cells populations, to the preponderance of myofibroblasts (expression of α -actin) for the high-amplitude plateau phase (Fig. 1C) and to the preponderance of fibroblasts (low abundance of α -actin positive cells) for the low amplitude plateau phase (Fig. 1D). Indeed, as illustrated in Figure 1C, when a low percentage of cells were α -actin-positive, the response to TCS consisted in a short initial rapid phase followed by a sustained plateau phase with a low amplitude. Similarly, in high α -actin-positive cells, the plateau phase appeared to have a high amplitude (Fig. 1D). Moreover, in calcium imaging experiments, after the application of TCS at 5–10 μ M, we clearly observed a reduction in high α -actin-positive cells populations. Indeed, the pronounced effects of TCS on calcium entry was observed in 6 out of 7 cell cultures studied. In the same manner, the action of TCS was also

assessed on primary cultured human prostate cancer epithelial cells (hPEC). Calcium-imaging experiments revealed that TCS only induced a calcium response (Fig. 1F) through calcium mobilization *via* RyR activation, as shown by Ahn et al. (Ahn et al., 2008) without promoting any calcium entry.

The origin of the TCS-induced calcium increase in human prostate stromal cells

To identify the extra- or intracellular origin of the $[Ca^{2+}]_i$ increase, PrSC were challenged during calcium imaging experiments with TCS in Ca^{2+} -free HBSS medium (Fig. 1E), followed by the addition of 2mM calcium whilst still in the presence of TCS. In the absence of external calcium, TCS induced a slight calcium response due to a mobilisation of calcium from intracellular pools. We observed that this calcium mobilization was inhibited by Dantrolene (10 μ M), suggesting the involvement of Type I Ryanodine Receptors (RyRs) (data not shown) as previously described in mouse skeletal myotubes (Ahn et al., 2008). Interestingly, as shown in Figure 1e, when calcium was added to the external buffer, TCS induced a rapid and high amplitude calcium entry, *via* the activation of the plasma membrane calcium channels. We therefore undertook experiments in order to identify those calcium-permeable membrane channels involved in these TCS effects.

Involvement of the non-voltage-dependent cation channel TRPA1 in the TCS-induced calcium entry

To further investigate the membrane ion channels involved in TCS-induced calcium entry, we used an extensive pharmacology, comprising blockers of voltage-dependent and non-voltage-dependent calcium channels and also those of potassium channels (Fig. 2A). Surprisingly, many of blockers tested, including nifedipine, nitrendipine and cadmium, inhibitors of L-Type voltage-dependent calcium channels, 2-APB, flufenamic acid and clotrimazole, inhibitors of non-voltage-dependent calcium channels (TRP), were able to elicit an increase in $[Ca^{2+}]_i$ somewhat similar to that induced by TCS (Fig. 2B and Fig. 2C). On consulting the literature, we discovered that all these ion channel modulators were also activators of a

unique ion channel, the TRPA1 cation channel (Fajardo et al., 2008; Gu and Lin, 2010; Hinman et al., 2006; Hu et al., 2010; Meseguer et al., 2008). We thus assessed whether TRPA1 could be the ion channel activated by and implicated in the calcium response induced by TCS in human PCa stromal cells.

To test the involvement of TRPA1 channel, we first used ruthenium red (RR) as a non selective inhibitor of the channel. By applying this agent prior to TCS, we observed that the TCS-induced calcium entry was blocked by RR, in a dose-dependent manner (Fig. 3A). Moreover, the calcium increase observed for flufenamic acid (a previously tested blocker) was also inhibited by ruthenium red (Fig. 3B). We next used a selective TRPA1 inhibitor : the compound HC-030031, which also showed a dose-dependent inhibitory effect on the calcium response to TCS, reaching maximum inhibition for a concentration of 200 μ M (Fig. 3C). In these experiments, a significant decrease in basal calcium concentration was observed after the addition of the HC-030031 TRPA1 inhibitor (200 μ M) (Fig. 3C) and the non-specific channel inhibitor (RR, 50 μ M) (Fig. 3C). These observations suggest that TRPA1 is involved in setting the basal calcium concentration in hPSC. To confirm the involvement of TRPA1 channel in TCS-induced calcium response, we also used siRNAs targeting TRPA1 (siTRPA1) in order to down-regulate the TRPA1 protein. Using RT-PCR and immunofluorescence techniques, we first showed that the siTRPA1 transfection (25 nM) of stromal cells induced a significant down-regulation of both the TRPA1 mRNA (by 70%) and protein in these cells (Fig. 3D). Then, stromal cells were transfected in the same conditions with a control siRNA (siCTL) or siTRPA1 (25 nM each) and used 48h post-transfection. In these experiments, the TCS-induced calcium entry was almost completely blocked in siTRPA1-transfected cells (Fig. 3E), leading to the conclusion that TRPA1 is the main actor of the TCS-induced calcium response. In order to confirm the functional expression of TRPA1 in our PCa stromal cells, we studied the effects of a known TRPA1 agonist (Allyl Isothiocyanate, AITC) on cytosolic free calcium concentration in stromal cells. In these experiments, a dose-dependent effect of AITC (1-100 μ M) was

observed (data not shown). As shown in Figure 3F, AITC (30 μ M) induced a calcium increase, which was inhibited by HC-030031 (200 μ M), suggesting its involvement in the functional TRPA1 expression in our PCa stromal cells. We further investigated the potential TRPA1 activation by TCS in PrSC through electrophysiological approaches using whole-cell patch clamp techniques. In these studies, a voltage ramp of -100 to +120 mV was applied and the resulting currents were recorded in the absence (CTL) or in the presence of TCS in the extracellular medium. As shown in Figures 4A-4D, within few seconds after the perfusion onset, TCS induced a large increase in membrane conductance at all membrane potentials. TCS-induced membrane current displayed a slight outward rectification and reversed around 0 mV. This TCS-induced current was reversible when cells were washed with TCS-free buffer and was inhibited by the addition of HC-030031 (100 μ M). The action of TCS was similar to that of AITC, which was able to activate TRPA1 current, an effect also inhibited by HC-030031 (100 μ M), in PrSC (Fig. 4E and 4F). In order to confirm the involvement of TRPA1 in TCS-induced current, the effects of TCS were studied in hTRPA1-HEK293 cells stably expressing the human form of TRPA1. In these cells, both TCS (10 μ M) and AITC (50 μ M) reversibly increased membrane conductance, as in stromal cells, whereas the TCS was ineffective in vector-transfected cells (vector-HEK293 cells). (Fig. 5C and 5D). TCS and AITC induced-current were also inhibited by HC-030031 (100 μ M).

These data clearly show that antibacterial TCS induces the activation of hTRPA1 (Fig. 5A and 5B). We next tested whether TCS could activate TRP family ion channels other than TRPA1. In HEK cells stably expressing TRPM8, a cationic channel which is activated by cold temperatures and cooling agents such as menthol and icilin, TCS was unable to induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$ (data not shown). Furthermore, at concentrations of 200 μ M, the HC-030031 compound failed to block the activation of TRPM8 by icilin, which further confirmed the specificity of the TRPA1 blocker used in our studies (data not shown).

Expression of TRPA1 channel in the human PCa stromal cells (PrSC)

We showed that TCS is able to activate TRPA1 channels thereby inducing calcium entry in stromal cells. We further studied the expression of the TRPA1 channel in human PCa epithelial cell lines and in primary cultured stromal cells originating from cancer patients' prostate tissues. First, by RT-PCR analysis, we observed an absence of TRPA1 expression in epithelial cells, while stromal cells obtained from different PCa tissues all expressed the mRNA for TRPA1 (Figure 6A). To examine TRPA1 expression in hTRPA1-HEK293 cells, we carried out western-blot experiments. As shown in Figure 6B, the antibody revealed a band of expected size (~130 kDa) and a band of higher molecular weight, which could represent a glycosylated form of TRPA1 protein. The same antibody failed to detect any protein in a total protein extract from vector-HEK293 cells. The antibody was then used in western blot experiments performed on differing prostate cancer epithelial cell lines (LNCaP and PC-3), primary cultured epithelial (hPEC) and several patients' stromal cells used in the present study. Interestingly, as shown in Figure 6C, the TRPA1 protein was only present in protein extract from stromal cells. This is in agreement with our results showing a stimulation of an HC-030031-sensitive calcium entry by TCS in stromal, but not in epithelial cells. Immunofluorescent-staining was used to further study the expression of the TRPA1 channel protein in 3 different non-cancer (BPH) and cancer (PCa) tissues utilising formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Because the α -actin (smooth muscle actin) expression was restricted to the stroma, the positive staining for α -actin was used to discriminate between the epithelium and the stroma. Co-immuno-labeling for TRPA1 (in green) and α -actin (in red) showed overlapping staining in prostate cancer regions showing a preferential expression of TRPA1 protein in the stromal cells of cancerous regions (Fig. 6D and 6E) and in the primary stromal cell cultures (Fig. 6F). The same co-immuno-labeling experiments performed in non cancer (BPH) regions did not reveal any staining for TRPA1 protein or in epithelial cells (Fig. 6H), or again in stromal cells, whereas α -actin (in red) was clearly expressed in stromal cells (Fig. 6G and 6H). A control

immunofluorescence experiment, where the primary antibody (anti-TRPA1) was omitted, is presented (Fig. 6I). These data clearly show the preferential expression of TRPA1 in prostate cancer stromal cells. To extend these data to other cancers, we studied the expression of the TRPA1 in 3 breast non-cancer and cancer tissues. As shown in Fig. 6J-6L, the TRPA1 protein level is higher in cancerous regions of breast tissues. These data suggest both that TRPA1 expression is a common feature in cancer and that the effects of TCS on TRPA1 channels could be of importance in cancer progression, as they induce calcium entry and a possible secretion of factors necessary for epithelium-stroma interaction.

Triclosan induces secretion of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by stromal cells

It has been previously shown that stromal cells secrete a number of factors which are able to modulate prostate epithelial and endothelial cell growth (Russell et al., 1998). Recently, Kawada et al. clearly showed that PrSC increased human prostate cancer epithelial cell growth in vitro *via* the secretion of mitogenic factors and significantly enhanced the tumorigenicity of the prostate cancer epithelial cells in male SCID mice (Kawada et al., 2006; Kawada et al., 2004). It is conceivable that TCS, by modifying calcium signaling, could trigger the secretion of mitogenic factors by stromal cells, leading to epithelial PCa cell growth. To assess the influence of TCS on epithelial-stromal interaction, we examined the impact of TCS-pretreatments of PrSC on the proliferation of PC-3 PCa epithelial cells. In this context, we observed that when PrSC cells were cultured in CS-RPMI supplemented with 10 % FCS, the PrSC-conditioned media stimulated a 100% increase in the proliferation of PC-3 cells. When PrSC cells were cultured in CS-RPMI with 0,1 % FCS, the PrSC-conditioned media failed to stimulate the proliferation of PC-3 cells. Interestingly, in this low-serum condition, the conditioned media from TCS-pre-treated PrSC induced an increase in PC-3 cell growth (Fig., 7A). We then carried out ELISA measurements of growth factor secretion in CTL and TCS treated PrSC media. The IGF-1

concentration was too low to be in our detection range but interestingly, the incubation of stromal cells with TCS (1–10 μ M) clearly induced an increase in VEGF secretion (600 to 800% increase vs CTL) (Fig. 7B). In addition, TCS-induced VEGF secretion was inhibited by the TRPA1 inhibitor HC-030031, thereby suggesting the involvement of TRPA1 channel in the effects of TCS on VEGF secretion by prostate stromal cells.

DISCUSSION

The present study reports for the first time the potential impact of an environmental factor, the Triclosan (TCS), a widely used antibacterial in cosmetics and hygienic products on the human prostate cancer progression through the activation of TRPA1 calcium channels expressed in human prostate cancer stromal cells. Indeed, we have shown that the TCS induced an important calcium entry in primary cultured stromal cells of human prostate cancer tissues, cells known to secrete mitogenic factors able to affect the surrounding epithelial and vascular cells. We have highlighted the activation by TCS of a calcium channel, the TRPA1 channel, located on the plasma membrane. Subsequently, for the first time, we show the exclusive expression of TRPA1 channels in human prostate cancer stromal cells. As schemed in Figure 7c, taken together, our data show that the environment factor TCS induces calcium increase predominantly by activating the TRPA1 channel. The TCS-induced calcium response induces the secretion of factors targeting epithelial and/or endothelial cells to promote cell growth and/or migration and angiogenesis favouring thus the cancer progression.

Interestingly, we showed that the TCS-induced TRPA1 activation and subsequent calcium entry stimulated the secretion of VEGF, a factor known to modulate the growth of epithelial and endothelial cells and to promote tumor progression (Wong and Wang, 2000).

TRPA1 is considered a key player in acute and chronic (neuropathic) pain and inflammation. Moreover, its role in the (patho)physiology of nearly all organ systems is anticipated, and will be discussed along with the potential of TRPA1 as a drug target for the management of various pathological conditions. TRPA1 receptor is an excitatory non selective cation channel which is expressed in a subset of sensory neurons believed to be involved in many forms of acute and chronic hyperalgesia (Bautista, *et al.*, 2006, Obata, *et al.*, 2005).

We show here that TRPA1 channels are expressed exclusively in the stromal cells of the cancer regions and are involved in the secretion of the stromal factors. Initially reported to sense noxious cold (Story, *et al.*, 2003), TRPA1 receptors have subsequently been shown to act as sensors of many environmental irritants, including acrolein, formaldehyde and zinc, pungent plant ingredients such as mustard oil, cinnamaldehyde, and

allicin, and endogenously produced substances such as hydrogen peroxide and 4-hydroxynonenal (Andrade, *et al.*, 2012).

Our data suggest that the antimicrobial TCS has to be included to the long list of environmental factors inducing TRPA1 channel activation. However, the fixation site of the TCS on the TRPA1 channel needs further investigations using the mutants of the channel in different intracellular and extracellular ligand binding domains of the channel.

In addition to the environmental factors, several endogenous activators for TRPA1 were also shown which may modulate the secretion of paracrine factors by stromal cells. TRPA1 is an attractive candidate because it can be activated by molecules that are produced during oxidative phosphorylation such as hydrogen peroxide (H_2O_2) and 4-Hydroxynonenal (4-HNE) and cyclopentenone prostaglandins (PGJ_2) (Andersson, *et al.*, 2008). Recently, TRPA1 has been shown to be activated by Methylglyoxal (MG), formed from triose phosphates during secondary glucose metabolism in hyperglycemic condition (Cao, *et al.*, 2012).

Clinical data have shown that formaldehyde concentration is elevated (2,8 fold) in the urine of patients with prostate and bladder cancer (Spanel, *et al.*, 1999) and in the expired air from tumor-bearing mice and breast cancer patients (Ebeler, *et al.*, 1997). Formaldehyde is considered to be a risk factor of cancer development. A recent work showed that, in breast and lung cancer tissues from patients, the formaldehyde concentration was 0.75 mM with the highest concentration of 2.35 mM, concentrations large enough to activate TRPA1 thereby inducing the secretion of tumor favouring factors. A recent report has indicated that formaldehyde (0.02 mM) can induce Ca^{2+} influx via TRPV1 and TRPA1 channels in transfected-HEK293 cells. This study showed that TRPA1 is more sensitive to formaldehyde than TRPV1 (McNamara, *et al.*, 2007). These data suggest that cancer-derived substances (formaldehyde) could have pro-cancer effects by activating TRPA1 in stromal cells leading to the secretion of the paracrine factors themselves promoting evolution of cancers towards more aggressive forms.

The contribution of the stromal microenvironment to the development of a wide variety of tumors has been highlighted by clinical evidence and the use of mouse models (Bhowmick and Moses, 2005). A growing body of data has also suggested that tumor cells actively recruit cancer-associated fibroblasts (CAFs), which remain activated and play a prominent role in cancer progression (Bhowmick, *et al.*, 2004). In breast carcinoma approximately 80% of stromal fibroblasts may acquire the activated phenotype that promotes the proliferation of cancer cells at metastatic sites, stimulating tumor growth such as for the primary tumor (Bhowmick, *et al.*, 2004, Bhowmick and Moses, 2005, West and van de Rijn, 2007). Reactive stroma initiates during early prostate cancer development and co-evolves with prostate cancer progression. Previous studies have defined the key markers of reactive stroma

and have established that reactive stroma biology influences prostate tumorigenesis and progression.

In the present work, we show that TCS, via activation of TRPA1, induces VEGF secretion. The VEGF receptors are shown to be present in epithelial, stromal and endothelial cells (Wong and Wang, 2000), suggesting a complex interplay between the cell components of the prostate cancer micro-environment. VEGF can potentiate different functions in prostate cancer, many of which may be responsible for its growth and survival in the androgen-withdrawal stage. Particularly, increased synthesis of VEGF may be linked to its early and mid-phase transition to the highly metastatic, and androgen-refractory stage. The main function of VEGF is its involvement in lymphangiogenesis where the growth and sprouting of lymphatic endothelium occurs from a pre-existing lymphatic vessel (Skobe, *et al.*, 2001). Increased lymphatic vessel formation surrounding a tumor may provide potential routes for tumor cells to metastasize to distant organs. As androgen withdrawal triggers tumor growth arrest and tumor apoptosis in the primary site, an increase in the metastatic potential therefore helps the tumor cells to migrate to a different location and survive. Interestingly, there are reports that suggest a significant correlation between the expression of VEGF and lymph node dissemination in human prostate carcinoma (Tsurusaki, *et al.*, 1999). Several works showed the potential function mediated by VEGF that may be important for the growth and survival of prostate cancer from the early phase of its transition to the androgen-refractory stage (Wong and Wang, 2000). Thus, TCS-induced VEGF secretion might favour the progression of prostate cancer by modulating the growth and transformation of prostate epithelial cell, angiogenesis and finally the metastasis. These aspects need to undertake in vivo studies to address the impact of TCS on the PCa epithelial-stromal and stromal-endothelial cells interactions and then, the impact of TCS on the cancer cells tumor development (in nude mice) and the potential variations of vessels density of in these PCa cells xenografts.

Thus, understanding how environmental factors intervene in prostate carcinogenesis or its evolution may allow designing of new strategy in PCa treatments including targeting ion channels. Here we show that the TRPA1 protein is expressed in the stromal cells and is involved in the secretion of paracrine factors (VEGF) to promote the progression of the carcinogenesis. Our results suggest that targeting the TRPA1 channel could be an alternative to the actual therapies (AR ablation) leading to relapse in the majority of the treated cases.

Furthermore, a change of the intracellular calcium level may have several consequences depending on the amplitude, duration, frequency and location of the signal. It may be involved in different physiopathological phenomena such as secretion, contraction, proliferation or apoptosis. In this context, calcium signaling could be used as a mean of evaluation of the harmful potential of an environmental factor. Indeed, many environmental factors trigger a specific calcium signature, often associated with

a pathological process. Thus it was reported that low doses of BPA (1-10 nM) could trigger a rapid release of prolactin in pituitary cells GH3/B6/F10, following an increase in $[Ca^{2+}]_i$ via the direct activation of L-type voltage-dependent calcium channels (Wozniak, *et al.*, 2005). Pituitary cells produce and secrete prolactin spontaneously under physiological conditions. However increased release of prolactin, such as the one triggered by BPA could be the cause of reproductive function disorders.

These data suggest that the calcium response to these environmental factors could be considered as a mean of evaluation of the potential risk on public health for these environmental factors. Indeed, in the case of environmental compounds where suspicion is borne on their harmful effect, the use of a cellular model as the HEK293 cell line stably expressing the TRPA1 or L-type voltage-dependent channels might help determining the potential adverse effect of these compounds if there is direct activation or inhibition of the response to an agonist of these channels. Ion channels would then be "biomarkers of effect", markers reflecting a change at the cellular level following exposure to an environmental factor (Silins and Hogberg, 2011). The biomarkers of effect are not specific for a given agent, unlike the markers of exposure, making them particularly interesting to detect the combined exposure of several environmental factors but also cumulative and sequential exposure (Scherer, 2005). In addition, in the investigation of combined exposure effects, the biomarkers of effect such as ion channels could help identify active compounds among the environmental factors present in mixture and also the consequences of this exposure.

These data presented here suggest that the TRPA1 targeting might be an advantage to limit tumor progression. The highlight of these direct effects of Triclosan on the TRPA1 channel expressed in cancer could allow considering new and/or complementary therapies targeting this channel, and/or preventive measures in the treatment of prostate cancers which take into account the impact of these environmental factors.

METHODS

Chemicals and antibodies

All chemicals were from Sigma-Aldrich. Triclosan (Irgasan) and triclocarban were dissolved in DMSO, conserved at $-20^{\circ}C$ and diluted at the desired concentration on the day of the experiments. Antibodies were from commercial sources as follows: Rabbit anti-hTRPA1 (Alomone Labs), mouse anti- α -actin and mouse anti-Vimentine (Dako, France), Rabbit anti- β -actin (Santa Cruz Biotechnology) and horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

Cell lines

LNCAp, PC-3 and DU145 prostate cancer cell lines and HEK293 (human embryonic kidney-derived 293) cell line were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and cultured as described by Gackiere *et al.* (Gackiere, *et al.*, 2006).

Tissue specimens and primary cell cultures

Human PCa biopsies were obtained from consenting patients following the local ethical considerations. All experiments involving patient tissues were carried out under approval number 'CP 01/33', issued by the 'Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Lille'. A portion of prostate tissue suspicious for carcinoma was incised, and one-half of the sliced tissue was submitted for immediate microscopic examination on cryostat sections. After establishment of the diagnosis of adenocarcinoma, the remaining half of the tissue was used for primary culture. The tissue was cut in multiple minute cubicles, placed on a plastic surface, and grown in Phenol red-free RPMI 1640 containing charcoal-stripped Fetal Calf Serum (FCS) (CS-RPMI) containing 1 nM DHT for the growth of the stromal cells and in keratinocyte medium supplemented with 50 mg/ml bovine pituitary extract, 5 ng/ml epidermal growth factor (EGF), 100 mg/ml streptomycin, and 100 U/ml penicillin (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) and 2% FCS for the epithelial cells growth. As soon as outgrowths formed around the tissue fragments, cells were trypsinized and cultured for calcium imaging, immunofluorescence, electrophysiology, RT-PCR and western blot experiments.

RT-PCR analysis of mRNA expression

Total RNA isolation and RT-PCR experiments were performed as described earlier (Lallet-Daher, *et al.*, 2009). The PCR primers (hTRPA1: 5'-AGTGGAATGTGGAGCAA-3' and 5'-TCTGATCCACTTTGCGTA -3'; β -actin : 5'-CAGAGCAAGAGAGGCATCCT-3' and 5'-GTTGAAGGCTCAAACATGATC-3') used in this study were designed on the basis of established GenBank sequences and synthesized by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The amplified PCR products were of 510 and 212 bp respectively.

Cell transfections

For siRNA experiments, equal numbers of cells from the same culture were seeded transfected overnight with 25 nM of control siRNA (targeting Luciferase mRNA) (Eurogentec, Belgium) or 2 different siRNA raised against TRPA1 mRNA. (siTRPA1-1, siTRPA1-2) using Hyperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France) in CS-RPMI containing 10% FCS + 1 nM DHT according to the manufacturer's instructions. Medium was changed after 24 h and cells were incubated for a further 24h before performing experiments. The target sequences for TRPA1 siRNA were as follows: siTRPA1-1: 5'-GGUGGGAUGUUAUCCAUA(dTdT)-3'; siTRPA1-2: 5'-GAAGGACGCUCUCCACUUA(dTdT)-3'. The efficiency of the siRNA is validated by RT-PCR and by

immunofluorescence studies conducted on stromal cells (Fig. 3d).

For the development of hTRPA1-HEK293 stable cell line, cells were transfected using GenePorter transfection reagent (Gene Therapy Systems, Inc., GTS, San Diego) in serum-free DMEM, according to the manufacturer's instructions. Stable clones expressing hTRPA1 or pCDNA3 alone (vector) were then selected using G418 antibiotic (700 μ g/ml) and used for our studies.

Immunofluorescence studies

The protein expression studies of the ion channels in PCa cells and tissues was determined by indirect immunofluorescence analysis performed on acetone fixed cells and formalin-fixed paraffin embedded tissues (FFPE) as previously described (Lallet-Daher, *et al.*, 2009) and analysed by confocal microscopy (Zeiss LSM 510; acquisition parameters: objective 40x/1.3; thickness of confocal slide, 1 μ m).

Western Blot Assay

Primary cultured stromal cells and HEK293 cells were cultured at 80% of confluence and total proteins extracted. Ten to forty micrograms of each sample were analysed by SDS-PAGE on either 6% or 10% acrylamide and processed for western-blotting using antibody as described previously (Lallet-Daher, *et al.*, 2009) using TRPA1 (1:500e) and β -actin (1/1000e) antibodies and revealed by the ECL chemiluminescence kit (Millipore).

Cytosolic free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$)

Measurements

Cells were grown on glass coverslips and $[Ca^{2+}]_i$ imaging experiments were performed as previously described (Lallet-Daher, *et al.*, 2009) using Fura-2 AM as calcium dye. To represent the variation of the $[Ca^{2+}]_i$, the fluorescence intensity ratio represented by F340/F380 was used as an indicator of changes in cytosolic Ca^{2+} concentration. Each experiment is performed on 35–45 cells in duplicate and repeated four times on different cell cultures.

Electrophysiological studies

Whole-cell patch-clamp recordings were performed using a RK-300 patch-clamp amplifier (Biologic, Grenoble, France) as previously described (Gackiere, *et al.*, 2006). Bath medium used for whole-cell experiments consisted in HBSS supplemented with 10 mM TEA (see reference for composition in $[Ca^{2+}]_i$ Measurements Section). Recording pipettes were filled with a solution containing 145 mM K gluconate, 5 mM HEPES, 2 mM $MgCl_2$, with 1 mM EGTA. Osmolarity and pH were adjusted to 290 mOsm.l⁻¹ and 7.2, respectively.

Preparation of PrSC conditioned medium and cell growth studies

Stromal cells (5×10^5 cells per condition) were cultured in CS-RPMI supplemented with 0,1 % FCS with or without TCS for 3 days. Culture supernatants were collected, centrifuged and then incubated with PC-3 cells for the cell growth studies. PC-3 cells seeded in 96-well plates (3000 cells/well) were cultured in RPMI/10% FCS for 24h. The medium was then replaced by 150 μ l of PrSC conditioned medium and incubated for 3 days. The control PC3 cells were cultured in CS-RPMI supplemented with 0,1 % FCS for 3 days with or without TCS. Cell growth was estimated using the commercial assay MTS/PMS kit as previously described (Lallet-Daher, *et al.*, 2009).

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for VEGF

PrSC cells were incubated in CS-RPMI supplemented with 0,1 % FCS with or without TCS for 3 days into 12-well plates. The supernatants of the cell cultures were then withdrawn, centrifuged and a VEGF immunoassay kit (Abcam, Paris, France) was used for VEGF detection according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 8.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean \pm S.E. Statistical analysis was performed using unpaired *t* tests or ANOVA tests followed by either Dunnett (for multiple control *versus* test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons). Student's *t*-test was used for statistical comparison of the differences and $P < 0.05$ was considered significant.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from Région Nord Pas-de-Calais, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, La Ligue Nationale Contre le Cancer. S. Derouiche was supported by the Région Nord Pas-de-Calais and Association pour la Recherche sur les Tumeurs de la Prostate (ARTP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We would like to thank Dr LR Sadofsky (Cardiovascular and Respiratory Studies, The University of Hull, Castle Hill Hospital, Cottingham, Hull HU16 5JQ, UK) for the hTRPA1-pCDNA3 expression vector construction and E Richard for the technical assistance in images analysis by confocal microscopy.

CONTRIBUTIONS

M. Roudbaraki and S. Derouiche initiated and designed the project. S. Derouiche, P. Mariot, M. Warnier, G. Bidaux and P. Delcourt performed cell culture, calcium imaging, electrophysiology, RT-PCR, western and immunofluorescence experiments and analyzed data. P.

Gosset, B. Mauroy, and J-L. Bonnal assured the anatomopathological examinations and prostate tissues processings before immunofluorescence studies. C. Slomianny supervised the immunofluorescence studies and analysis by confocal microscopy. M. Roudbaraki, S. Derouiche, P. Mariot and N. Prevarskaya wrote the manuscript. M. Roudbaraki directed the research. All authors discussed and commented on the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Bhowmick, N.A. & Moses, H.L. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 97-101 (2005).
2. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. & Moses, H.L. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**, 332-7 (2004).
3. Hu, M. & Polyak, K. Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 27-34 (2008).
4. West, R.B. & van de Rijn, M. Experimental approaches to the study of cancer-stroma interactions: recent findings suggest a pivotal role for stroma in carcinogenesis. *Lab Invest* **87**, 967-70 (2007).
5. Tuxhorn, J.A., Ayala, G.E. & Rowley, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* **166**, 2472-83 (2001).
6. Wernert, N. The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch* **430**, 433-43 (1997).
7. Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Tlsty, T.D. & Cunha, G.R. The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer* **5**, 253-270 (1998).
8. Wiseman, B.S. & Werb, Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* **296**, 1046-9 (2002).
9. Micke, P. & Ostman, A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer* **45 Suppl 2**, S163-75 (2004).
10. Pollak, M., Beamer, W. & Zhang, J.C. Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev* **17**, 383-90 (1998).
11. Cabana, H. et al. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Corioloropsis polyzona*. *Chemosphere* **67**, 770-8 (2007).
12. Darbre, P.D. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **20**, 121-43 (2006).
13. Lakeram, M., Lockley, D.J., Sanders, D.J., Pendlington, R. & Forbes, B. Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial

- membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems. *J Biomol Screen* **12**, 84-91 (2007).
14. Dayan, A.D. Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. *Food Chem Toxicol* **45**, 125-9 (2007).
 15. Heidler, J., Sapkota, A. & Halden, R.U. Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ Sci Technol* **40**, 3634-9 (2006).
 16. Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. & Takada, H. Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res* **40**, 3297-303 (2006).
 17. Black, J.G., Howes, D. & Rutherford, T. Percutaneous absorption and metabolism of Irgasan DP300. *Toxicology* **3**, 33-47 (1975).
 18. Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K. & Arizono, K. Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ Sci* **11**, 133-40 (2004).
 19. Foran, C.M., Bennett, E.R. & Benson, W.H. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar Environ Res* **50**, 153-6 (2000).
 20. Ishibashi, H. et al. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat Toxicol* **67**, 167-79 (2004).
 21. Chen, J. et al. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol* **221**, 278-84 (2007).
 22. Ahn, K.C. et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. *Environ Health Perspect* **116**, 1203-10 (2008).
 23. Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M.R. & Roy, P. Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reprod Toxicol* **27**, 177-85 (2009).
 24. Gee, R.H., Charles, A., Taylor, N. & Darbre, P.D. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *J Appl Toxicol* **28**, 78-91 (2008).
 25. Kumar, V., Balomajumder, C. & Roy, P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology* **250**, 124-31 (2008).
 26. Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C. & Viana, F. TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin)* **2**, 429-38 (2008).
 27. Gu, Q. & Lin, R.L. Heavy metals zinc, cadmium, and copper stimulate pulmonary sensory neurons via direct activation of TRPA1. *J Appl Physiol* **108**, 891-7 (2010).
 28. Hinman, A., Chuang, H.H., Bautista, D.M. & Julius, D. TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19564-8 (2006).
 29. Hu, H. et al. Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch* **459**, 579-92 (2010).
 30. Meseguer, V. et al. Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci* **28**, 576-86 (2008).
 31. Russell, P.J., Bennett, S. & Stricker, P. Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem* **44**, 705-23 (1998).
 32. Kawada, M., Inoue, H., Masuda, T. & Ikeda, D. Insulin-like growth factor I secreted from prostate stromal cells mediates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer. *Cancer Res* **66**, 4419-25 (2006).
 33. Kawada, M. et al. A microplate assay for selective measurement of growth of epithelial tumor cells in direct coculture with stromal cells. *Anticancer Res* **24**, 1561-8 (2004).
 34. Wong, Y.C. & Wang, Y.Z. Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *Int Rev Cytol* **199**, 65-116 (2000).
 35. Bautista, D.M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell* **124**, 1269-82 (2006).
 36. Obata, K. et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest* **115**, 2393-401 (2005).
 37. Story, G.M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* **112**, 819-29 (2003).
 38. Andrade, E.L., Meotti, F.C. & Calixto, J.B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther* **133**, 189-204 (2012).
 39. Andersson, D.A., Gentry, C., Moss, S. & Bevan, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* **28**, 2485-94 (2008).
 40. Cao, D.S. et al. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One* **7**, e38005 (2012).
 41. Spanel, P., Smith, D., Holland, T.A., Al Singary, W. & Elder, J.B. Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **13**, 1354-9 (1999).

42. Ebeler, S.E., Clifford, A.J. & Shibamoto, T. Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and human. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **702**, 211-5 (1997).
43. McNamara, C.R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13525-30 (2007).
44. Skobe, M. et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* **7**, 192-8 (2001).
45. Tsurusaki, T. et al. Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer* **80**, 309-13 (1999).
46. Wozniak, A.L., Bulayeva, N.N. & Watson, C.S. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* **113**, 431-9 (2005).
47. Silins, I. & Hogberg, J. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health* **8**, 629-47 (2011).
48. Scherer, G. Biomonitoring of inhaled complex mixtures--ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* **57 Suppl 1**, 75-110 (2005).
49. Gackiere, F., Bidaux, G., Lory, P., Prevarskaya, N. & Mariot, P. A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* **39**, 357-66 (2006).
50. Lallet-Daher, H. et al. Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene* **28**, 1792-806 (2009).

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effect of TCS and TCC on basal [Ca²⁺]_i of stromal cells derived from prostate cancer. Cells grown on glass coverslips and cultured in complete medium and then direct effects of TCS (a) or its analog TCC (b) at different concentrations on [Ca²⁺]_i were studied by calcium imaging. Inserts show the respective chemical structure of each compound. TCS induced two types of calcium response, depending on the composition of stromal cells population : when there was a preponderance of fibroblasts (insert: vimentine positive cells) in culture, the response induced by triclosan was transient with a subsequent low amplitude plateau phase (c), and when there was a more important proportion of smooth muscle cells (insert: α-actin positive cells) in culture, the response was transient with a subsequent high amplitude plateau phase (d). Cells grown on glass

coverslips and cultured in complete medium were processed by calcium imaging and the effect of TCS was studied under the following conditions : the cells were first placed in a Ca²⁺-free bath solution (0 Ca²⁺) and then exposed to 2 mM extracellular Ca²⁺ (2 Ca²⁺) as indicated (e). The effect of TCS on human Primary Epithelial Cells (hPEC) was also evaluated by calcium imaging (f). Each experiment was repeated at least 4 times in duplicate in different cell cultures on a field of 35–45 cells and representative experiments performed on 60-90 cells as mean±s.e are presented. *P<0.01. The TCS application and extracellular Ca²⁺ increase from 0 (0 Ca²⁺) to 2 mM (2 Ca²⁺) are marked by horizontal bars.

Figure 2. TCS-induced calcium entry is similar to TRPA1–ligand activated calcium entry. (a) Table listing the different calcium channel inhibitors tested that have been also known to be TRPA1 channel agonists. (b,c) Direct effects of pharmacological inhibitors of calcium channels (i.e. Flufenamic acid and Clotrimazole) on calcium signalling in stromal cells grown on glass coverslips and cultured in full medium. Each experiment was repeated at least 3 times in duplicate in different cell cultures on fields of 25–40 cells and representative experiments performed on 60-90 cells as mean±s.e are presented. *P<0.01.

Figure 3. Suppression of TCS-induced calcium entry by inhibition of TRPA1. To study the involvement of TRPA1 channel in the TCS-induced calcium entry, cells grown on glass coverslips and cultured in complete medium were processed by calcium imaging to test the direct effect of Triclosan (a) or Flufenamic acid (b) combined with the non specific TRPA1 inhibitor, Ruthenium Red (RR). The specific inhibitor HC-030031 was also applied on the calcium entry induced by TCS (c). Forty-eight hours prior to recording Ca²⁺ signals by calcium imaging, hPrSC cells were transfected with control siRNA (siCTL) or siTRPA1 (25 nM each) and then modulation of TRPA1 expression in hPrSC cells following their transfection was assessed by RT-PCR and immunofluorescence studies using a TRPA1 specific antibody (d). The corresponding calcium imaging experiment in siCTL and siTRPA1-transfected cells is shown in (e). In calcium imaging experiments, the functionality of the TRPA1 was studied by the application of a known TRPA1 agoniste (AITC) in the absence and presence of TRPA1 inhibitor (HC-030031, 200 μM) (f). Each experiment was repeated at least 4 times in duplicate in different cell cultures on a field of 35–45 cells and representative experiments performed on 60-90 cells as mean±s.e are presented. *P<0.01.

Figure 4. Activation of the TRPA1 channel by TCS in hPrSC cells. Electrophysiological studies were carried out to test the ability of Triclosan to activate TRPA1 channel. 10 μM TCS increased whole-cell current at all membrane potentials ranging from -100 to

120 mV in hPrSC cells (a). (b) Representative time courses of whole-cell currents in hPrSC cells measured at membrane potentials of -150 mV (red circles) and $+150$ mV (black circles). The application of TCS increased membrane currents at both membrane potentials ($10\mu\text{M}$), which was antagonized by the administration of HC030031 ($50\mu\text{M}$). The time of TCS and HC030031 applications are marked by horizontal bars. (c) Representative time courses (a) and current–voltage (I–V) relationships (b) of whole-cell currents in hPrSC cells showing that TCS-induced current ($10\mu\text{M}$ TCS) was suppressed by Ruthenium Red (RR, $50\mu\text{M}$). (d) Representative time courses (a) and current–voltage (I–V) relationships (b) of whole-cell currents in hPrSC cells showing that TCS-induced currents ($10\mu\text{M}$ TCS) were similar to AITC-induced currents ($30\mu\text{M}$ AITC) which were also inhibited by HC030031 ($50\mu\text{M}$).

Figure 5. TCS specifically activates TRPA1. Electrophysiological studies were also carried out in HEK293 cells transfected either with vector (vector-HEK293) or with human TRPA1 (hTRPA1) (hTRPA1-HEK293). Representative time courses measured at membrane potential of -150 mV (red circles) and $+150$ mV (a) and current–voltage (I–V) relationships (b) of whole-cell currents recorded in hTRPA1-HEK293 cells. The application of TCS ($10\mu\text{M}$) induced similar currents to that of induced by AITC ($30\mu\text{M}$). Both AITC and TCS-induced currents were inhibited by HC030031 ($50\mu\text{M}$). Representative time courses measured at membrane potential of -150 mV (red circles) and $+150$ mV (c) and current–voltage (I–V) relationships (d) of whole-cell currents recorded in vector-HEK293 cells. Neither TCS nor AITC induced membrane currents in vector-HEK293 cells. The time of TCS, HC030031 and AITC applications are marked by horizontal bars.

Figure 6. TRPA1 channel expression prostate cancer tissues. The TRPA1 channel expression was assessed by RT-PCR (a) and Western blotting (b,c) in stromal cells derived from prostate cancer (hPrSC, numbers indicate hPrSC from different patients), prostate epithelial cells (LNCaP, PC-3 and DU145 prostate cancer cell lines and hPEC primary epithelial cells), vector-HEK293 and hTRPA1-HEK293 cells. To detect TRPA1 mRNA expression, total RNA was extracted and semi-

quantitative RT-PCR experiments were performed to study the expression of TRPA1 (510 bp) mRNA using specific primers. To detect TRPA1 protein expression, total proteins were extracted and $20\mu\text{g}$ proteins were analysed on 6% acrylamide gel (SDS-PAGE), transferred on PVDF membranes. Immunoblots were then performed as described in *Methods* for the detection of TRPA1. Immunofluorescence studies using a TRPA1 specific antibody (green) were performed on grade 3 PCa formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (d and e), on primary stromal cells hPrSC (f) and on normal prostate and Benign Prostate Hyperplasia formalin-fixed, paraffin-embedded tissues (g and h). Nuclei were either stained by DAPI (blue) or propidium iodide (red). The panel (i) shows the control experiment where the primary antibody was omitted and only the nuclei were stained by propidium iodide (PI). Immunofluorescence studies were also carried out on normal breast (j) and breast cancer tissues (k,l) using a TRPA1-specific antibody (green) and DAPI staining for the nuclei (blue).

Figure 7: TCS induces mitogenic factor secretion. (a) 5×10^3 PC-3 cells grown in 96 well plate in complete medium were either treated with 0.1% FBS medium containing or not TCS (0.1 or $1\mu\text{M}$) or with media conditioned by hPrSC cells exposed or not to TCS (0.1 or $1\mu\text{M}$) for 4 days. MTS assay was then performed as described in *Methods* and mean data of viable cells are represented. *, $P < 0.001$ relative to CTL condition. (b) Quantitative measurement of human VEGF by ELISA in the conditioned media of hPrSC cells. Stromal PCa cells (70-80% confluent) were cultured in 60 mm dishes for 4 days in presence or not of TCS (1 , 5 or $10\mu\text{M}$) and HC-030031 ($200\mu\text{M}$). *, $P < 0.001$ relative to CTL condition; **, $P < 0.001$ TCS $5\mu\text{M}$ versus TCS $5\mu\text{M}$ + HC-030031 $200\mu\text{M}$. (c) Hypothetic pathway : Triclosan, by modifying calcium signalling through TRPA1, could trigger secretion of mitogenic factors from stromal cells, leading to the proliferation and/or the migration of the epithelial PCa and the vascular endothelial cells (angiogenesis) two important components of tumor formation, favoring thus the progression of the cancer.

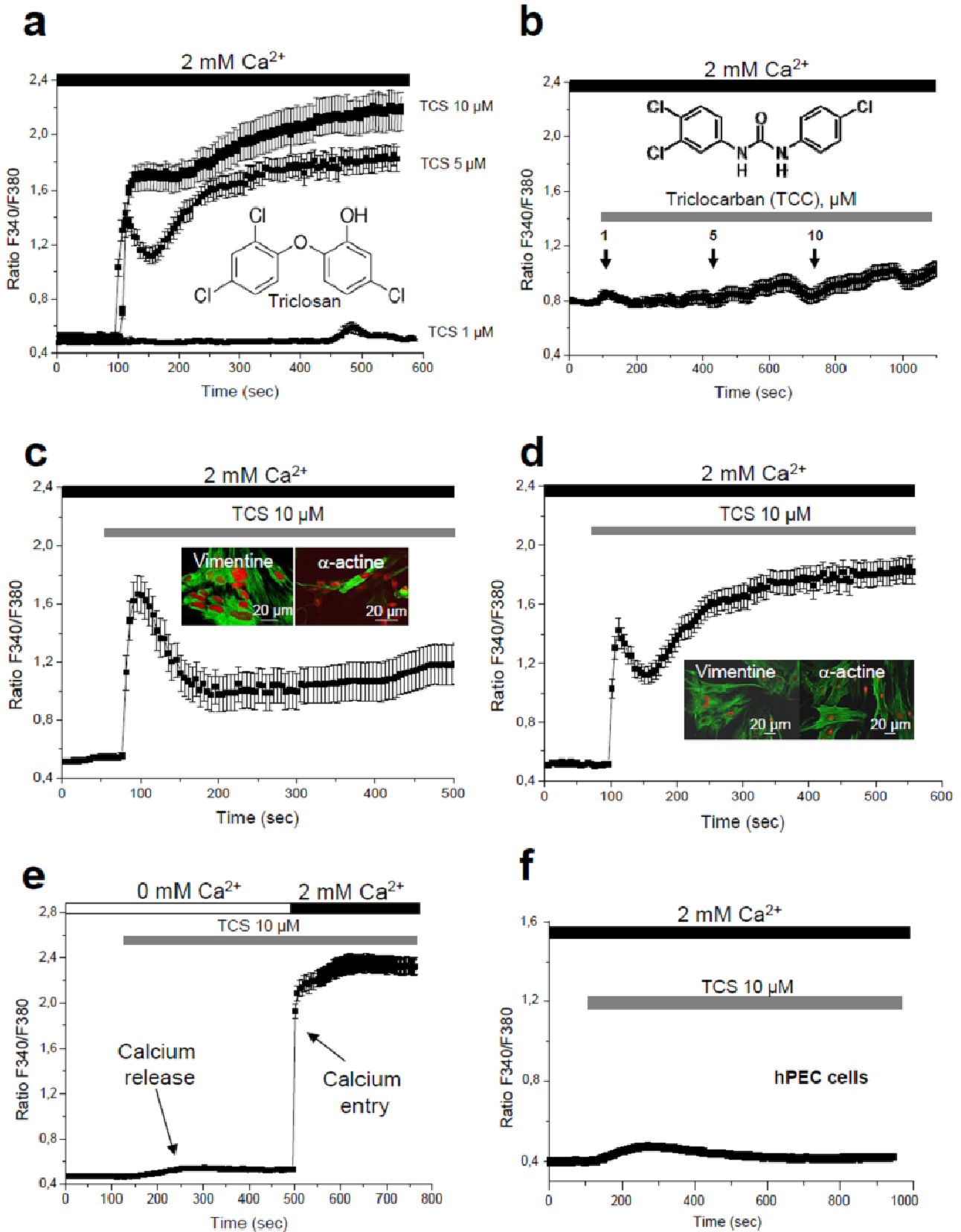
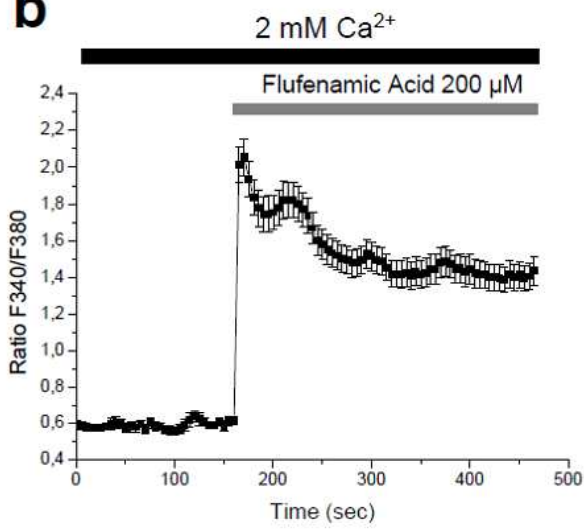


Figure 1: Derouiche et al., 2012

a

	FFA	Clotrimazole	2-APB	Cadmium	Nifedipine	Nitrendipine
Ca ²⁺ Response	+++	+++	++	++	++	++
TRPA1 modulation	Activation	Activation	Activation	Activation	Activation	Activation

b



c

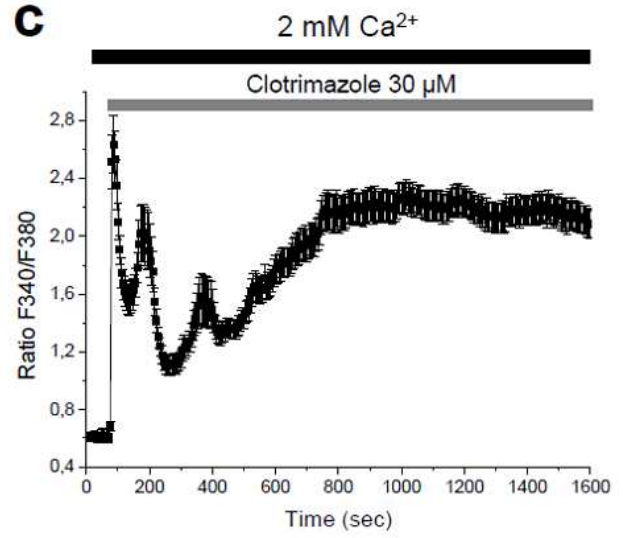


Figure 2: Derouiche et al., 2012

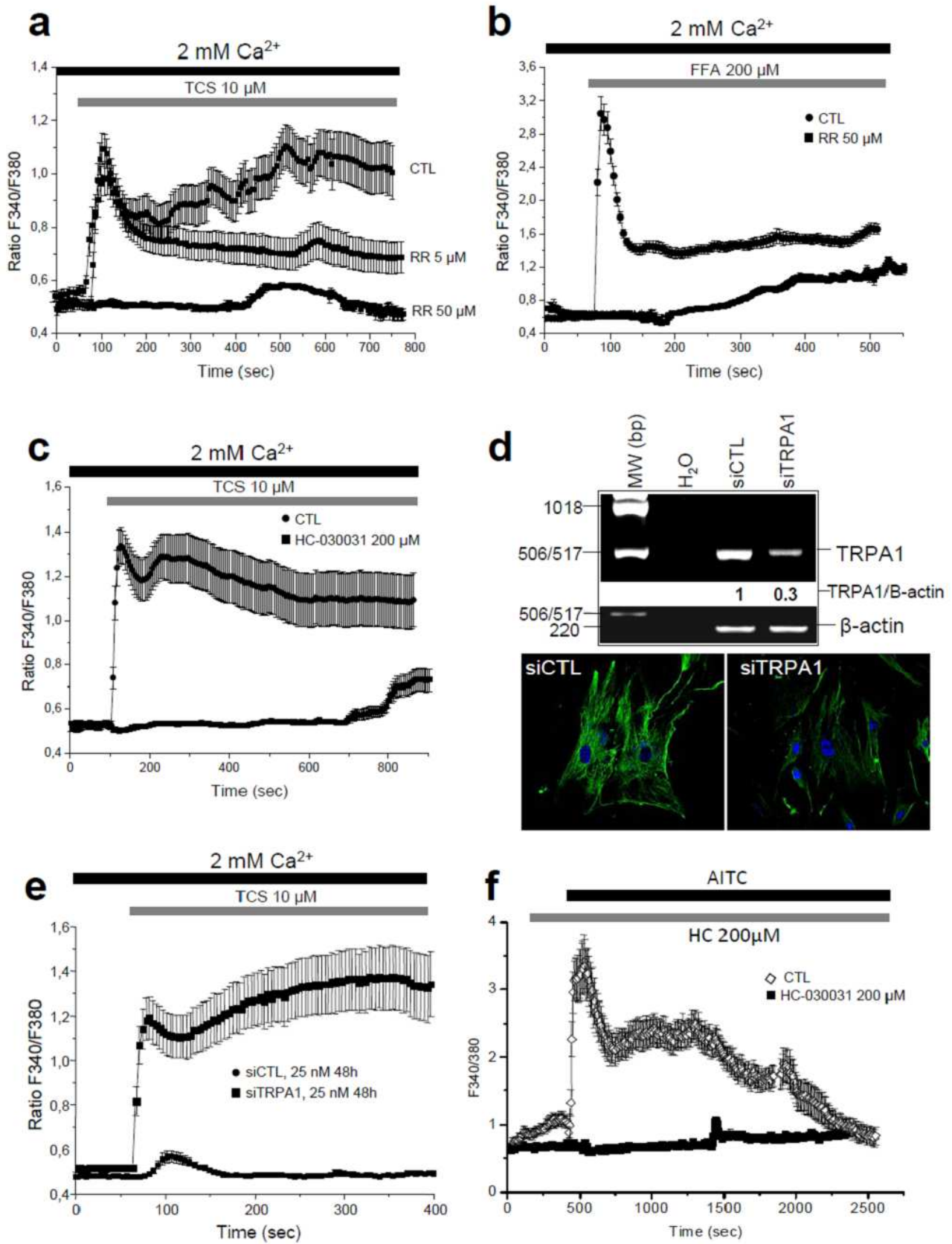


Figure 3: Derouiche et al., 2012

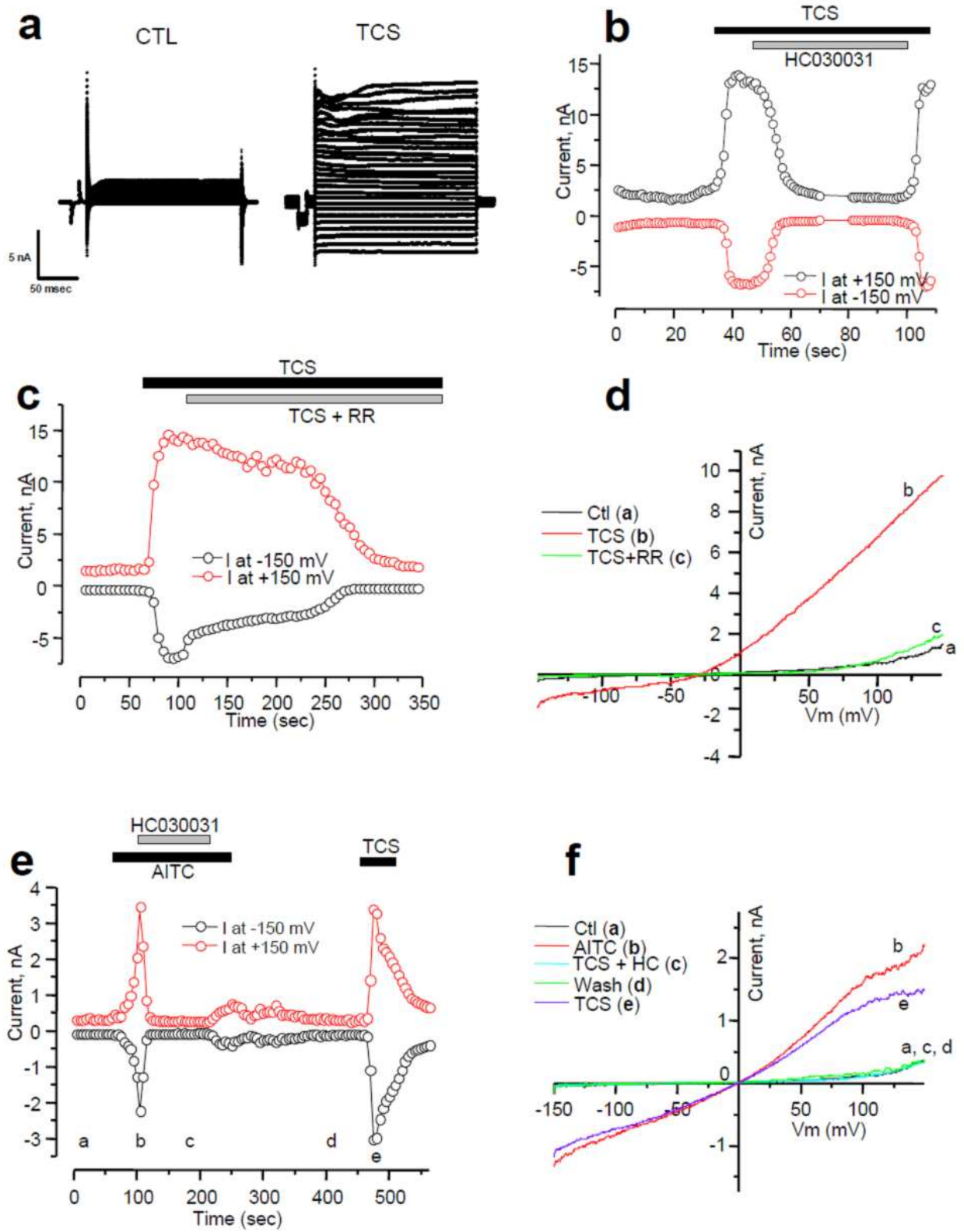


Figure 4: Derouiche et al., 2012

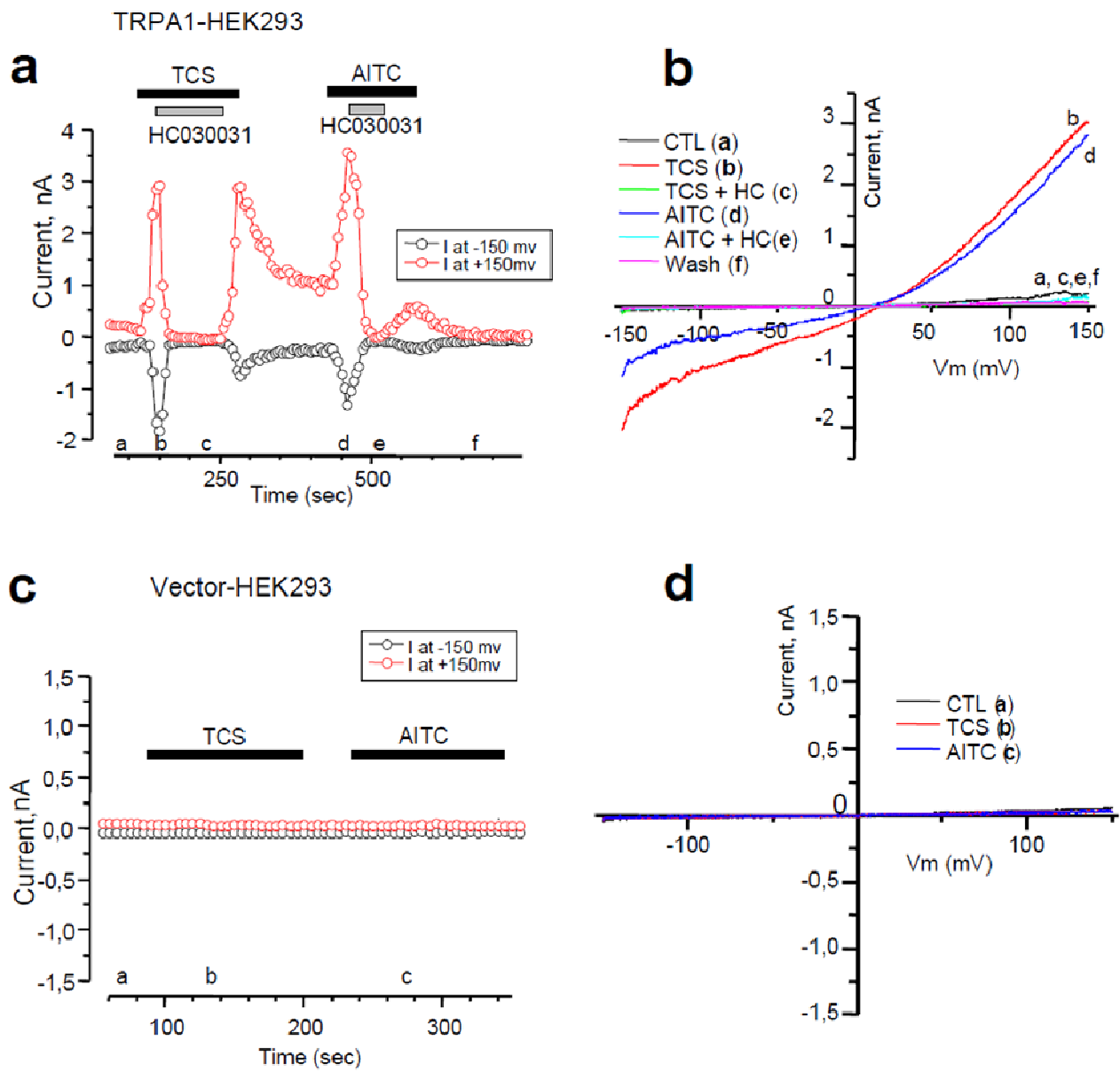


Figure 5: Derouiche et al., 2012

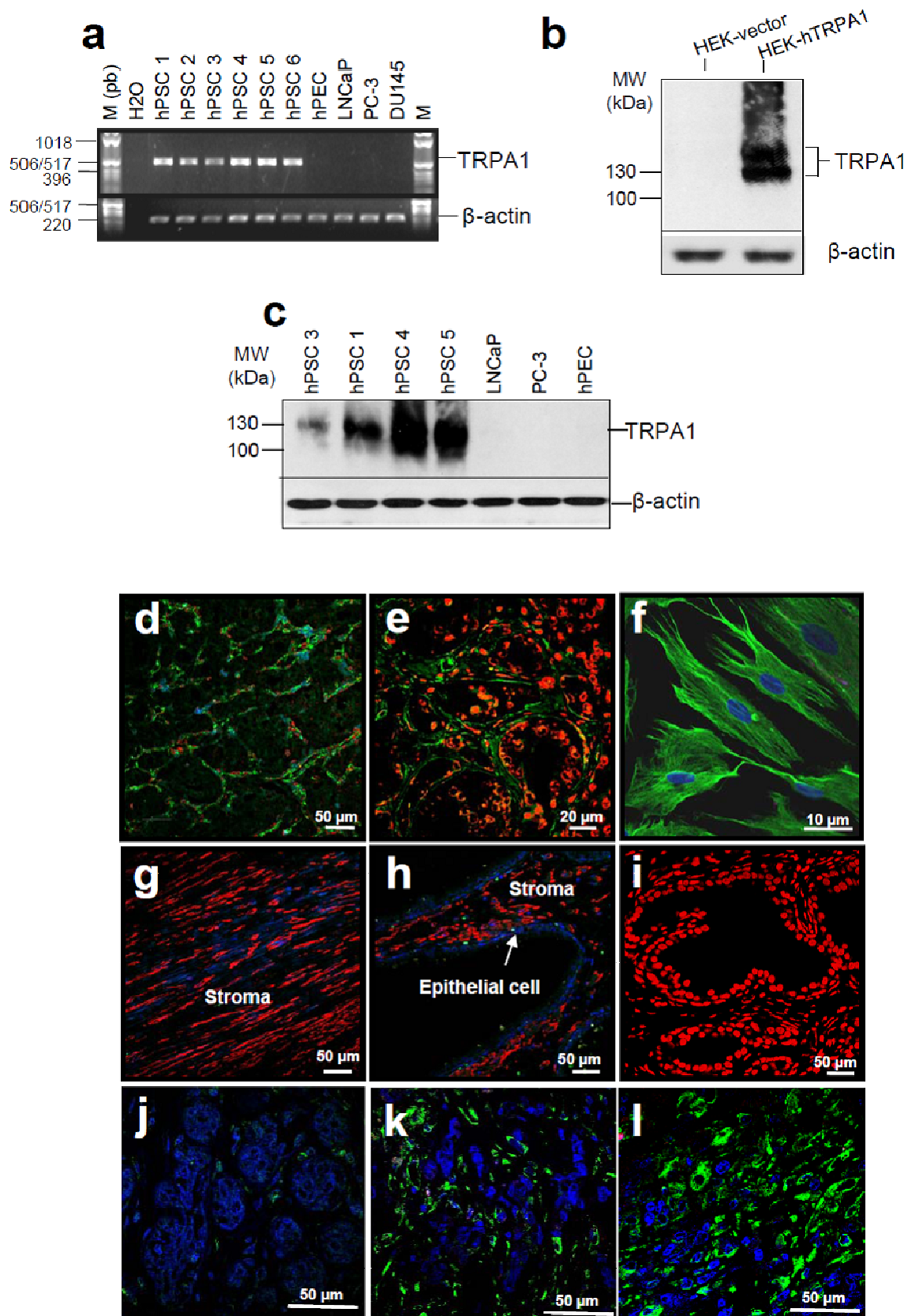


Figure 6: Derouiche et al., 2012

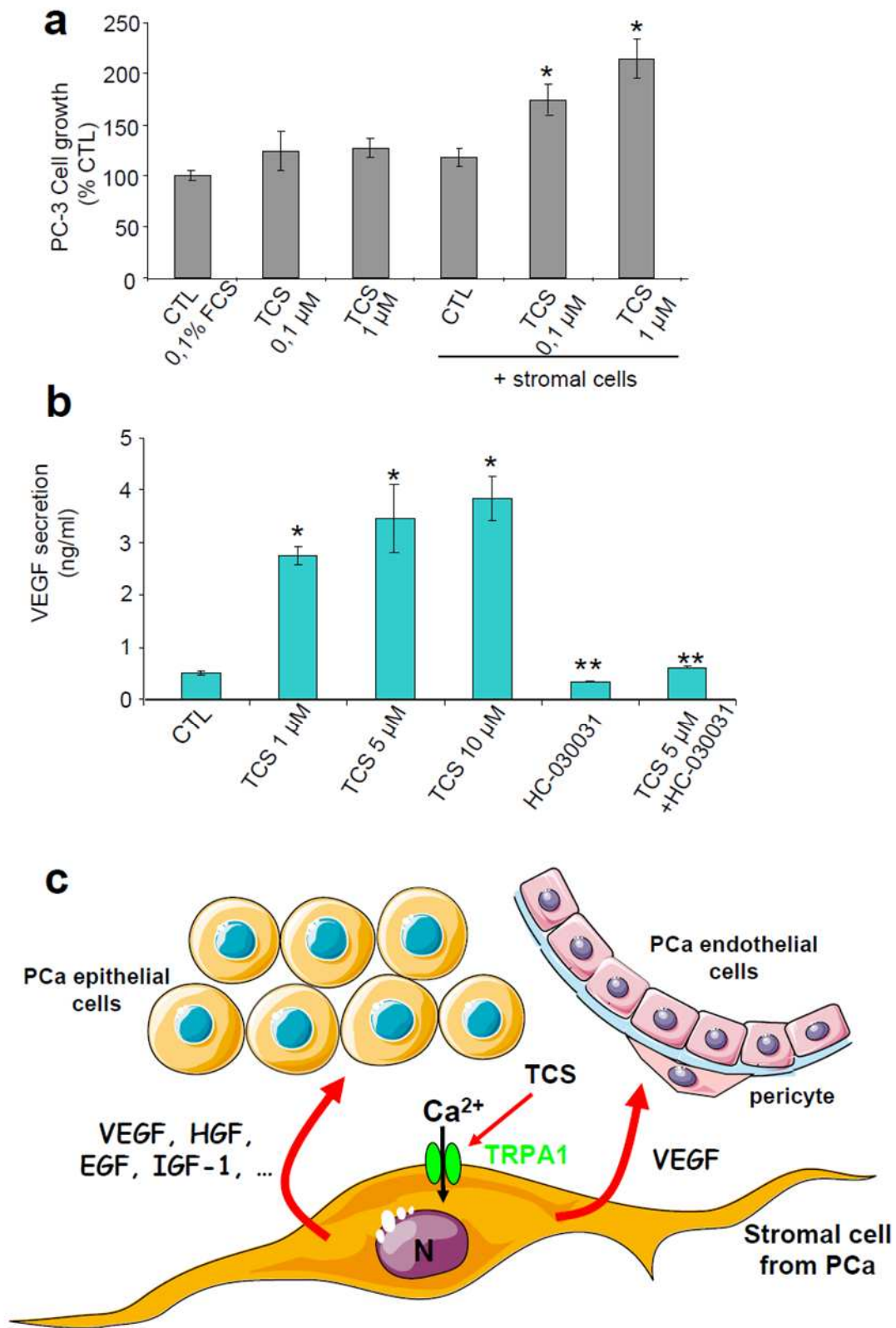


Figure 7: Derouiche et al., 2012

Discussion

Le cancer de la prostate est une maladie fréquente devenue un véritable problème de santé publique. En effet, les traitements actuels ont une efficacité limitée dans le temps, et l'issue de la maladie est encore trop souvent mortelle faisant de cette maladie le troisième cancer le plus meurtrier chez l'homme.

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

L'apparition des cancers prostatiques peut avoir une origine génique et une origine environnementale. L'une des caractéristiques majeures de l'évolution du cancer de la prostate vers l'androgéno-indépendance se traduit par la capacité des cellules à survivre indépendamment des hormones endogènes, certainement grâce à l'intervention de facteurs exogènes non androgéniques. L'étude des cibles et des mécanismes d'action de ces facteurs permettrait à terme de développer de nouvelles stratégies pharmacologiques. Or de nombreuses études ont montré que certains facteurs environnementaux du type perturbateur endocrinien étaient capables de favoriser l'induction de la cancérogénèse et/ou la progression tumorale. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'impact de ces facteurs environnementaux sur la cancérogénèse prostatique et plus particulièrement au rôle que pouvaient avoir les canaux ioniques dans leurs effets.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi d'étudier trois perturbateurs endocriniens : le BPA pour lequel de nombreuses études ont montré son implication dans la cancérogénèse et l'évolution du cancer prostatique mais n'ont pas fait de lien avec une perturbation de l'homéostasie calcique, et les antimicrobiens TCS et TCC qui semblent générer une signalisation calcique particulière dans certains types cellulaires.

Le perturbateur endocrinien BPA et la migration des cellules cancéreuses épithéliales prostatiques.

Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que le facteur environnemental BPA jouait un rôle important dans l'initiation et la progression du cancer de la prostate après thérapie hormonale (Ho, et

al., 2006, Wetherill, *et al.*, 2005). Au niveau des cellules cancéreuses prostatiques, le BPA est capable d'induire la prolifération des cellules tumorales androgéno-dépendantes et de réduire l'efficacité thérapeutique dans des modèles de xénogreffes (Wetherill, *et al.*, 2006). Bien que ces données montrent le potentiel du BPA à aider les cellules tumorales à échapper à la thérapie hormonale, les mécanismes moléculaires de ce processus ne sont pas encore bien connus.

Notre étude montre pour la première fois que des faibles doses du BPA (1-10 nM) induisent la migration cellulaire en modulant la signalisation calcique. Les concentrations utilisées dans cette étude donnent aux résultats obtenus une pertinence du point de vue environnemental.

Les processus invasif et métastatiques sont les principaux facteurs à l'origine de la mortalité et la morbidité liée au cancer (Molloy and Van 't Veer, 2008). En raison de la métastase généralisée chez les patients atteints d'un cancer avancé où on observe une résistance aux thérapies traditionnelles, les taux de mortalité demeurent extrêmement élevés et les nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour intervenir dans le processus métastatique. Ainsi, comprendre les événements moléculaires de cette pathogenèse du cancer de la prostate permettrait d'améliorer le diagnostic et le pronostic de la maladie, et d'offrir des mesures de prévention et de nouveaux traitements en vue d'éliminer les métastases du cancer de la prostate.

Un point de régulation commun à de nombreuses voies de transduction de signal est l'homéostasie du calcium intracellulaire. De nombreuses données montrent clairement l'implication de l'entrée du calcium dans la migration des cellules cancéreuses et non cancéreuses (Bisaillon, *et al.*, 2010, Li, *et al.*, 2011, Schaff, *et al.*, 2010, Yang, *et al.*, 2009a). Une nouvelle approche pourrait donc consister à se concentrer sur les voies de signalisation intracellulaires sous-tendant le processus métastatique.

Dans la présente étude, nous montrons clairement pour la première fois que le prétraitement des cellules cancéreuses prostatiques humaines par des concentrations de BPA (1-10 nM) favorise leur migration. Par la technique d'imagerie calcique, nous avons montré que le prétraitement au BPA induit une amplification de l'entrée calcique de type SOCE dans les cellules androgéno-dépendantes LNCaP. Du point de vue moléculaire, des expériences de RT-PCR et de Western blot nous ont permis d'identifier les protéines de canaux ioniques modulées par ces prétraitements au BPA. Parmi ces dernières se trouve la protéine Orai1 une protéine connue pour constituer un acteur important du SOCE dans de nombreux systèmes cellulaires, y compris les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

En revanche, nous n'avons pas observé d'effet direct du BPA sur le taux de calcium basal des cellules cancéreuses prostatiques alors que dans d'autres systèmes cellulaires, le BPA ou ses dérivés

sont capables d'induire une augmentation de calcium intracellulaire. En effet, dans les cellules de Sertoli TM4, une application directe d'un composé dérivé du BPA, le tétrabromobisphénol A (TBBPA), un agent ignifuge couramment utilisé, induit une augmentation du taux de calcium libre basal par l'inhibition des pompes SERCA et vidange des stocks intracellulaires (Ogunbayo, *et al.*, 2008). Dans les cellules cancéreuses hypophysaires somatomammotropes GH3/B6/F10 de rat, Kochukov et al. (2009) ont montré que le BPA à une concentration de 1 nM induisait une forte augmentation de Ca^{2+} de type oscillante et ainsi l'activation de la voie MAPK (ERK1/2) conduisant à une libération de PRL (Kochukov, *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été signalés par Bulayeva et al. et Wozniak et al. où les auteurs ont démontré que l'afflux calcique induit par le BPA était strictement dépendant du Recepteur aux Œstrogènes α membranaire (mER- α) et médié par les canaux calciques voltage-dépendants de type L dans les cellules pancréatiques β (Bulayeva, *et al.*, 2005, Wozniak, *et al.*, 2005). Les cellules LNCaP utilisées dans notre travail n'expriment pas ces canaux Ca^{2+} voltage-dépendants de type L (cellules non excitables), ce qui est probablement la raison de l'absence de réponse à une application directe du BPA sur les cellules LNCaP et LNCaP C4-2.

Toutefois, lorsque les cellules cancéreuses prostatiques humaines étaient prétraitées par le BPA (1-10 nM), une augmentation du SOCE et un remodelage de l'expression des canaux ioniques étaient observables. L'altération de l'expression des canaux ioniques pourrait être médiée par une voie de signalisation conduisant à l'activation de facteurs de transcription nucléaires. En effet, plusieurs données récentes suggèrent l'activation de voies de transduction par le BPA, même si dans certaines études les concentrations utilisées pour le BPA (1-100 μ M) sont plus grandes que les concentrations environnementalement pertinentes (1-10 nM).

Il a été suggéré que le BPA pouvait induire l'activation du récepteur aux androgènes. En effet, dans les cellules cancéreuses prostatiques, le BPA s'est avéré être un agoniste du récepteur aux androgènes muté (AR-T877A) exprimé dans les PCa récurrents (Wetherill, *et al.*, 2002, Wetherill, *et al.*, 2005, Wetherill, *et al.*, 2006) et dans la lignée cellulaire LNCaP utilisée dans nos études. Selon les auteurs, le BPA induit une prolifération cellulaire dans les cellules exprimant ce récepteur muté. Les conséquences cliniques de l'activation des ARs mutants et l'induction d'une prolifération tumorale androgéno-indépendante par le BPA peuvent être considérables, le BPA pouvant réduire l'efficacité thérapeutique anti-androgénique dans ces modèles de xénogreffes (Wetherill, *et al.*, 2006). Dans nos expériences, la DHT induit l'expression de la protéine Orail et le BPA semble imiter ces effets du ligand canonique de l'AR (DHT). Cependant, tous les effets du BPA ne passent pas forcément par une activation de l'AR. Dans une étude récente, Hess-Wilson et collaborateurs ont clairement montré que le BPA et la DHT généraient des profils transcriptionnels distincts dans les cellules cancéreuses prostatiques exprimant le mutant AR-T877A, même si certains gènes communs

étaient activés par la DHT et le BPA dans les cellules LNCaP (Hess-Wilson, *et al.*, 2007). Ces observations pourraient expliquer la migration cellulaire et l'expression du canal Orai1 induite par le BPA dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes humaines PC-3 où le récepteur aux androgènes est absent. Le BPA pourrait ainsi activer d'autres voies de signalisation que celle de l'AR pour induire les effets observés dans nos études.

Dans ce contexte, il a été montré que le BPA pouvait induire la phosphorylation des kinases ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase), et la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B dans les cellules hippocampales HT-22 de souris (Lee, *et al.*, 2008). De manière intéressante, des sites fonctionnels de liaison de NF- κ B ont été identifiés dans les régions promotrices de STIM1 et Orai1 et l'activation du canal calcique Orai1 semble être modulée positivement par le facteur de transcription NF- κ B (Eylenstein, *et al.*, 2012). En conséquence, l'entrée de type SOCE était également augmentée *via* une surexpression de p65/p50 ou p65/p52 et diminuée par un traitement avec l'inhibiteur de NF- κ B, la wogonine. Le BPA pourrait ainsi interférer avec la transduction des signaux des facteurs de croissance pour activer la voie PI3K/AkT et induire l'activation du facteur de transcription NF- κ B conduisant à une régulation de l'expression des canaux ioniques dont Orai1. Plusieurs travaux ont aussi montré la stimulation des voies PKA/CREB par le BPA (à des concentrations de l'ordre du nanomolaire) *via* l'activation du mER- α (Bouskine, *et al.*, 2009, Quesada, *et al.*, 2002). Mais l'implication de cette voie dans l'expression des canaux ioniques nécessite des investigations plus poussées.

La connexion entre les stocks calciques et la migration cellulaire est davantage mis en évidence par des travaux récents qui se sont focalisés sur l'entrée capacitive médiée par STIM1 et Orai1. L'activation des phospholipases C par des facteurs présents dans le sérum conduit à une déplétion du Ca^{2+} de l'ER médiée par l' IP_3 , qui à son tour stimule l'influx de Ca^{2+} à travers la membrane plasmique (Varnai, *et al.*, 2009). STIM1 a été identifié comme le senseur calcique réticulaire qui, suite à la vidange du stock, interagit avec et active les canaux Orai1 à la membrane plasmique pour permettre l'influx de Ca^{2+} extracellulaire (Varnai, *et al.*, 2009). Ces études démontrent que STIM1, Orai1 et l'entrée capacitive jouent un rôle essentiel dans la migration de certains types cellulaires. Plus précisément, l'inhibition génétique de Orai1 ou STIM1 ou l'inhibition pharmacologique sélective de l'entrée capacitive inhibe la migration *in vitro* des cellules cancéreuses du sein (Yang, *et al.*, 2009a), des cellules musculaires lisses (Bisaillon, *et al.*, 2010), des neutrophiles (Schaff, *et al.*, 2010) et des cellules endothéliales (Li, *et al.*, 2011) et inhibe aussi *in vivo* les métastases de tumeurs mammaires et l'angiogenèse (Li, *et al.*, 2011, Yang, *et al.*, 2009a). Ces observations confirment nos données sur le BPA qui, en régulant l'expression des canaux ioniques impliqués dans l'entrée capacitive, permet

d'augmenter l'influx calcique SOCE développé par les cellules cancéreuses prostatiques en réponse à des facteurs présents dans le sérum.

La migration cellulaire induite par le BPA que nous avons observée était dépendante de l'entrée de calcium et l'utilisation des outils pharmacologiques suggèrent l'implication des canaux SOC dans les effets du BPA sur la migration des cellules. L'augmentation de calcium cytoplasmique induite par le BPA peut faire intervenir différents processus pour déclencher la migration cellulaire. En effet, une élévation de calcium de type SOCE peut être impliquée dans la migration cellulaire par induction de la sécrétion et l'activation d'enzymes comme les métalloprotéinases (MMP) connues pour leur rôle dans la migration cellulaire, mais aussi par la régulation de leur expression génique et protéique. Les cellules tumorales semblent avoir la capacité de produire les MMP et leurs inhibiteurs endogènes (Liotta and Stetler-Stevenson, 1990, Stetler-Stevenson, *et al.*, 1989, Welgus, *et al.*, 1979). La protéolyse et rupture de la membrane basale nécessitent l'activation de MMP spécialisées. Les MMP-2 et MMP-9, qui sont plus particulièrement impliquées dans la migration cellulaire, sont des enzymes dont l'activation et la fonction sont Ca^{2+} -dépendantes (Collier, *et al.*, 1988, Stetler-Stevenson, *et al.*, 1989).

On peut donc imaginer que l'induction de l'expression des MMP par le BPA *via* l'amplification du SOCE pourrait être une voie de stimulation de la migration cellulaire. Qui plus est, des données récentes montrent qu'une entrée de calcium, et plus particulièrement le SOCE, peut être impliquée dans l'expression des MMP-2 et MMP-9 suite à l'activation de la voie des MAPK (ERK1/2) et/ou de la voie calcium/calcineurine/NFAT (Mukhopadhyay, *et al.*, 2004, Velupillai, *et al.*, 2010). Ces observations laissent à penser que l'augmentation de l'entrée de calcium induite par un prétraitement au BPA pourrait permettre l'expression des protéines MMP-2 et MMP-9 impliquées dans la migration cellulaire. Cependant, les effets du BPA sur l'expression des protéines MMP-2/9 et l'implication du calcium dans ce processus nécessite des études ultérieures dans les cellules cancéreuses prostatiques.

Un autre mécanisme possible par lequel le BPA peut induire la migration cellulaire par le biais de la régulation du SOCE serait la modulation du turnover d'adhésion focale, un processus impliqué dans la migration cellulaire. La phosphorylation des tyrosine des protéines et la protéolyse des protéines d'adhésion focale sont impliquées dans la modification de l'adhésion focale (Webb, *et al.*, 2002). Une augmentation du Ca^{2+} cellulaire pourrait augmenter l'activité de la tyrosine kinase FAK (focal adhesion kinase), un régulateur essentiel du turnover d'adhésion focale, et de la calpaïne, une protéase calcium-dépendante (Achison, *et al.*, 2001). Le BPA, par amplification de l'entrée capacitive, pourrait donc moduler ces protéines Ca^{2+} -sensibles impliquées dans le turnover d'adhésion focale.

Pour joindre ces études réalisées sur les lignées cellulaires et les tissus prostatiques des cancers, nous avons pour la première fois montré l'expression des protéines Orai1 dans les tissus prostatiques humains. En effet les études par immunofluorescence ont montré une forte expression des protéines Orai1 dans les cellules épithéliales des acini ainsi que dans les cellules du stroma. Ainsi, les cellules stromales pourraient également être influencées par l'exposition au BPA. Compte tenu de l'importance des interactions épithélium-stroma (stroma réactif) dans la progression des cancers prostatiques, les effets potentiels du BPA sur la signalisation calcique et la sécrétion des facteurs de croissance de ces cellules devront par la suite être étudiés.

Le BPA est systématiquement détecté chez presque tous les individus (95%) des pays développés (Welshons, *et al.*, 2006), ce qui suggère que les humains sont exposés au BPA en permanence. En outre, la rapide élimination métabolique du BPA et les taux que l'on détecte dans les urines et le sang humains laissent à penser que notre taux d'exposition au BPA est plus élevé que celui indiqué par diverses études et qu'une consommation quotidienne à long terme pourrait conduire à sa bioaccumulation conduisant à des effets nocifs sur la santé humaine dont notamment la progression tumorale. Les concentrations de BPA que nous avons utilisées dans notre étude seraient donc pertinentes du point de vue d'exposition environnementale.

L'impact du TCS sur les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques

Dans la présente étude, nous montrons pour la première fois que l'antimicrobien TCS (1 – 10 μM) induit une mobilisation de calcium à partir des stocks intracellulaires par l'activation des canaux ioniques RyRs dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines. Ces effets du TCS étaient accompagnés d'une diminution de la prolifération cellulaire et de l'inhibition de l'apoptose induite par la thapsigargine (TG). Nous avons montré que le TCS inhibait la translocation de la protéine STIM1 et probablement l'activation du canal membranaire Orai1, menant à l'inhibition de l'apoptose en bloquant l'influx calcique SOCE induit par la TG. Nos résultats suggèrent l'implication des Protéines Kinases C (PKC), probablement activées par la mobilisation du calcium interne induite par le TCS, dans les actions inhibitrices du TCS dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

L'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire libre induite par le TCS peut également moduler l'expression des gènes par de nombreuses voies impliquant le calcium. Il est maintenant bien établi qu'une variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ déclenche diverses fonctions cellulaires (Campanella, *et al.*, 2004, Franks and Sejnowski, 2002, Gill, *et al.*, 1996, Lynch and Michalak, 2002, Macrez and Mironneau, 2004, Shuttleworth, 1997). Parmi les effets calciques, l'oscillation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (oscillation calcique) est connue pour activer plusieurs facteurs de transcription et induire ainsi l'expression des gènes (Dolmetsch, *et al.*, 1998, Lewis, 2003, Li, *et al.*, 1998). La modulation de

l'expression des gènes de canaux ioniques induite par le TCS dans les cellules LNCaP pourrait être due à l'activation des RyRs et la libération subséquente du calcium à partir des stocks intracellulaires. L'étude de l'origine des signaux calciques impliqués dans la régulation de l'expression génique dans le muscle squelettique n'a été réalisée que récemment. Dans ce tissu, la plupart des signaux calciques cytoplasmiques et nucléaires proviennent de la libération de calcium à partir des stocks internes, médiée par les Récepteurs à la Ryanodine (RyRs) ou à l'IP₃ (IP₃Rs) situés à la fois dans la membrane du réticulum endoplasmique et dans la membrane nucléaire, et leur activation contribue aussi à une augmentation en calcium nucléaire durable. Les signaux calciques médiés par les RyRs et les IP₃Rs sont très différents en termes de cinétique, amplitude et localisation subcellulaire ; la question est de savoir si ces différences sont différentiellement détectées par les facteurs de transcription.

Plusieurs études montrent que la libération de calcium induite par les RyRs contrôle l'expression de certaines protéines du muscle squelettique (Adams and Goldman, 1998, Vali, *et al.*, 2000), contrôle médié partiellement par la CaMKII (Macpherson, *et al.*, 2002, Tang, *et al.*, 2004). Un rôle de la libération de calcium induite par les RyRs dans l'expression des gènes a été également rapporté dans la lignée cellulaire L6 de muscle squelettique non contractile (Ojuka, *et al.*, 2002, Ojuka, *et al.*, 2003). L'ajout de caféine (activateur exogène des RyRs) augmente l'expression de plusieurs enzymes mitochondriales et de facteurs de transcription impliqués dans leur régulation, et cet effet est antagonisé par le dantrolène. Cette augmentation de l'expression de plusieurs protéines mitochondriales induite par la caféine est également antagonisée par un inhibiteur des CaMKs (Ojuka, *et al.*, 2003).

Des nombreuses données montrent que la prolifération, l'apoptose et la migration cellulaire sont corrélées avec une altération de la fonction ou de l'expression des canaux ioniques impliqués dans la signalisation de ces mécanismes cellulaires fondamentaux (Lang, *et al.*, 2005, Prevarskaya, *et al.*, 2011). Dans nos études réalisées sur les cellules LNCaP, malgré les effets du TCS sur la signalisation calcique et l'expression des gènes de canaux ioniques, nous n'avons pas observé d'effet stimulateur de la prolifération cellulaire, mais plutôt un effet inhibiteur pour la concentration la plus élevée utilisée dans nos études (10 µM). Il est possible que l'effet du TCS sur la translocation de STIM1 soit impliqué dans ses effets sur la diminution de la prolifération des cellules LNCaP.

Nous avons également mené ces études sur les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes PC-3. Dans ces cellules, le TCS semble induire un effet biphasique : une augmentation de la prolifération à faibles concentrations et une diminution de la prolifération à forte concentration (Figure 34). La population de la lignée cellulaire PC-3 étant hétérogène, il se pourrait qu'une certaine catégorie de ces cellules entre en prolifération alors qu'une autre subisse la

différenciation menant à l'EMT suite aux traitements au TCS, la réponse de chaque catégorie cellulaire dépendant des doses d'exposition au TCS.

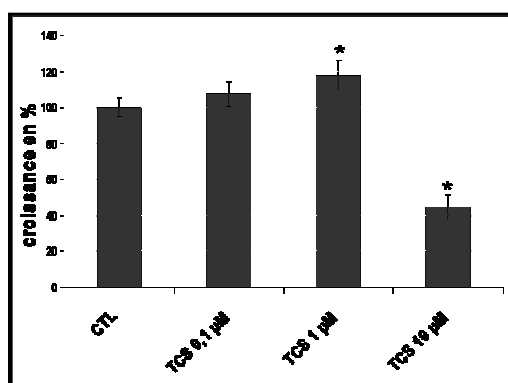


Figure 34 : Prolifération des cellules PC-3 traitées ou non au TCS (0,1, 1 ou 10 μM) pendant 4 jours.

Pour les deux lignées cellulaires, nous avons étudié si le TCS pouvait induire une transition épithélio-mésenchymateuse. Pour les cellules LNCaP, quelles que soient les concentrations de TCS testées nous n'avons pas observé de variation allant dans ce sens. En revanche, la signalisation calcique et la modulation de l'expression des gènes de canaux ioniques induites par le TCS dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes PC-3 pourraient être à l'origine du processus de transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, pour déterminer si les cellules PC-3 traitées au TCS sont engagées dans un processus d'EMT, nous avons dans un premier temps évalué leur capacité de migration par la technique de cicatrisation (Figure 35).

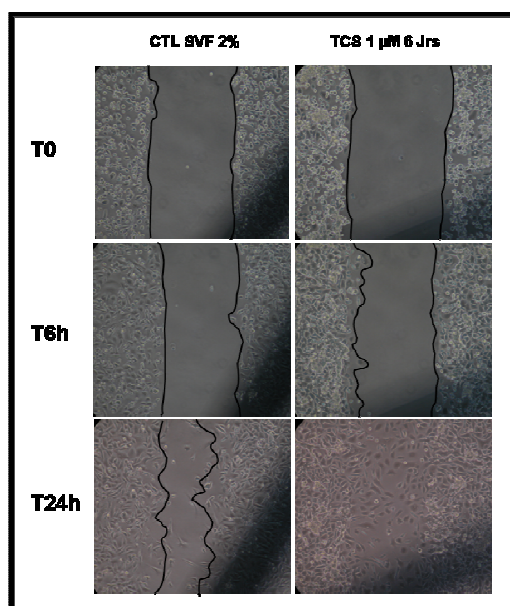


Figure 35 : Migration par la technique de cicatrisation des cellules PC-3 prétraitées ou non au TCS (1 μM pendant 6 jours) en présence ou non de TCS (1 μM) suivie sur 24h.

Nous avons ainsi observé un comblement plus rapide de la brèche réalisée chez les cellules prétraitées au TCS par rapport aux cellules non traitées. Nous avons ensuite confirmé ces résultats préliminaires en observant que des prétraitements au TCS des cellules PC-3 entraînaient une augmentation de l'expression de la vimentine aussi bien au niveau messager que protéique (Figure 36A et 36B), la vimentine étant l'un des marqueurs les plus couramment utilisés pour caractériser l'EMT dans les cellules cancéreuses épithéliales du fait de son rôle dans l'adhésion, la morphologie cellulaire et la motilité (Mendez, *et al.*, 2010). De même, des études par immunofluorescence nous ont permis de mettre en évidence cette expression plus importante de la vimentine dans les cellules PC-3 traitées au TCS ainsi qu'une morphologie plus allongée de ces cellules (Figure 36C). Ces premiers résultats laissent à penser que le TCS pourrait être à l'origine du phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse chez les cellules cancéreuses androgéno-indépendantes prostatiques, favorisant de ce fait leur caractère invasif et métastatique, et devront être complétés par la suite.

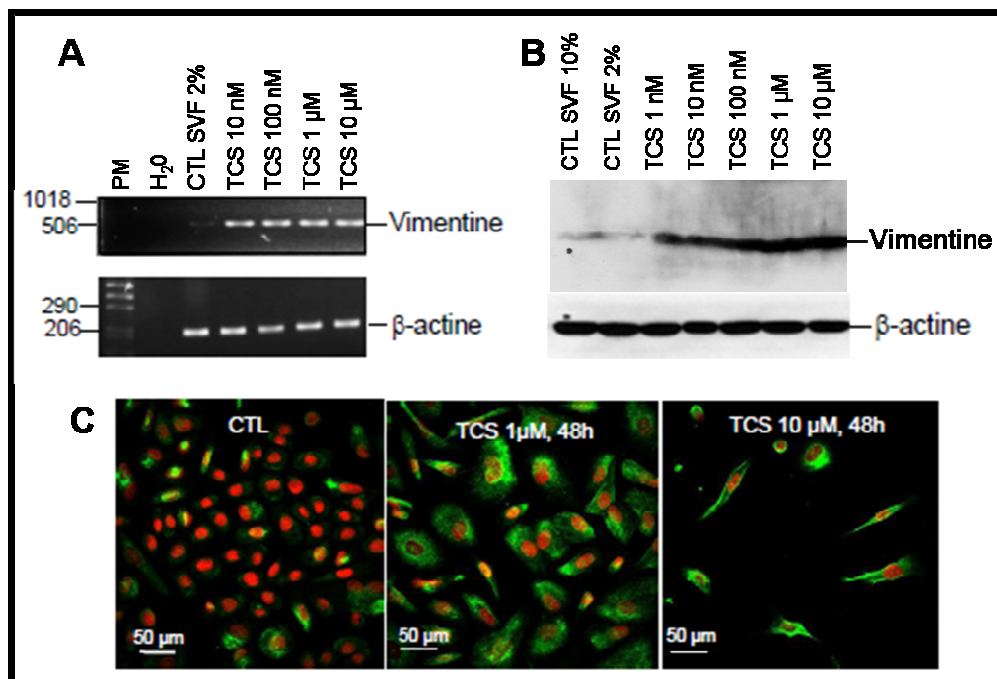


Figure 36 : Expression de la Vimentine au niveau de l'ARNm par la technique de RT-PCR (A) et protéique par la technique de Western Blot (B) dans les cellules PC-3 traitées ou non au TCS pendant 48h. (C) Expression de la Vimentine (vert) dans les cellules PC-3 traitées ou non au TCS (1 ou 10 μ M) pendant 48h. Le noyau des cellules est marqué à l'iodure de propidium (rouge).

Comme mentionné précédemment, les protéines Orai1, STIM1 et des canaux TRP ont été montrés pour être impliqués dans la prolifération des cellules tumorales, la migration cellulaire et l'apoptose (pour revue, voir Prevarskaya *et al.*, 2011). Les canaux SOC sont impliqués dans la génération d'oscillation calcique (Feske, *et al.*, 2001, Lewis, 2003). L'oscillation calcique augmente l'efficacité de la signalisation nucléaire et sa fréquence contribue à la spécificité de la signalisation

nucléaire, à l'activation de facteurs de transcription et l'expression des gènes (Dolmetsch, *et al.*, 1998, Lewis, 2003, Li, *et al.*, 1998). Par conséquent, il se pourrait que le TCS perturbe l'expression de certains gènes via l'inhibition des canaux SOC.

En étudiant les effets du TCS sur l'entrée capacitive induite par la TG, nous avons montré que le facteur environnemental agissait différemment lorsqu'il était appliqué avant ou après le développement du SOCE. En effet, nous avons observé que lorsqu'il était appliqué avant l'entrée capacitive induite par la TG, le TCS présentait une action inhibitrice sur l'influx calcique à travers les canaux SOC. **Etant donné que la protéine STIM1 forme des clusters près de la membrane plasmique et active les canaux SOC via une liaison directe avec un domaine cytosolique d'Orai1 (Park et al., 2009), ces effets du TCS sont probablement médiés par l'inhibition de la translocation de STIM1, de son regroupement en cluster et de son association avec Orai1.** Plusieurs mécanismes proposés pourraient être impliqués dans l'inhibition de l'influx calcique SOCE induite par le TCS. Le rôle des PKC dans la régulation l'entrée capacitive a été étudié dans divers types cellulaires, les effets observés sur la fonction des canaux SOC variant selon les types cellulaires considérés (Gao, *et al.*, 2012, Haverstick, *et al.*, 1997, Kawasaki, *et al.*, 2010, Lee, *et al.*, 1997, Parekh and Penner, 1995, Petersen and Berridge, 1994). Cela peut être dû aux différents sous-types de PKC (Nishizuka, 1988, 1992) et aux différents types de canaux SOC exprimés dans les cellules étudiées. Dans notre étude, à l'aide d'outils pharmacologiques (un activateur et un inhibiteur de la PKC, respectivement le PMA et Gö6976), nous avons montré que les membres de la sous-famille de PKC Ca²⁺-activées, PKC α and PKC β , sont responsables de la modulation de l'influx calcique SOCE. Toutefois, des études plus approfondies seraient nécessaires pour confirmer l'implication de ces isoformes de PKC dans l'inhibition de l'entrée capacitive induite par le TCS.

Des données récentes montrent que la protéine STIM1 pourrait être également phosphorylée pour moduler sa translocation. L'inhibition de la translocation de STIM1 pourrait ainsi être due à une modification de son état de phosphorylation. Des études ont révélé l'implication de membres de la famille des MAPKs dans l'apoptose induite par la TG. Les MAPKs dont ERK1/2 régulent l'activité de facteurs de transcription ou de kinases en aval par phosphorylation, contrôlant ainsi une grande variété de processus physiologiques (Futami, *et al.*, 2005). Une augmentation du calcium intracellulaire basal en raison d'une mobilisation des réserves intracellulaires active les voies des MAP kinases conduisant à l'activation des kinases ERK1 et 2. Dans un travail récent, STIM1 s'est avéré être une cible de ERK1/2 au niveau d'un site spécifique, la sérine 575. Des mutants de substitution de cette sérine montraient une association Orai1/STIM1 et une entrée SOCE réduites, suggérant que la phosphorylation de ces résidus est nécessaire pour développer l'entrée capacitive (Lee, *et al.*, 2012, Pozo-Guisado, *et al.*, 2010, Smyth, *et al.*, 2009). Récemment, un travail intéressant

montre une phosphorylation des résidus tyrosine de STIM1 durant les premières étapes d'activation du SOCE (Lopez, *et al.*, 2012). La phosphorylation des résidus tyrosine semble être un événement clé pour l'association de STIM1 aux canaux Orai1, et serait aussi nécessaire pour l'activation de l'influx calcique SOCE. Le TCS pourrait donc inhiber directement ou indirectement les tyrosine kinase ERK1/2 pour empêcher la phosphorylation et la translocation de STIM1 et ainsi inhiber le SOCE. Dans ce contexte, un effet inhibiteur du TCS sur l'adénylate cyclase, une enzyme effectrice des voies de transduction, est déjà connu dans les cellules de Leydig de rat (Kumar, *et al.*, 2008). Concernant les effets du TCS après le développement de l'entrée capacitive, nos travaux n'ont montré aucune inhibition de l'influx calcique SOCE. Nos résultats suggèrent donc que l'inhibition du SOCE induit par la TG n'est pas due à un effet direct du TCS sur les canaux SOC, mais à l'inhibition de la formation des complexes de canaux impliqués dans l'entrée capacitive.

Un autre effet important du TCS observé dans cette étude est la résistance à l'apoptose induite par la TG des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP en présence de l'antimicrobien. Ces données suggèrent que les facteurs environnementaux, y compris le TCS, pourraient être impliqués dans l'échec des chimiothérapies dans les traitements des cancers en général et du cancer de la prostate en particulier. Le traitement du cancer de la prostate métastatique et la résistance à la castration androgénique sont depuis longtemps un problème récurrent, avec quelques rares succès thérapeutiques. Le Docétaxel a été le premier traitement cytotoxique associé à un avantage de survie au cancer de la prostate résistant à la castration. Malheureusement, une proportion importante d'hommes atteints d'un cancer de la prostate résistant à la castration ne répond pas au traitement à base de Docétaxel et tous les patients finissent en général par développer une résistance. La compréhension des mécanismes sous-jacents de la résistance au Docétaxel pourrait permettre le développement de plusieurs nouvelles approches de traitement dans l'avenir. Ainsi, l'étude de l'implication du TCS dans les mécanismes de résistance au Docétaxel pourrait s'avérer intéressante et permettrait de proposer des mesures préventives et des thérapies de ciblage des canaux ioniques pour rendre plus efficace l'action du Docétaxel dans la chimiothérapie des cancers de la prostate.

Pour la première fois, nous avons également montré l'expression des cibles protéiques RyR1 et RyR2 du TCS dans les tissus prostatiques humains. L'immunomarquage des protéines RyRs était retrouvé au niveau des cellules épithéliales et plus intensément encore au niveau des cellules stromales. Ainsi, les cellules stromales pourraient également être influencées par l'exposition au TCS, constatation qui fut le point de départ au développement du troisième volet d'étude de cette thèse.

L'impact du Triclosan sur les cellules stromales issues de cancers prostatiques

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois l'impact potentiel du TCS sur la progression du cancer de la prostate humaine. En effet, nous avons montré que le TCS induisait une entrée importante de calcium dans les cellules stromales issues de cancers prostatiques humains, cellules connues pour sécréter des facteurs mitogènes capables d'affecter les cellules épithéliales et vasculaires environnantes. Nous avons mis en évidence l'activation par le TCS d'un canal calcique, le canal TRPA1, situé sur la membrane plasmique. Par la suite, nous avons montré l'expression exclusive du canal TRPA1 dans les cellules stromales des cancers prostatiques humains. Nous avons aussi montré que l'activation du canal TRPA1 induite par le TCS et l'entrée de calcium qui s'en suit stimulaient la sécrétion de VEGF, un facteur bien connu pour moduler la croissance des cellules endothéliales et épithéliales et pour favoriser ainsi la progression tumorale (Wong and Wang, 2000).

Le canal TRPA1 est considéré comme un acteur clé de l'inflammation et des douleurs aiguës et chroniques (neuropathique). Par ailleurs, son rôle dans la physiopathologie de nombreux organes est pressenti et sera discuté avec son potentiel en tant que cible thérapeutique pour le traitement de diverses conditions pathologiques. Le canal TRPA1 est un canal cationique non sélectif qui s'avère être exprimé dans un sous-ensemble de neurones sensoriels impliqués dans de nombreuses formes d'hyperalgésies aiguës et chroniques (Bautista, *et al.*, 2006, Obata, *et al.*, 2005).

Nous avons montré que le canal TRPA1 était exprimé exclusivement dans les cellules stromales des régions de cancer et qu'il était impliqué dans la sécrétion des facteurs par ces cellules. Initialement signalés comme sensibles au froid nocif (Story, *et al.*, 2003), les canaux TRPA1 se sont par la suite avérés être senseur de nombreux composés irritants environnementaux, tels que l'acroléine (Bautista, *et al.*, 2006), le formaldéhyde (McNamara, *et al.*, 2007) et le zinc (Hu, *et al.*, 2009), des ingrédients de plantes amères comme l'huile de moutarde (Bautista, *et al.*, 2006), le cinnamaldéhyde (Bandell, *et al.*, 2004), et l'allicine (Bautista, *et al.*, 2006) et des substances produites de manière endogène comme le peroxyde d'hydrogène (Andersson, *et al.*, 2008) et le 4-hydroxynonanal (Trevisani, *et al.*, 2007). Nos données montrant l'activation du canal TRPA1 par le TCS suggèrent que celui-ci pourrait être ajouté à la longue liste des facteurs environnementaux pouvant activer le canal. Toutefois, le site de fixation du TCS sur le canal TRPA1 n'est pas encore déterminé. L'utilisation par exemple de mutants du canal au niveau de différents domaines intracellulaire et extracellulaire de liaison des ligands permettrait de déterminer le mode d'action du TCS sur le canal TRPA1.

En plus des facteurs environnementaux, plusieurs activateurs endogènes du canal TRPA1 ont été aussi mis en évidence et il pourrait s'avérer que ceux-ci modulent également la sécrétion des facteurs paracrines par les cellules stromales. Parmi ces substances endogènes, on peut citer par

exemple les molécules produites au cours de la phosphorylation oxydative, tels que le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et les prostaglandines cyclopentène (PGJ₂) (Andersson, *et al.*, 2008, Bessac, *et al.*, 2008). Récemment, le canal TRPA1 s'est avéré être également activé par le méthylglyoxal (MG), formé à partir de triose phosphates pendant le métabolisme du glucose secondaire en état hyperglycémique (Cao, *et al.*, 2012). Un autre activateur endogène du canal TRPA1 qui pourrait s'avérer intéressant est le formaldéhyde. En effet, des données cliniques ont montré que la concentration en formaldéhyde est élevée (2,8 fois plus importante) dans les urines de patients atteints d'un cancer de la prostate et de la vessie (Spanel, *et al.*, 1999) et dans l'air expiré des souris porteuses d'une tumeur et les patients atteints de cancer du sein (Ebeler, *et al.*, 1997) ; par ailleurs ces patients souffrent souvent de douleurs osseuses associées au cancer (Sabino and Mantyh, 2005). Le formaldéhyde est depuis de nombreuses années considéré comme un facteur de risque de développement de cancer (Thorndike and Beck, 1977). Il a ainsi été montré que dans les tissus cancéreux mammaires et pulmonaires, la concentration en formaldéhyde était en moyenne de 0,75 mM avec la plus forte concentration atteignant 2,35 mM, des concentrations suffisantes pour activer le canal TRPA1 et induire la sécrétion des facteurs favorisant la progression tumorale. Des études récentes ont rapporté que le formaldéhyde (0,02 mM) pouvait induire des influx calciques *via* les canaux TRPV1 et TRPA1 dans des cellules HEK transfectées. Ces études ont montré que le canal TRPA1 était plus sensible au formaldéhyde que TRPV1 (Macpherson, *et al.*, 2007, McNamara, *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que des substances dérivées du cancer (formaldéhyde) pourraient avoir un effet pro-cancer en activant le canal TRPA1 dans les cellules stromales conduisant à la sécrétion des facteurs paracrines et ainsi à l'évolution des cancers vers une forme plus agressive.

La contribution du microenvironnement stromal au développement d'une grande variété de tumeurs a été mise en évidence par des preuves cliniques et l'utilisation de modèles murins (Bhowmick and Moses, 2005). Un nombre croissant de données suggèrent également que les cellules tumorales recruteraient activement les fibroblastes associés au cancer (CAFs), qui restent activés et jouent un rôle important dans la progression tumorale (Bhowmick, *et al.*, 2004). Dans le cancer du sein, environ 80 % des fibroblastes du stroma peuvent acquérir le phénotype activé qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses au niveau des sites métastatiques, stimulant la croissance tumorale similaire à celle de la tumeur primaire (Kalluri and Zeisberg, 2006). Le stroma réactif s'initie durant le développement précoce du cancer de la prostate et co-évolue avec la progression du cancer. De précédentes études ont défini les marqueurs clés du stroma réactif et ont établi que la biologie du stroma réactif influençait la tumorigénèse et la progression du cancer prostatique.

Dans notre étude, nous montrons que le TCS, via l'activation du canal TRPA1, induit la sécrétion de VEGF dans les cellules stromales issues de cancer prostatique. Les récepteurs au VEGF sont aussi bien exprimés dans les cellules stromales que dans les cellules endothéliales et épithéliales (Jackson, *et al.*, 2002), ce qui suggère une interaction complexe entre les composants cellulaires du micro-environnement cancéreux prostatique. Le VEGF peut potentialiser différentes fonctions dans le cancer de la prostate, dont beaucoup peuvent être responsables de sa croissance et de sa survie lors de thérapie par blocage androgénique. En particulier, l'augmentation de la synthèse du VEGF pourrait être liée à la transition d'un stade précoce du cancer à un stade hautement métastatique et réfractaire aux androgènes. La principale fonction du VEGF est son implication dans la lymphangiogenèse où la croissance et la germination de l'endothélium lymphatique se produit à partir d'un vaisseau lymphatique préexistant (Skobe, *et al.*, 2001). La formation accrue de vaisseau lymphatique entourant une tumeur peut fournir les voies possibles pour les cellules tumorales à métastaser vers des organes éloignés. Comme le retrait des androgènes déclenche l'arrêt de la croissance et l'apoptose au niveau de la tumeur primaire, une augmentation du potentiel métastatique aide donc les cellules tumorales à migrer vers un autre emplacement et y survivre. Fait intéressant, une étude suggère une corrélation significative entre l'expression de VEGF et la diffusion de ganglion lymphatique dans le carcinome de la prostate humaine (Tsurusaki, *et al.*, 1999). Plusieurs travaux ont montré la fonction potentielle médiée par le VEGF qui pourrait être importante pour la croissance et la survie des cellules cancéreuses prostatiques depuis la première phase de sa transition vers un phénotype réfractaire aux androgènes (Li, *et al.*, 2005). Ainsi, la sécrétion de VEGF induite par le TCS pourrait favoriser la progression du cancer de la prostate par modulation de la croissance et de la transformation des cellules épithéliales, de l'angiogenèse et enfin des métastases. Ces aspects devront être étudiés par la suite *in vitro* et *in vivo* pour évaluer l'impact du TCS sur les interactions stroma-épithélium et stroma-cellules endothéliales dans le PCa et sur le développement tumoral des cellules cancéreuses (chez la souris *nude*) et les variations potentielles de la densité en vaisseaux dans ces xénogreffes de cellules de PCa.

La signalisation calcique : un moyen d'évaluation de l'impact des facteurs environnementaux

Comme nous venons de le voir, une variation du taux de calcium intracellulaire peut avoir plusieurs conséquences selon l'amplitude, la durée, la fréquence et la localisation du signal. Celui-ci peut être ainsi impliqué dans différents phénomènes physiopathologiques tels que la sécrétion, la contraction, la prolifération, la migration ou l'apoptose. Par ailleurs, nous venons de montrer que les facteurs environnementaux peut soit induire une réponse calcique, soit moduler une réponse

calcique. Dans ce contexte, la signalisation calcique pourrait être utilisée comme moyen d'évaluation du risque d'exposition ou du potentiel nocif d'un facteur environnemental. En effet, de nombreux facteurs environnementaux déclenchent une signature calcique particulière, souvent associée à un processus pathologique. Il a ainsi été rapporté que de faibles doses du BPA (1-10 nM) pouvaient déclencher une rapide libération de PRL dans les cellules hypophysaires GH3/B6/F10, suite à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ via l'activation directe des canaux calciques voltage-dépendants de type L (Wozniak, *et al.*, 2005). Les cellules hypophysaires produisent et sécrètent de manière spontanée de la prolactine dans les conditions physiologiques. Cependant une libération accrue de PRL, comme celle déclenchée par le BPA, serait à l'origine de troubles des fonctions reproductives.

Ces données suggèrent donc que la réponse calcique à ces facteurs environnementaux pourrait être considérée comme un moyen d'évaluation du risque potentiel des facteurs environnementaux sur la santé publique. En effet, dans le cas de composés environnementaux où des soupçons pèseraient sur leur effet nocif, l'utilisation d'un modèle cellulaire comme la lignée HEK exprimant stablement les canaux TRPA1, les canaux voltage-dépendants de type L ou les canaux réticulaires RyRs, pourrait permettre de déterminer rapidement leur potentiel effet néfaste s'il y a activation directe ou inhibition de la réponse à un agoniste de ces canaux. Les canaux ioniques constitueraient alors des « biomarqueurs d'effet », marqueurs reflétant un changement au niveau cellulaire suite à l'exposition à un facteur environnemental (Silins and Hogberg, 2011). Les biomarqueurs d'effet ne sont pas spécifiques d'un agent donné, contrairement aux marqueurs d'exposition, ce qui les rend particulièrement intéressants pour détecter l'exposition combinée de plusieurs facteurs environnementaux mais également les expositions cumulatives et séquentielles au fil du temps (Scherer, 2005). En outre, dans l'étude d'exposition combinée, les biomarqueurs d'effet tels que des canaux ioniques pourraient permettre d'identifier les composés actifs parmi les facteurs environnementaux en mélange et également les conséquences de cette exposition combinée.

Perspectives

Etude de l'impact des effets combinés des perturbateurs endocriniens

Nous venons de montrer qu'individuellement les facteurs environnementaux modulent la signalisation calcique, l'expression génique et les processus impliqués dans la cancérogénèse. Or, de nombreux perturbateurs endocriniens sont présents dans notre environnement et il est fort probable que des mélanges de ces agents se produisent, de manière intentionnelle ou par coïncidence. Ces mélanges de PE générés dans notre environnement sont certainement innombrables et pourraient avoir un impact sur la santé humaine de plus grande envergure.

Il existe deux grands principes décrivant la manière dont des substances chimiques présentes simultanément dans un mélange peuvent affecter les effets des unes et des autres : les concepts d'additivité et d'interaction (Silins and Hogberg, 2011). L'additivité présume que les produits chimiques agissent par des modes d'action identiques ou différents, qui résultent en l'addition de doses ou d'un effet. Par exemple il a été observé que le BPA induisait une surexpression de VEGF dans l'utérus, le vagin et l'hypophyse de rate (Long, *et al.*, 2001). Il se pourrait que le BPA stimule également une surexpression du VEGF dans la prostate, conduisant à un effet additif de celui du Triclosan sur la sécrétion de VEGF par les cellules stromales et à une croissance tumorale encore plus importante. Le concept d'interaction, quant à lui, suppose que les différents produits chimiques en mélange affectent la toxicité des autres, soit en synergie soit en antagonisme.

Dans ce contexte, nous envisageons par la suite d'étudier l'impact des effets combinés de plusieurs PE (dont le BPA, le TCS et le TCC) sur l'activation et l'inhibition des canaux ioniques ainsi que sur leur expression génique et les conséquences possibles sur les processus impliqués dans la cancérogénèse. Nous regarderons donc également quelles pourraient être les conséquences au niveau de la prolifération, de l'apoptose et de la migration des cellules cancéreuses prostatiques pour évaluer leur influence sur le développement tumoral. Nous chercherons aussi à savoir si ces mélanges de PE peuvent moduler la réponse des cellules cancéreuses prostatiques aux agents chimiothérapeutiques ou s'ils peuvent modifier les effets des facteurs de croissance.

Si des effets combinés des PE sont observés, nous chercherons également des molécules capables de contrecarrer ces effets soit par intervention directe au niveau des cibles des PE, soit par modulation de l'expression de ces cibles. A ce titre les extraits de plantes semblent constituer une voie de recherche prometteuse, certains composés de plantes étant connus pour leur action inhibitrice sur l'activité de canaux ioniques (Horvath, *et al.*, 2012, Morera, *et al.*, 2012, Queiroz, *et al.*, 2011, Zare, *et al.*, 2012).

Etude du canal TRPA1 dans les interactions épithélium-stroma

D'après nos travaux, le canal TRPA1 pourrait être impliqué dans le développement tumoral prostatique, notamment *via* la sécrétion de facteurs solubles favorisant la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses et/ou endothéliales. Nous caractériserons par des études *in vitro* les conséquences de ces interactions en utilisant des cellules stromales en culture primaire et des cellules épithéliales et endothéliales (lignées cellulaires et cultures primaires). Par ailleurs, des études *in vivo* utilisant des souris nude permettront d'évaluer le rôle du canal TRPA1 dans le phénomène de progression tumorale. Pour cela, nous réaliserons des injections combinées en sous-cutanée de cellules épithéliales cancéreuses (PC-3, LNCaP, cellules primaires) et de cellules stromales issues de cancer prostatique chez des souris nude. Ceci permettrait de mettre en évidence l'impact des interactions stroma-épithélium dans le développement tumoral. Dans les mêmes conditions, l'administration de l'inhibiteur HC-030031 ou de l'activateur du canal TRPA1 (AITC) permettrait d'évaluer l'implication de ce canal dans la progression tumorale prostatique.

De plus, lors d'études par immunofluorescence nous avons observé que le canal TRPA1 était exprimé également au niveau des vaisseaux sanguins des tumeurs. Ceci suggère que le canal TRPA1 peut jouer un rôle dans la sécrétion des facteurs (Endothéline-1) par les cellules endothéliales. Ce canal pourrait également intervenir dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales, processus favorisant la progression tumorale. Il serait donc intéressant et important d'étudier l'implication de ce canal TRPA1 dans la physiopathologie des cellules endothéliales.

Conclusion

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié les effets des facteurs environnementaux sur la signalisation calcique et l'impact de ces derniers sur la prolifération, l'apoptose et la migration, processus impliqués dans la cancérogénèse de la prostate humaine.

Nous avons montré dans un premier temps que le BPA provoquait la migration des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP et que cette migration était associée à une amplification de l'influx calcique de type SOCE dans ces cellules. Nous avons également pu identifier certains des canaux ioniques (Orai1, TRPV6, IK, BK) dont l'expression est modulée par le BPA.

Concernant l'antimicrobien TCS, nous avons observé un impact de ce facteur environnemental aussi bien sur les cellules épithéliales cancéreuses prostatiques que sur les cellules stromales de l'environnement tumoral. Nous avons mis en évidence une mobilisation du calcium à partir des stocks intracellulaire *via* l'activation des canaux ioniques RyRs dans les cellules cancéreuses épithéliales prostatiques, ces effets s'accompagnant d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'une inhibition de l'apoptose induite par la thapsigargine (TG). Nous avons montré que le TCS inhibait la translocation de la protéine STIM1 et l'activation du canal membranaire Orai1 menant à l'inhibition de l'entrée de calcium induite par la TG et de l'apoptose. Nos résultats suggèrent également que les protéines Kinases C (PKC), probablement activées par la mobilisation du calcium induite par le TCS, sont impliquées dans ces actions inhibitrices du TCS sur les cellules cancéreuses épithéliales prostatiques humaines.

Au niveau des cellules stromales issues des cancers prostatiques, nous avons montré que le TCS déclenchait une signature calcique complexe. En effet, en plus d'activer les canaux réticulaires RyRs, le TCS semble être capable d'activer directement le canal calcique TRPA1. Nous avons observé que la protéine TRPA1 était exprimée dans les cellules stromales de régions de cancer et que son activation par le TCS induisait la sécrétion de facteurs paracrines (VEGF) pour favoriser la progression de la cancérogénèse prostatique.

Nos données suggèrent que les facteurs environnementaux de structures moléculaires différentes ont des impacts différents sur la signalisation calcique selon l'expression des canaux ioniques dans les cellules cancéreuses prostatiques.

L'absorption quotidienne de ces différents facteurs peut conduire sur le long terme à leur bioaccumulation dans notre organisme et induire des effets nocifs sur la santé humaine dont la progression tumorale. Les concentrations du BPA et du TCS utilisées dans cette thèse ont été observées chez l'homme, justifiant de la pertinence des résultats obtenus. Nos données indiquent donc que le ciblage des canaux ioniques impliqués dans les effets de ces facteurs environnementaux, comme le canal TRPA1, pourrait être un avantage pour limiter la progression tumorale. **Ces données**

pourraient ouvrir un vaste champ d'investigations de l'impact des facteurs environnementaux sur la cancérogénèse prostatique et permettre peut-être un jour d'envisager des mesures préventives chez les patients atteints d'un cancer de la prostate, mesures tenant compte de l'impact de ces facteurs environnementaux afin de limiter au maximum l'exposition des patients cancéreux aux perturbateurs endocriniens. Ces travaux suggèrent également que des canaux ioniques pourraient constituer de nouvelles cibles pharmacologiques dans le traitement des cancers de la prostate humaine mais également être à la base d'un test d'évaluation du potentiel nocif des facteurs environnementaux.

Annexes

Solutions pour extraction d'ADN

Tampon de lyse :

- Tris-HCl: 50 mM
- EDTA : 10 mM
- SDS : 1 %
- pH : 7,5

Solution de Phénol/Chloroform/AIA :

- Phénol : 50 %
- Chloroform : 48 %
- Isoamyl alcool : 2 %

Solutions pour extraction d'ARN

Solution D :

- Thiocyanate de Guanidine : 4 M
- Acétate de Sodium : 25 mM
- N-lauroyl Sarcosine : 0,5 %
- Régler le pH à 7,0 avec solution Tris-base 1 M
- Avant l'emploi, ajouter le β -mercapto éthanol à 0,7 %

Acétate de sodium (3M) :

- Acide acétique : 50 ml à 5 M
- Acétate de sodium : 30 ml à 5 M

Solution de Phénol/Chloroform/AIA :

- Phénol : 83,33 %
- Chloroform : 16,33 %
- Isoamyl alcool : 0,33 %

Solutions pour extraction de protéines

Tampon RIPA :

- Triton X100 : 1 %
- Sodium Déoxycholate : 1 %
- Tampon Phosphate (PO₄ Na₂/K): 10 mM
- pH : 7,2

Solutions pour immunofluorescence

Tampon citrate :

- Acide citrique 0,1 M
- Citrate de soude 0,1 M
- pH 6

Solution de PBS :

- NaCl : 8 g/L
- KCl : 0,2 g/L
- Na₂HPO₄ : 1,44 g/L
- KH₂PO₄ : 0,24 g/L
- pH: 7,4

Para-Formaldéhyde (PFA) :

- Tampon Phosphate (PO₄ Na₂/K): 200 mM
- PFA: 10 %

Solution de saturation pour immunofluorescence :

- PBS
- Sérum d'âne : 5%
- BSA : 0,2%
- Triton X100 : 0,2 %
- pH 7,4

Solutions pour électrophorèse

Tampon TBE :

- Tris HCl : 108 g/L
- Acide Borique : 55 g/L
- EDTA : 9,3 g/L
- pH: 8,3

Tampon TAE :

- Tris HCl : 108 g/L
- Acide Acétique : 55 g/L
- EDTA : 9,3 g/L
- pH: 8,3

Solution « run-SDS » pour électrophorèse SDS-PAGE :

- Tris : 25 mM
- Glycine : 192 mM
- SDS : 0,1 %
- pH : 8,3 – 8,5

Solution de transfert :

- Tris : 48 mM
- Glycine : 39 mM
- SDS : 0,037 %
- Méthanol : 10 %

Tampons de charge et marqueurs de poids moléculaire

Tampon de charge pour protéine (Tampon de Laemelli) :

- Tris pH 6,8 : 62,5 mM
- SDS : 2 %
- Saccharose : 10 %
- Bleu de Bromophénol : 0,001 %

- DTT : 100 mM

Tampon de charge pour ADN :

- 50cl de bleu concentré (0,25% de Bleu de Bromophenol + 0,25% de xylène cyanate dans H₂O).
- 950cl d'un mix Tris-HCl 10mM finale (pH 8) + 40% glycérol.

Marqueur de poids moléculaire pour ADN/ARN :

- Tampon « bleu » de charge : 15 %
- Marqueur « 1 kb » : 10 %

Autres solutions

Tampon TE (Tris-EDTA) :

- Tris HCl : 1,21 g/L
- EDTA : 0,37 g/L
- pH: 7,9

HBSS :

- NaCl : 140 mM
- KCl : 5 mM
- CaCl₂ : 2 mM
- MgCl₂: 2
- Na₂HPO₄ : 0.3 mM
- KH₂PO₄ : 0.4 mM
- NaHCO₃ : 4mM
- Glucose: 5 mM
- HEPES: 10 mM (pH 7.3, osmolalité 330mosmol/l)

Publications

1 - **Derouiche, S.**, Warnier, M., Mariot, P., Gosset, P., Mauroy, B., Bonal, J.L., Slomianny, C., Delcourt, P., Prevarskaya, N. and Roudbaraki, M. (2012) "Bisphenol A stimulates human prostate cancer cells migration via remodelling of calcium signalling" *Springer Plus*, en révision.

2 - **Derouiche, S.**, Warnier, M., Mariot, P., Vancauwenberghe, E., Gosset, P., Mauroy, B., Bonnal, J.L., Slomianny, C., Delcourt, P., Prevarskaya, N. and Roudbaraki, M. (2012) "Antibacterial agent Triclosan prevents apoptosis *via* a modification of calcium signalling in human prostate cancer cells" *Environment Health Perspectives*, soumis.

3 - **Derouiche, S.**, Mariot, P., Warnier, M., Bidaux, G., Gosset, P., Mauroy, B., Bonnal, J.L., Slomianny, C., Delcourt, P., Prevarskaya, N. and Roudbaraki, M. (2012) "Environmental factor Triclosan activates TRPA1 channel and VEGF secretion in human prostate cancer stromal cells" *Cancer cell*, soumis.

Bibliographie

- Abdul, M. and Hoosein, N. (2002). Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett.* 186 (1):99-105.
- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer.* 6 (4):503-19.
- Achison, M., Elton, C. M., Hargreaves, P. G., Knight, C. G., Barnes, M. J. and Farndale, R. W. (2001). Integrin-independent tyrosine phosphorylation of p125(fak) in human platelets stimulated by collagen. *J Biol Chem.* 276 (5):3167-74.
- Adams, L. and Goldman, D. (1998). Role for calcium from the sarcoplasmic reticulum in coupling muscle activity to nicotinic acetylcholine receptor gene expression in rat. *J Neurobiol.* 35 (3):245-57.
- Ahn, K. C., Zhao, B., Chen, J., Cherednichenko, G., Sanmarti, E., Denison, M. S., Lasley, B., Pessah, I. N., Kultz, D., Chang, D. P., Gee, S. J. and Hammock, B. D. (2008). In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: receptor-based bioassay screens. *Environ Health Perspect.* 116 (9):1203-10.
- Akingbemi, B. T., Sottas, C. M., Koulova, A. I., Klinefelter, G. R. and Hardy, M. P. (2004). Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology.* 145 (2):592-603.
- Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H. and Elbetieha, A. M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *Eur J Oral Sci.* 110 (2):163-7.
- Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H. and Elbetieha, A. M. (2004). Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *Eur J Oral Sci.* 112 (3):267-72.
- Alexandre, I. and Rixe, O. (2007). Cancer de la prostate hormonorésistant. *Annales d'urologie.* 41 47-55.
- Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M. S. and Sandborgh-Englund, G. (2006). Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Sci Total Environ.* 372 (1):87-93.
- Alonso-Magdalena, P., Laribi, O., Ropero, A. B., Fuentes, E., Ripoll, C., Soria, B. and Nadal, A. (2005). Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect.* 113 (8):969-77.
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E. and Nadal, A. (2006). The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect.* 114 (1):106-12.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Soriano, S., Quesada, I. and Nadal, A. (2010). Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens).* 9 (2):118-26.
- Alonso, M. T. and Garcia-Sancho, J. (2011). Nuclear Ca²⁺ signalling. *Cell Calcium.* 49 (5):280-9.
- Ammon, J., Karstens, J. H. and Rathert, P. (1977). [TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma (author's transl)]. *Urologe A.* 16 (2):73-82.
- Andersson, D. A., Gentry, C., Moss, S. and Bevan, S. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 28 (10):2485-94.
- Andrade, E. L., Meotti, F. C. and Calixto, J. B. (2012). TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther.* 133 (2):189-204.
- Anway, M. D., Cupp, A. S., Uzumcu, M. and Skinner, M. K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* 308 (5727):1466-9.
- Arya, M., Bott, S. R., Shergill, I. S., Ahmed, H. U., Williamson, M. and Patel, H. R. (2006). The metastatic cascade in prostate cancer. *Surg Oncol.* 15 (3):117-28.
- Asano, S., Tune, J. D. and Dick, G. M. (2010). Bisphenol A activates Maxi-K (K(Ca)_v1.1) channels in coronary smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 160 (1):160-70.

- Asher, V., Sowter, H., Shaw, R., Bali, A. and Khan, R. (2010). Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. *World J Surg Oncol.* 8 113.
- Aumuller, G., Leonhardt, M., Janssen, M., Konrad, L., Bjartell, A. and Abrahamsson, P. A. (1999). Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology.* 53 (5):1041-8.
- Babaian, R. J., Miyashita, H., Evans, R. B. and Ramirez, E. I. (1992). THE DISTRIBUTION OF PROSTATE SPECIFIC ANTIGEN IN MEN WITHOUT CLINICAL OR PATHOLOGICAL EVIDENCE OF PROSTATE-CANCER - RELATIONSHIP TO GLAND VOLUME AND AGE. *Journal of Urology.* 147 (3):837-840.
- Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J. and Patapoutian, A. (2004). Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron.* 41 (6):849-57.
- Bang, S. and Hwang, S. W. (2009). Polymodal ligand sensitivity of TRPA1 and its modes of interactions. *J Gen Physiol.* 133 (3):257-62.
- Bao, L., Loda, M., Janmey, P. A., Stewart, R., Anand-Apte, B. and Zetter, B. R. (1996). Thymosin beta 15: a novel regulator of tumor cell motility upregulated in metastatic prostate cancer. *Nat Med.* 2 (12):1322-8.
- Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I. and Julius, D. (2006). TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell.* 124 (6):1269-82.
- Bavik, C., Coleman, I., Dean, J. P., Knudsen, B., Plymate, S. and Nelson, P. S. (2006). The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. *Cancer Res.* 66 (2):794-802.
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V. and Le Bot, B. (2012). Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environ Sci Pollut Res Int.* 19 (4):1044-65.
- Bernardi, P. and Rasola, A. (2007). Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem.* 45 481-506.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361 (6410):315-25.
- Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays.* 17 (6):491-500.
- Berridge, M. J. (1996). Microdomains and elemental events in calcium signalling. *Cell Calcium.* 20 (2):95-6.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature.* 395 (6703):645-8.
- Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1 (1):11-21.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D. and Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 (7):517-29.
- Berry, P. A., Maitland, N. J. and Collins, A. T. (2008). Androgen receptor signalling in prostate: effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol.* 288 (1-2):30-7.
- Bessac, B. F., Sivula, M., von Hehn, C. A., Escalera, J., Cohn, L. and Jordt, S. E. (2008). TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest.* 118 (5):1899-910.
- Bester, K. (2005). Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Arch Environ Contam Toxicol.* 49 (1):9-17.
- Bhargava, H. N. and Leonard, P. A. (1996). Triclosan: applications and safety. *Am J Infect Control.* 24 (3):209-18.
- Bhatia-Gaur, R., Donjacour, A. A., Sciavolino, P. J., Kim, M., Desai, N., Young, P., Norton, C. R., Gridley, T., Cardiff, R. D., Cunha, G. R., Abate-Shen, C. and Shen, M. M. (1999). Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes Dev.* 13 (8):966-77.

- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G. and Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 432 (7015):332-7.
- Bhowmick, N. A. and Moses, H. L. (2005). Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*. 15 (1):97-101.
- Birnbaum, L. S. and Fenton, S. E. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environ Health Perspect*. 111 (4):389-94.
- Birnbaumer, L., Yildirim, E. and Abramowitz, J. (2003). A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives. *Cell Calcium*. 33 (5-6):419-32.
- Bisaillon, J. M., Motiani, R. K., Gonzalez-Cobos, J. C., Potier, M., Halligan, K. E., Alzawahra, W. F., Barroso, M., Singer, H. A., Jourdeuil, D. and Trebak, M. (2010). Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 298 (5):C993-1005.
- Black, J. G., Howes, D. and Rutherford, T. (1975). Percutaneous absorption and metabolism of Irgasan DP300. *Toxicology*. 3 (1):33-47.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J., Kunzelmann, K. and Bubendorf, L. (2007). KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene*. 26 (17):2525-34.
- Bonaccorsi, L., Muratori, M., Carloni, V., Marchiani, S., Formigli, L., Forti, G. and Baldi, E. (2004). The androgen receptor associates with the epidermal growth factor receptor in androgen-sensitive prostate cancer cells. *Steroids*. 69 (8-9):549-52.
- Bouskine, A., Nebout, M., Brucker-Davis, F., Benahmed, M. and Fenichel, P. (2009). Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environ Health Perspect*. 117 (7):1053-8.
- Braun, J. M., Yolton, K., Dietrich, K. N., Hornung, R., Ye, X., Calafat, A. M. and Lanphear, B. P. (2009). Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior. *Environ Health Perspect*. 117 (12):1945-52.
- Brawer, M. K. (1999). Prostate-specific antigen: current status. *CA Cancer J Clin*. 49 (5):264-81.
- Brody, J. G. and Rudel, R. A. (2003). Environmental pollutants and breast cancer. *Environ Health Perspect*. 111 (8):1007-19.
- Brody, J. G., Rudel, R. A., Michels, K. B., Moysich, K. B., Bernstein, L., Attfield, K. R. and Gray, S. (2007). Environmental pollutants, diet, physical activity, body size, and breast cancer: where do we stand in research to identify opportunities for prevention? *Cancer*. 109 (12 Suppl):2627-34.
- Bulayeva, N. N., Wozniak, A. L., Lash, L. L. and Watson, C. S. (2005). Mechanisms of membrane estrogen receptor-alpha-mediated rapid stimulation of Ca²⁺ levels and prolactin release in a pituitary cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 288 (2):E388-97.
- Bussemakers, M. J., van Bokhoven, A., Verhaegh, G. W., Smit, F. P., Karthaus, H. F., Schalken, J. A., Debruyne, F. M., Ru, N. and Isaacs, W. B. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 59 (23):5975-9.
- Cabana, H., Jiwan, J. L., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S. N. and Jones, J. P. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. *Chemosphere*. 67 (4):770-8.
- Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J. and Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*. 113 (4):391-5.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A. and Needham, L. L. (2008). Urinary concentrations of triclosan in the U.S. population: 2003-2004. *Environ Health Perspect*. 116 (3):303-7.
- Campanella, M., Pinton, P. and Rizzuto, R. (2004). Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in health and disease. *Biol Res*. 37 (4):653-60.

- Cantonwine, D., Meeker, J. D., Hu, H., Sanchez, B. N., Lamadrid-Figueroa, H., Mercado-Garcia, A., Fortenberry, G. Z., Calafat, A. M. and Tellez-Rojo, M. M. (2010). Bisphenol a exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environ Health*. 9 62.
- Cao, D. S., Zhong, L., Hsieh, T. H., Abooj, M., Bishnoi, M., Hughes, L. and Premkumar, L. S. (2012). Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One*. 7 (5):e38005.
- Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B. and Naranjo, J. R. (1999). DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor. *Nature*. 398 (6722):80-4.
- Ceder, J. A., Jansson, L., Helczynski, L. and Abrahamsson, P. A. (2008). Delta-like 1 (Dlk-1), a novel marker of prostate basal and candidate epithelial stem cells, is downregulated by notch signalling in intermediate/transit amplifying cells of the human prostate. *Eur Urol*. 54 (6):1344-53.
- Chandra, A. and Angle, N. (2005). Vascular endothelial growth factor stimulates a novel calcium-signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Surgery*. 138 (4):780-7.
- Chen, C. D., Welsbie, D. S., Tran, C., Baek, S. H., Chen, R., Vessella, R., Rosenfeld, M. G. and Sawyers, C. L. (2004). Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy. *Nat Med*. 10 (1):33-9.
- Chen, J., Ahn, K. C., Gee, N. A., Gee, S. J., Hammock, B. D. and Lasley, B. L. (2007). Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicol Appl Pharmacol*. 221 (3):278-84.
- Chen, J., Ahn, K. C., Gee, N. A., Ahmed, M. I., Duleba, A. J., Zhao, L., Gee, S. J., Hammock, B. D. and Lasley, B. L. (2008). Triclocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor? *Endocrinology*. 149 (3):1173-9.
- Chen, Y., Yue, S., Xie, L., Pu, X. H., Jin, T. and Cheng, S. Y. (2011). Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem*. 286 (15):13502-11.
- Cheng, L., Song, S. Y., Pretlow, T. G., Abdul-Karim, F. W., Kung, H. J., Dawson, D. V., Park, W. S., Moon, Y. W., Tsai, M. L., Linehan, W. M., Emmert-Buck, M. R., Liotta, L. A. and Zhuang, Z. (1998). Evidence of independent origin of multiple tumors from patients with prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 90 (3):233-7.
- Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D. G., Lopez-Beltran, A. and Berney, D. M. (2012). Staging of prostate cancer. *Histopathology*. 60 (1):87-117.
- Cherednichenko, G., Zhang, R., Bannister, R. A., Timofeyev, V., Li, N., Fritsch, E. B., Feng, W., Barrientos, G. C., Schebb, N. H., Hammock, B. D., Beam, K. G., Chiamvimonvat, N. and Pessah, I. N. (2012). Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109 (35):14158-63.
- Chiquet, M., Sarasa-Renedo, A. and Tunc-Civelek, V. (2004). Induction of tenascin-C by cyclic tensile strain versus growth factors: distinct contributions by Rho/ROCK and MAPK signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*. 1693 (3):193-204.
- Chitra, K. C., Latchoumycandane, C. and Mathur, P. P. (2003). Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*. 185 (1-2):119-27.
- Chung, E., Genco, M. C., Megrelis, L. and Ruderman, J. V. (2011). Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108 (43):17732-7.
- Ciarlo, M., Benelli, R., Barbieri, O., Minghelli, S., Barboro, P., Balbi, C. and Ferrari, N. (2012). Regulation of neuroendocrine differentiation by AKT/hnRNPK/AR/beta-catenin signaling in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 131 (3):582-90.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell*. 80 (2):259-68.
- Clarke, R. A., Schirra, H. J., Catto, J. W., Lavin, M. F. and Gardiner, R. A. (2010). Markers for Detection of Prostate Cancer. *Cancers*. 2

- Colborn, T. and Clement, C. (1992) Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. Princeton Scientific Publishing Co., Inc., Princeton, NJ.
- Collier, I. E., Wilhelm, S. M., Eisen, A. Z., Marmer, B. L., Grant, G. A., Seltzer, J. L., Kronberger, A., He, C. S., Bauer, E. A. and Goldberg, G. I. (1988). H-ras oncogene-transformed human bronchial epithelial cells (TBE-1) secrete a single metalloprotease capable of degrading basement membrane collagen. *J Biol Chem.* 263 (14):6579-87.
- Cooperberg, M. R., Moul, J. W. and Carroll, P. R. (2005). The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol.* 23 (32):8146-51.
- Cordero-Morales, J. F., Gracheva, E. O. and Julius, D. (2011). Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (46):E1184-91.
- Correia, A. D., Freitas, S., Scholze, M., Goncalves, J. F., Booij, P., Lamoree, M. H., Mananos, E. and Reis-Henriques, M. A. (2007). Mixtures of estrogenic chemicals enhance vitellogenic response in sea bass. *Environ Health Perspect.* 115 Suppl 1 115-21.
- Coulon, V. and Blanchard, J. M. (2001). Flux calciques et expression génique. *Médecine/sciences.* 17 969-78.
- Courjaret, R. and Machaca, K. (2012). STIM and Orai in cellular proliferation and division. *Front Biosci (Elite Ed).* 4 331-41.
- Crawford, E. D. (2009). Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology.* 73 (5 Suppl):S4-10.
- Crofton, K. M., Paul, K. B., Devito, M. J. and Hedge, J. M. (2007). Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environ Toxicol Pharmacol.* 24 (2):194-7.
- Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007). Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J Clin Invest.* 117 (7):1979-87.
- Dann, A. B. and Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J Appl Toxicol.* 31 (4):285-311.
- Darbre, P. D. (2006). Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20 (1):121-43.
- Daughton, C. G. and Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect.* 107 Suppl 6 907-38.
- Dayan, A. D. (2007). Risk assessment of triclosan [Irgasan] in human breast milk. *Food Chem Toxicol.* 45 (1):125-9.
- De Coster, S. and van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health.* 2012 713696.
- de Kok, J. B., Verhaegh, G. W., Roelofs, R. W., Hessels, D., Kiemeny, L. A., Aalders, T. W., Swinkels, D. W. and Schalken, J. A. (2002). DD3(PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 62 (9):2695-8.
- De Marzo, A., Platz, E., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C., Nakai, Y., Isaacs, W. and Nelson, W. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7(4):256-69.
- De Wever, O. and Mareel, M. (2003). Role of tissue stroma in cancer cell invasion. *J Pathol.* 200 (4):429-47.
- Dehm, S. M. and Tindall, D. J. (2006). Molecular regulation of androgen action in prostate cancer. *J Cell Biochem.* 99 (2):333-44.
- Denis, L. and Murphy, G. P. (1993). Overview of phase III trials on combined androgen treatment in patients with metastatic prostate cancer. *Cancer.* 72 (12 Suppl):3888-95.
- Desmouliere, A., Chaponnier, C. and Gabbiani, G. (2005). Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen.* 13 (1):7-12.

- Devlin, H. L. and Mudryj, M. (2009). Progression of prostate cancer: multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.* 274 (2):177-86.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T. and Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 30 (4):293-342.
- Doerner, J. F., Gisselmann, G., Hatt, H. and Wetzel, C. H. (2007). Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem.* 282 (18):13180-9.
- Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (1994). Signaling between intracellular Ca²⁺ stores and depletion-activated Ca²⁺ channels generates [Ca²⁺]_i oscillations in T lymphocytes. *J Gen Physiol.* 103 (3):365-88.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K. and Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature.* 392 (6679):933-6.
- Dong, J. T., Lamb, P. W., Rinker-Schaeffer, C. W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J. T. and Barrett, J. C. (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science.* 268 (5212):884-6.
- Dong, J. T., Isaacs, W. B. and Isaacs, J. T. (1997). Molecular advances in prostate cancer. *Curr Opin Oncol.* 9 (1):101-7.
- Duleba, A. J., Ahmed, M. I., Sun, M., Gao, A. C., Villanueva, J., Conley, A. J., Turgeon, J. L., Benirschke, K., Gee, N. A., Chen, J., Green, P. G. and Lasley, B. L. (2011). Effects of triclocarban on intact immature male rat: augmentation of androgen action. *Reprod Sci.* 18 (2):119-27.
- Dulhunty, A. F., Junankar, P. R., Eager, K. R., Ahern, G. P. and Laver, D. R. (1996). Ion channels in the sarcoplasmic reticulum of striated muscle. *Acta Physiol Scand.* 156 (3):375-85.
- Dvorak, H. F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med.* 315 (26):1650-9.
- Ebeler, S. E., Clifford, A. J. and Shibamoto, T. (1997). Quantitative analysis by gas chromatography of volatile carbonyl compounds in expired air from mice and human. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 702 (1-2):211-5.
- Edgington, A. N. and Ritter, L. (2009). Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environ Health Perspect.* 117 (4):645-52.
- Eltit, J. M., Feng, W., Lopez, J. R., Padilla, I. T., Pessah, I. N., Molinski, T. F., Fruen, B. R., Allen, P. D. and Perez, C. F. (2010). Ablation of skeletal muscle triadin impairs FKBP12/RyR1 channel interactions essential for maintaining resting cytoplasmic Ca²⁺. *J Biol Chem.* 285 (49):38453-62.
- Endo, M., Tanaka, M. and Ogawa, Y. (1970). Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 228 (5266):34-6.
- Epstein, J. I. (2010). An update of the Gleason grading system. *J Urol.* 183 (2):433-40.
- Eylenstein, A., Schmidt, S., Gu, S., Yang, W., Schmid, E., Schmidt, E. M., Alesutan, I., Sztejn, K., Regel, I., Shumilina, E. and Lang, F. (2012). Transcription factor NF-kappaB regulates expression of pore-forming Ca²⁺ channel unit, Orai1, and its activator, STIM1, to control Ca²⁺ entry and affect cellular functions. *J Biol Chem.* 287 (4):2719-30.
- Facciolo, R. M., Alo, R., Madeo, M., Canonaco, M. and Dessi-Fulgheri, F. (2002). Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst(2). *Environ Health Perspect.* 110 Suppl 3 397-402.
- Fajardo, O., Meseguer, V., Belmonte, C. and Viana, F. (2008). TRPA1 channels: novel targets of 1,4-dihydropyridines. *Channels (Austin).* 2 (6):429-38.
- Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F. and Dessi-Fulgheri, F. (2002). Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect.* 110 Suppl 3 409-14.

- Fernandes, E. S., Fernandes, M. A. and Keeble, J. E. (2012). The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol.* 166 (2):510-21.
- Feske, S., Giltneane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M. and Rao, A. (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2 (4):316-24.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M. and Rao, A. (2006). A mutation in *Orai1* causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.* 441 (7090):179-85.
- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V. and Bonkhoff, H. (2003). Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene.* 22 (49):7858-61.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S. and Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *J Environ Manage.* 104 19-34.
- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphael, M., Vandenberghe, M., Abeele, F. V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romanin, C., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2010). *Orai1* contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis.* 1 e75.
- Foran, C. M., Bennett, E. R. and Benson, W. H. (2000). Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar Environ Res.* 50 (1-5):153-6.
- Franco, O. E., Jiang, M., Strand, D. W., Peacock, J., Fernandez, S., Jackson, R. S., 2nd, Revelo, M. P., Bhowmick, N. A. and Hayward, S. W. (2011). Altered TGF-beta signaling in a subpopulation of human stromal cells promotes prostatic carcinogenesis. *Cancer Res.* 71 (4):1272-81.
- Franks, K. M. and Sejnowski, T. J. (2002). Complexity of calcium signaling in synaptic spines. *Bioessays.* 24 (12):1130-44.
- Fukami, K., Inanobe, S., Kanemaru, K. and Nakamura, Y. (2010). Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res.* 49 (4):429-37.
- Funabashi, T., Sano, A., Mitsushima, D. and Kimura, F. (2003). Bisphenol A increases progesterone receptor immunoreactivity in the hypothalamus in a dose-dependent manner and affects sexual behaviour in adult ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol.* 15 (2):134-40.
- Futami, T., Miyagishi, M. and Taira, K. (2005). Identification of a network involved in thapsigargin-induced apoptosis using a library of small interfering RNA expression vectors. *J Biol Chem.* 280 (1):826-31.
- Gabbiani, G., Ryan, G. B. and Majne, G. (1971). Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia.* 27 (5):549-50.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 200 (4):500-3.
- Gackiere, F., Bidaux, G., Lory, P., Prevarskaya, N. and Mariot, P. (2006). A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium.* 39 (4):357-66.
- Gao, Y., Zou, J., Geng, S., Zheng, J. and Yang, J. (2012). Role of protein kinase C in the activation of store-operated Ca(2+) entry in airway smooth muscle cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 32 (3):303-10.
- Gaudet, R. (2008). A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond. *Mol Biosyst.* 4 (5):372-9.
- Gee, R. H., Charles, A., Taylor, N. and Darbre, P. D. (2008). Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *J Appl Toxicol.* 28 (1):78-91.
- Giancippoli, A., Novara, M., de Luca, A., Baldelli, P., Marcantoni, A., Carbone, E. and Carabelli, V. (2006). Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J.* 90 (5):1830-41.

- Gill, D. L., Waldron, R. T., Rys-Sikora, K. E., Ufret-Vincenty, C. A., Graber, M. N., Favre, C. J. and Alfonso, A. (1996). Calcium pools, calcium entry, and cell growth. *Biosci Rep.* 16 (2):139-57.
- Gillenwater, J. Y., Grayhack, J. T., Howards, S. S. and Mitchell, M. E. (2001) *Adult and Pediatric Urology.* Lippincott Williams & Wilkins. 2 (4th): 1413-1415.
- Giovannucci, E. (1998). Dietary influences of 1,25(OH)₂ vitamin D in relation to prostate cancer: a hypothesis. *Cancer Causes Control.* 9 (6):567-82.
- Gkika, D., Flourakis, M., Lemonnier, L. and Prevarskaya, N. (2010). PSA reduces prostate cancer cell motility by stimulating TRPM8 activity and plasma membrane expression. *Oncogene.* 29 (32):4611-6.
- Gkika, D. and Prevarskaya, N. (2011). TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly? *Asian J Androl.* 13 (5):673-6.
- Glade, M. J. (1999). Food, nutrition, and the prevention of cancer: a global perspective. American Institute for Cancer Research/World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research, 1997. *Nutrition.* 15 (6):523-6.
- Gleason, D. F. and Mellinger, G. T. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* 111 (1):58-64.
- Goldstein, A. S., Stoyanova, T. and Witte, O. N. (2010). Primitive origins of prostate cancer: in vivo evidence for prostate-regenerating cells and prostate cancer-initiating cells. *Mol Oncol.* 4 (5):385-96.
- Gore, A. C. (2007) *Endocrine-Disrupting Chemicals : From Basic Research to Clinical Practice.* Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Gore, A. C. (2010). Neuroendocrine targets of endocrine disruptors. *Hormones (Athens).* 9 (1):16-27.
- Gregory, C. W., Johnson, R. T., Jr., Mohler, J. L., French, F. S. and Wilson, E. M. (2001). Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res.* 61 (7):2892-8.
- Grossfeld, G. D., Hayward, S. W., Tlsty, T. D. and Cunha, G. R. (1998). The role of stroma in prostatic carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer.* 5 253-270.
- Gruszczynska-Biegala, J., Pomorski, P., Wisniewska, M. B. and Kuznicki, J. (2011). Differential roles for STIM1 and STIM2 in store-operated calcium entry in rat neurons. *PLoS One.* 6 (4):e19285.
- Gryniewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 260 (6):3440-50.
- Gu, Q. and Lin, R. L. (2010). Heavy metals zinc, cadmium, and copper stimulate pulmonary sensory neurons via direct activation of TRPA1. *J Appl Physiol.* 108 (4):891-7.
- Guarino, M. (1995). Epithelial-to-mesenchymal change of differentiation. From embryogenetic mechanism to pathological patterns. *Histol Histopathol.* 10 (1):171-84.
- Guarino, M. (2007). Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol.* 39 (12):2153-60.
- Gupta, C. (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med.* 224 (2):61-8.
- Gustavsson, N., Wu, B. and Han, W. (2012). Calcium sensing in exocytosis. *Adv Exp Med Biol.* 740 731-57.
- Hanioka, N., Jinno, H., Nishimura, T. and Ando, M. (1997). Effect of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether on cytochrome P450 enzymes in the rat liver. *Chemosphere.* 34 (4):719-30.
- Hardingham, G. E., Chawla, S., Johnson, C. M. and Bading, H. (1997). Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature.* 385 (6613):260-5.
- Hardingham, G. E., Arnold, F. J. and Bading, H. (2001). Nuclear calcium signaling controls CREB-mediated gene expression triggered by synaptic activity. *Nat Neurosci.* 4 (3):261-7.

- Harvey, P. W. (2005). Comment on developmental toxicity evaluation of butylparaben in Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 74 (1):114-5; author reply 116-7.
- Haverstick, D. M., Dicus, M., Resnick, M. S., Sando, J. J. and Gray, L. S. (1997). A role for protein kinase C β 1 in the regulation of Ca²⁺ entry in Jurkat T cells. *J Biol Chem.* 272 (24):15426-33.
- Heidler, J., Sapkota, A. and Halden, R. U. (2006). Partitioning, persistence, and accumulation in digested sludge of the topical antiseptic triclocarban during wastewater treatment. *Environ Sci Technol.* 40 (11):3634-9.
- Heimeier, R. A. and Shi, Y. B. (2010). Amphibian metamorphosis as a model for studying endocrine disruption on vertebrate development: effect of bisphenol A on thyroid hormone action. *Gen Comp Endocrinol.* 168 (2):181-9.
- Heinlein, C. A. and Chang, C. (2002). Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 23 (2):175-200.
- Heinlein, C. A. and Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev.* 25 (2):276-308.
- Hemmerlein, B., Weseloh, R. M., Mello de Queiroz, F., Knotgen, H., Sanchez, A., Rubio, M. E., Martin, S., Schliephacke, T., Jenke, M., Heinz Joachim, R., Stuhmer, W. and Pardo, L. A. (2006). Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Mol Cancer.* 5 41.
- Henley, D. V. and Korach, K. S. (2006). Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology.* 147 (6 Suppl):S25-32.
- Hess-Wilson, J. K., Webb, S. L., Daly, H. K., Leung, Y. K., Boldison, J., Comstock, C. E., Sartor, M. A., Ho, S. M. and Knudsen, K. E. (2007). Unique bisphenol A transcriptome in prostate cancer: novel effects on ER β expression that correspond to androgen receptor mutation status. *Environ Health Perspect.* 115 (11):1646-53.
- Hessels, D., Smit, F. P., Verhaegh, G. W., Witjes, J. A., Cornel, E. B. and Schalken, J. A. (2007). Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 13 (17):5103-8.
- Hinman, A., Chuang, H. H., Bautista, D. M. and Julius, D. (2006). TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (51):19564-8.
- Hirano, D., Okada, Y., Minei, S., Takimoto, Y. and Nemoto, N. (2004). Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *Eur Urol.* 45 (5):586-92; discussion 592.
- Ho, S. M., Tang, W. Y., Belmonte de Frausto, J. and Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 66 (11):5624-32.
- Holzbeierlein, J., Lal, P., LaTulippe, E., Smith, A., Satagopan, J., Zhang, L., Ryan, C., Smith, S., Scher, H., Scardino, P., Reuter, V. and Gerald, W. L. (2004). Gene expression analysis of human prostate carcinoma during hormonal therapy identifies androgen-responsive genes and mechanisms of therapy resistance. *Am J Pathol.* 164 (1):217-27.
- Homma, M. K., Homma, Y., Namba, M. and Yuasa, Y. (1994). Enhanced phosphoinositide metabolism in colorectal carcinoma cells derived from familial adenomatous polyposis patients. *J Cell Biochem.* 55 (4):477-85.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H. and Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol.* 16 (2):117-22.
- Horvath, G., Szoke, E., Kemeny, A., Bagoly, T., Deli, J., Szente, L., Pal, S., Sandor, K., Szolcsanyi, J. and Helyes, Z. (2012). Lutein inhibits the function of the transient receptor potential A1 ion channel in different in vitro and in vivo models. *J Mol Neurosci.* 46 (1):1-9.

- Houtman, C. J., Van Oostveen, A. M., Brouwer, A., Lamoree, M. H. and Legler, J. (2004). Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. *Environ Sci Technol.* 38 (23):6415-23.
- Hu, H., Bandell, M., Petrus, M. J., Zhu, M. X. and Patapoutian, A. (2009). Zinc activates damage-sensing TRPA1 ion channels. *Nat Chem Biol.* 5 (3):183-90.
- Hu, H., Tian, J., Zhu, Y., Wang, C., Xiao, R., Herz, J. M., Wood, J. D. and Zhu, M. X. (2010). Activation of TRPA1 channels by fenamate nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Pflugers Arch.* 459 (4):579-92.
- Hu, M. and Polyak, K. (2008). Microenvironmental regulation of cancer development. *Curr Opin Genet Dev.* 18 (1):27-34.
- Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S. and Worley, P. F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol.* 8 (9):1003-10.
- Huber, M. A., Kraut, N. and Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol.* 17 (5):548-58.
- Huggins, C. and Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate (Reprinted from *Cancer Res*, vol 1, pg 293-297, 1941). *Journal of Urology.* 167 (2):948-951.
- Ilunga, K., Nishiura, R., Inada, H., El-Karef, A., Imanaka-Yoshida, K., Sakakura, T. and Yoshida, T. (2004). Co-stimulation of human breast cancer cells with transforming growth factor-beta and tenascin-C enhances matrix metalloproteinase-9 expression and cancer cell invasion. *Int J Exp Pathol.* 85 (6):373-9.
- Ingham, K. C., Brew, S. A. and Erickson, H. P. (2004). Localization of a cryptic binding site for tenascin on fibronectin. *J Biol Chem.* 279 (27):28132-5.
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y. and Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat Toxicol.* 67 (2):167-79.
- Ishido, M., Masuo, Y., Kunimoto, M., Oka, S. and Morita, M. (2004). Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *J Neurosci Res.* 76 (3):423-33.
- Ishii, K., Mizokami, A., Tsunoda, T., Iguchi, K., Kato, M., Hori, Y., Arima, K., Namiki, M. and Sugimura, Y. (2011). Heterogenous induction of carcinoma-associated fibroblast-like differentiation in normal human prostatic fibroblasts by co-culturing with prostate cancer cells. *J Cell Biochem.* 112 (12):3604-11.
- Jackson, M. W., Roberts, J. S., Heckford, S. E., Ricciardelli, C., Stahl, J., Choong, C., Horsfall, D. J. and Tilley, W. D. (2002). A potential autocrine role for vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res.* 62 (3):854-9.
- Jacobs, M. N., Nolan, G. T. and Hood, S. R. (2005). Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR). *Toxicol Appl Pharmacol.* 209 (2):123-33.
- Jaquemar, D., Schenker, T. and Trueb, B. (1999). An ankyrin-like protein with transmembrane domains is specifically lost after oncogenic transformation of human fibroblasts. *J Biol Chem.* 274 (11):7325-33.
- Jeng, Y. J. and Watson, C. S. (2011). Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter ERK phosphorylation profiles in rat pituitary cells. *Environ Health Perspect.* 119 (1):104-12.
- Jinno, H., Hanioka, N., Onodera, S., Nishimura, T. and Ando, M. (1997). Irganon DP 300 (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)-phenol) induces cytochrome P450s and inhibits haem biosynthesis in rat hepatocytes cultured on Matrigel. *Xenobiotica.* 27 (7):681-92.

- Josson, S., Matsuoka, Y., Chung, L. W., Zhau, H. E. and Wang, R. (2010). Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis. *Semin Cell Dev Biol.* 21 (1):26-32.
- Kabil, A., Silva, E. and Kortenkamp, A. (2008). Estrogens and genomic instability in human breast cancer cells--involvement of Src/Raf/Erk signaling in micronucleus formation by estrogenic chemicals. *Carcinogenesis.* 29 (10):1862-8.
- Kalluri, R. and Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 6 (5):392-401.
- Kanetoshi, A., Katsura, E., Ogawa, H., Ohyama, T., Kaneshima, H. and Miura, T. (1992). Acute toxicity, percutaneous absorption and effects on hepatic mixed function oxidase activities of 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (Irgasan DP300) and its chlorinated derivatives. *Arch Environ Contam Toxicol.* 23 (1):91-8.
- Karlsson, E. (2001). The role of pancreatic chromogranins in islet physiology. *Curr Mol Med.* 1 (6):727-32.
- Kaufman, J. M. and Vermeulen, A. (2005). The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 26 (6):833-76.
- Kawada, M., Yoshimoto, Y., Minamiguchi, K., Kumagai, H., Someno, T., Masuda, T., Ishizuka, M. and Ikeda, D. (2004). A microplate assay for selective measurement of growth of epithelial tumor cells in direct coculture with stromal cells. *Anticancer Res.* 24 (3a):1561-8.
- Kawada, M., Inoue, H., Masuda, T. and Ikeda, D. (2006). Insulin-like growth factor I secreted from prostate stromal cells mediates tumor-stromal cell interactions of prostate cancer. *Cancer Res.* 66 (8):4419-25.
- Kawasaki, T., Ueyama, T., Lange, I., Feske, S. and Saito, N. (2010). Protein kinase C-induced phosphorylation of Orai1 regulates the intracellular Ca²⁺ level via the store-operated Ca²⁺ channel. *J Biol Chem.* 285 (33):25720-30.
- Keri, R. A., Ho, S. M., Hunt, P. A., Knudsen, K. E., Soto, A. M. and Prins, G. S. (2007). An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol.* 24 (2):240-52.
- Kim, J. H., Shin, S. Y., Yun, S. S., Kim, T. J., Oh, S. J., Kim, K. M., Chung, Y. S., Hong, E. K., Uhm, D. Y. and Kim, S. J. (2003). Voltage-dependent ion channel currents in putative neuroendocrine cells dissociated from the ventral prostate of rat. *Pflugers Arch.* 446 (1):88-99.
- Kim, K., Park, H., Yang, W. and Lee, J. H. (2011). Urinary concentrations of bisphenol A and triclosan and associations with demographic factors in the Korean population. *Environ Res.* 111 (8):1280-5.
- Kochukov, M. Y., Jeng, Y. J. and Watson, C. S. (2009). Alkylphenol xenoestrogens with varying carbon chain lengths differentially and potently activate signaling and functional responses in GH3/B6/F10 somatomammotropes. *Environ Health Perspect.* 117 (5):723-30.
- Komuro, H. and Rakic, P. (1993). Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260 (5104):95-7.
- Kremeyer, B., Lopera, F., Cox, J. J., Momin, A., Rugiero, F., Marsh, S., Woods, C. G., Jones, N. G., Paterson, K. J., Fricker, F. R., Villegas, A., Acosta, N., Pineda-Trujillo, N. G., Ramirez, J. D., Zea, J., Burley, M. W., Bedoya, G., Bennett, D. L., Wood, J. N. and Ruiz-Linares, A. (2010). A gain-of-function mutation in TRPA1 causes familial episodic pain syndrome. *Neuron.* 66 (5):671-80.
- Krongrad, A., Lai, H. and Lai, S. (1997). Survival after radical prostatectomy. *JAMA.* 278 (1):44-6.
- Kubota, Y., Fujinami, K., Uemura, H., Dobashi, Y., Miyamoto, H., Iwasaki, Y., Kitamura, H. and Shuin, T. (1995). Retinoblastoma gene mutations in primary human prostate cancer. *Prostate.* 27 (6):314-20.
- Kuhl, A. J. and Brouwer, M. (2006). Antiestrogens inhibit xenoestrogen-induced brain aromatase activity but do not prevent xenoestrogen-induced feminization in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Health Perspect.* 114 (4):500-6.

- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. and Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 139 (10):4252-63.
- Kumar, V., Balomajumder, C. and Roy, P. (2008). Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology*. 250 (2-3):124-31.
- Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M. R. and Roy, P. (2009). Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reprod Toxicol*. 27 (2):177-85.
- Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *J Membr Biol*. 205 (3):159-73.
- Kwan, K. Y., Allchorne, A. J., Vollrath, M. A., Christensen, A. P., Zhang, D. S., Woolf, C. J. and Corey, D. P. (2006). TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron*. 50 (2):277-89.
- Lakeram, M., Lockley, D. J., Sanders, D. J., Pendlington, R. and Forbes, B. (2007). Paraben transport and metabolism in the biomimetic artificial membrane permeability assay (BAMPA) and 3-day and 21-day Caco-2 cell systems. *J Biomol Screen*. 12 (1):84-91.
- 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. and Prevarskaya, N. (2009). Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (IKCa1) regulate human prostate cancer cell proliferation through a close control of calcium entry. *Oncogene*. 28 (15):1792-806.
- Lamont, K. R. and Tindall, D. J. (2010). Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res*. 107 137-62.
- Lang, F., Foller, M., Lang, K. S., Lang, P. A., Ritter, M., Gulbins, E., Vereninov, A. and Huber, S. M. (2005). Ion channels in cell proliferation and apoptotic cell death. *J Membr Biol*. 205 (3):147-57.
- Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B. and Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 300 (11):1303-10.
- LaPensee, E. W., LaPensee, C. R., Fox, S., Schwemberger, S., Afton, S. and Ben-Jonathan, N. (2010). Bisphenol A and estradiol are equipotent in antagonizing cisplatin-induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Cancer Lett*. 290 (2):167-73.
- Latch, D. E., Packer, J. L., Stender, B. L., VanOverbeke, J., Arnold, W. A. and McNeill, K. (2005). Aqueous photochemistry of triclosan: formation of 2,4-dichlorophenol, 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin, and oligomerization products. *Environ Toxicol Chem*. 24 (3):517-25.
- Lawson, D. A., Zong, Y., Memarzadeh, S., Xin, L., Huang, J. and Witte, O. N. (2010). Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107 (6):2610-5.
- Lee, G., Abdi, K., Jiang, Y., Michaely, P., Bennett, V. and Marszalek, P. E. (2006). Nanospring behaviour of ankyrin repeats. *Nature*. 440 (7081):246-9.
- Lee, H., Suh, B. C. and Kim, K. T. (1997). Feedback regulation of ATP-induced Ca²⁺ signaling in HL-60 cells is mediated by protein kinase A- and C-mediated changes in capacitative Ca²⁺ entry. *J Biol Chem*. 272 (35):21831-8.
- Lee, H. J., Bae, G. U., Leem, Y. E., Choi, H. K., Kang, T. M., Cho, H., Kim, S. T. and Kang, J. S. (2012). Phosphorylation of Stim1 at serine 575 via netrin-2/Cdo-activated ERK1/2 is critical for the promyogenic function of Stim1. *Mol Biol Cell*. 23 (7):1376-87.
- Lee, S., Suk, K., Kim, I. K., Jang, I. S., Park, J. W., Johnson, V. J., Kwon, T. K., Choi, B. J. and Kim, S. H. (2008). Signaling pathways of bisphenol A-induced apoptosis in hippocampal neuronal cells: role of calcium-induced reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB. *J Neurosci Res*. 86 (13):2932-42.

- Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2007). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene*. 26 (52):7380-5.
- Leong, K. G., Wang, B. E., Johnson, L. and Gao, W. Q. (2008). Generation of a prostate from a single adult stem cell. *Nature*. 456 (7223):804-8.
- Lewis, R. S. (2003). Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochem Soc Trans*. 31 (Pt 5):925-9.
- Li, J., Wang, E., Rinaldo, F. and Datta, K. (2005). Upregulation of VEGF-C by androgen depletion: the involvement of IGF-IR-FOXO pathway. *Oncogene*. 24 (35):5510-20.
- Li, J., Cubbon, R. M., Wilson, L. A., Amer, M. S., McKeown, L., Hou, B., Majeed, Y., Tumova, S., Seymour, V. A., Taylor, H., Stacey, M., O'Regan, D., Foster, R., Porter, K. E., Kearney, M. T. and Beech, D. J. (2011). Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ Res*. 108 (10):1190-8.
- Li, W., Llopis, J., Whitney, M., Zlokarnik, G. and Tsien, R. Y. (1998). Cell-permeant caged InsP₃ ester shows that Ca²⁺ spike frequency can optimize gene expression. *Nature*. 392 (6679):936-41.
- Li, X., Zhang, S. and Safe, S. (2006). Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17beta-estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 98 (2-3):122-32.
- Lin, Y. J. (2000). Buccal absorption of triclosan following topical mouthrinse application. *Am J Dent*. 13 (4):215-7.
- Lindstrom, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P. A., Muller, M. D. and Buser, H. R. (2002). Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environ Sci Technol*. 36 (11):2322-9.
- Linja, M. J., Savinainen, K. J., Saramaki, O. R., Tammela, T. L., Vessella, R. L. and Visakorpi, T. (2001). Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*. 61 (9):3550-5.
- Liotta, L. A. and Stetler-Stevenson, W. G. (1990). Metalloproteinases and cancer invasion. *Semin Cancer Biol*. 1 (2):99-106.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr. and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*. 15 (13):1235-41.
- Lishko, P. V., Procko, E., Jin, X., Phelps, C. B. and Gaudet, R. (2007). The ankyrin repeats of TRPV1 bind multiple ligands and modulate channel sensitivity. *Neuron*. 54 (6):905-18.
- Liu, A. Y. and True, L. D. (2002). Characterization of Prostate Cell Types by CD Cell Surface Molecules. *American Journal of Pathology*. 160 (1):36-43.
- Long, X., Burke, K. A., Bigsby, R. M. and Nephew, K. P. (2001). Effects of the xenoestrogen bisphenol A on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the rat. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226 (5):477-83.
- Lopez, E., Jardin, I., Berna-Erro, A., Bermejo, N., Salido, G. M., Sage, S. O., Rosado, J. A. and Redondo, P. C. (2012). STIM1 tyrosine-phosphorylation is required for STIM1-Orai1 association in human platelets. *Cell Signal*. 24 (6):1315-22.
- Losel, R. M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H. C., Rossol-Haseroth, K. and Wehling, M. (2003). Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev*. 83 (3):965-1016.
- Luo, G., Cunningham, M., Kim, S., Burn, T., Lin, J., Sinz, M., Hamilton, G., Rizzo, C., Jolley, S., Gilbert, D., Downey, A., Mudra, D., Graham, R., Carroll, K., Xie, J., Madan, A., Parkinson, A., Christ, D., Selling, B., LeCluyse, E. and Gan, L. S. (2002). CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 30 (7):795-804.

- Lynch, J. and Michalak, M. (2002). Ca²⁺-dependent signaling pathways in the heart: potential drug targets for cardiac disease. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2 (1):1-11.
- Machiels, J. P. and Tombal, B. (2004). Chimiothérapie du cancer prostatique hormonorésistant. *Louvain Médical.* 123 (4):S194-S198
- Macpherson, L. J., Dubin, A. E., Evans, M. J., Marr, F., Schultz, P. G., Cravatt, B. F. and Patapoutian, A. (2007). Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. *Nature.* 445 (7127):541-5.
- Macpherson, P., Kostrominova, T., Tang, H. and Goldman, D. (2002). Protein kinase C and calcium/calmodulin-activated protein kinase II (CaMK II) suppress nicotinic acetylcholine receptor gene expression in mammalian muscle. A specific role for CaMK II in activity-dependent gene expression. *J Biol Chem.* 277 (18):15638-46.
- Macrez, N. and Mironneau, J. (2004). Local Ca²⁺ signals in cellular signalling. *Curr Mol Med.* 4 (3):263-75.
- Mansvelder, H. D. and Kits, K. S. (2000). All classes of calcium channel couple with equal efficiency to exocytosis in rat melanotropes, inducing linear stimulus-secretion coupling. *J Physiol.* 526 Pt 2 327-39.
- Mariot, P., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M. M., Le Bourhis, X., Van Coppenolle, F., Vanoverberghe, K. and Skryma, R. (2000). Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells. *Prostate.* 43 (3):205-14.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M. F. and Prevarskaya, N. (2002). Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 277 (13):10824-33.
- Markey, C. M., Luque, E. H., Munoz De Toro, M., Sonnenschein, C. and Soto, A. M. (2001). In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod.* 65 (4):1215-23.
- Markey, C. M., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Sonnenschein, C. and Soto, A. M. (2005). Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod.* 72 (6):1344-51.
- Marks, P. W. and Maxfield, F. R. (1990). Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol.* 110 (1):43-52.
- Martelli, A. M., Evangelisti, C., Nyakern, M. and Manzoli, F. A. (2006). Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta.* 1761 (5-6):542-51.
- Martineau, I., Lacoste, E. and Gagnon, G. (2004). Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. *Biomaterials.* 25 (18):4489-502.
- Martiny-Baron, G., Kazanietz, M. G., Mischak, H., Blumberg, P. M., Kochs, G., Hug, H., Marme, D. and Schachtele, C. (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem.* 268 (13):9194-7.
- Matsumoto, J., Yokota, H. and Yuasa, A. (2002). Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ Health Perspect.* 110 (2):193-6.
- Matsumura, N., Ishibashi, H., Hirano, M., Nagao, Y., Watanabe, N., Shiratsuchi, H., Kai, T., Nishimura, T., Kashiwagi, A. and Arizono, K. (2005). Effects of nonylphenol and triclosan on production of plasma vitellogenin and testosterone in male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Biol Pharm Bull.* 28 (9):1748-51.
- Matthews, J. B., Twomey, K. and Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol.* 14 (2):149-57.

- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M. and Fanger, C. M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (33):13525-30.
- McNeal, J. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*. 2 (1):35-49.
- Meeker, J. D., Ehrlich, S., Toth, T. L., Wright, D. L., Calafat, A. M., Trisini, A. T., Ye, X. and Hauser, R. (2010). Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary bisphenol A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol*. 30 (4):532-9.
- Mellinger, G. T., Gleason, D. and Bailar, J., 3rd (1967). The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol*. 97 (2):331-7.
- Melzer, D., Rice, N. E., Lewis, C., Henley, W. E. and Galloway, T. S. (2010). Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One*. 5 (1):e8673.
- Mendez, M. G., Kojima, S. and Goldman, R. D. (2010). Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 24 (6):1838-51.
- Mengubas, K., Jabbar, S. A., Nye, K. E., Wilkes, S., Hoffbrand, A. V. and Wickremasinghe, R. G. (1994). Inactivation of calcium ion-regulating inositol polyphosphate second messengers is impaired in subpopulations of human leukemia cells. *Leukemia*. 8 (10):1718-25.
- Mercer, J. C., Dehaven, W. I., Smyth, J. T., Wedel, B., Boyles, R. R., Bird, G. S. and Putney, J. W., Jr. (2006). Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1. *J Biol Chem*. 281 (34):24979-90.
- Meseguer, V., Karashima, Y., Talavera, K., D'Hoedt, D., Donovan-Rodriguez, T., Viana, F., Nilius, B. and Voets, T. (2008). Transient receptor potential channels in sensory neurons are targets of the antimycotic agent clotrimazole. *J Neurosci*. 28 (3):576-86.
- Mestayer, C., Blanchere, M., Jaubert, F., Dufour, B. and Mowszowicz, I. (2003). Expression of androgen receptor coactivators in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines. *Prostate*. 56 (3):192-200.
- Michelangeli, F., Ogunbayo, O. A., Wootton, L. L., Lai, P. F., Al-Mousa, F., Harris, R. M., Waring, R. H. and Kirk, C. J. (2008). Endocrine disrupting alkylphenols: structural requirements for their adverse effects on Ca²⁺ pumps, Ca²⁺ homeostasis & Sertoli TM4 cell viability. *Chem Biol Interact*. 176 (2-3):220-6.
- Michels, G. and Hoppe, U. C. (2008). Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol*. 29 (2):182-98.
- Micke, P. and Ostman, A. (2004). Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy? *Lung Cancer*. 45 Suppl 2 S163-75.
- Mielke, H. and Gundert-Remy, U. (2009). Bisphenol A levels in blood depend on age and exposure. *Toxicol Lett*. 190 (1):32-40.
- Missiaen, L., De Smedt, H., Droogmans, G., Himpens, B. and Casteels, R. (1992). Calcium ion homeostasis in smooth muscle. *Pharmacol Ther*. 56 (2):191-231.
- Miyamoto, K. and Kotake, M. (2006). Estimation of daily bisphenol a intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. *Environ Sci*. 13 (1):15-29.
- Molloy, T. and Van 't Veer, L. J. (2008). Recent advances in metastasis research. *Curr Opin Genet Dev*. 18 (1):35-41.
- Monet, M., Lehen'kyi, V., Gackiere, F., Firlej, V., Vandenberghe, M., Roudbaraki, M., Gkika, D., Pourtier, A., Bidaux, G., Slomianny, C., Delcourt, P., Rassendren, F., Bergerat, J. P., Ceraline, J., Cabon, F., Humez, S. and Prevarskaya, N. (2010). Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res*. 70 (3):1225-35.
- Moran, M. M., McAlexander, M. A., Biro, T. and Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 10 (8):601-20.

- Morera, E., De Petrocellis, L., Morera, L., Moriello, A. S., Nalli, M., Di Marzo, V. and Ortar, G. (2012). Synthesis and biological evaluation of [6]-gingerol analogues as transient receptor potential channel TRPV1 and TRPA1 modulators. *Bioorg Med Chem Lett.* 22 (4):1674-7.
- Morton, R. A., Jr. and Isaacs, W. B. (1998). Molecular genetics of prostate cancer: clinical applications. *J Natl Med Assoc.* 90 (11 Suppl):S728-31.
- Mukhopadhyay, S., Munshi, H. G., Kambhampati, S., Sassano, A., Platanius, L. C. and Stack, M. S. (2004). Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J Biol Chem.* 279 (32):33139-46.
- Munaron, L., Antoniotti, S., Fiorio Pla, A. and Lovisolo, D. (2004a). Blocking Ca²⁺-entry: a way to control cell proliferation. *Curr Med Chem.* 11 (12):1533-43.
- Munaron, L., Antoniotti, S. and Lovisolo, D. (2004b). Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J Cell Mol Med.* 8 (2):161-8.
- Murphy, D. G., Kerger, M., Crowe, H., Peters, J. S. and Costello, A. J. (2009). Operative details and oncological and functional outcome of robotic-assisted laparoscopic radical prostatectomy: 400 cases with a minimum of 12 months follow-up. *Eur Urol.* 55 (6):1358-66.
- Nagata, K., Duggan, A., Kumar, G. and Garcia-Anoveros, J. (2005). Nociceptor and hair cell transducer properties of TRPA1, a channel for pain and hearing. *J Neurosci.* 25 (16):4052-61.
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K. and Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Res.* 40 (17):3297-303.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260 (5554):799-802.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. and Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science.* 270 (5236):633-7.
- Nesaretnam, K., Hales, E., Sohail, M., Krausz, T. and Darbre, P. (1998). 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) can enhance DMBA-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Eur J Cancer.* 34 (3):389-93.
- Ngan, S., Stronach, E. A., Photiou, A., Waxman, J., Ali, S. and Buluwela, L. (2009). Microarray coupled to quantitative RT-PCR analysis of androgen-regulated genes in human LNCaP prostate cancer cells. *Oncogene.* 28 (19):2051-63.
- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N. and Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol.* 18 (6):803-11.
- Nilius, B., Prenen, J. and Owsianik, G. (2011). Irritating channels: the case of TRPA1. *J Physiol.* 589 (Pt 7):1543-9.
- Nishiyama, M., Hoshino, A., Tsai, L., Henley, J. R., Goshima, Y., Tessier-Lavigne, M., Poo, M. M. and Hong, K. (2003). Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature.* 423 (6943):990-5.
- Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature.* 334 (6184):661-5.
- Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* 258 (5082):607-14.
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2005). TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest.* 115 (9):2393-401.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., Van Look, K. J. and Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of

- the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 364 (1526):2047-62.
- Ogunbayo, O. A., Lai, P. F., Connolly, T. J. and Michelangeli, F. (2008). Tetrabromobisphenol A (TBBPA), induces cell death in TM4 Sertoli cells by modulating Ca²⁺ transport proteins and causing dysregulation of Ca²⁺ homeostasis. *Toxicol In Vitro.* 22 (4):943-52.
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S. and Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nat Immunol.* 9 (4):432-43.
- Oh, W. K. and Kantoff, P. W. (1998). Management of hormone refractory prostate cancer: current standards and future prospects. *J Urol.* 160 (4):1220-9.
- Ojuka, E. O., Jones, T. E., Han, D. H., Chen, M., Wamhoff, B. R., Sturek, M. and Holloszy, J. O. (2002). Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283 (5):E1040-5.
- Ojuka, E. O., Jones, T. E., Han, D. H., Chen, M. and Holloszy, J. O. (2003). Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.* 17 (6):675-81.
- Okada, H., Tokunaga, T., Liu, X., Takayanagi, S., Matsushima, A. and Shimohigashi, Y. (2008). Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect.* 116 (1):32-8.
- Oliveira, R., Domingues, I., Koppe Grisolia, C. and Soares, A. M. (2009). Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults. *Environ Sci Pollut Res Int.* 16 (6):679-88.
- Orr, B., Riddick, A. C., Stewart, G. D., Anderson, R. A., Franco, O. E., Hayward, S. W. and Thomson, A. A. (2012). Identification of stromally expressed molecules in the prostate by tag-profiling of cancer-associated fibroblasts, normal fibroblasts and fetal prostate. *Oncogene.* 31 (9):1130-42.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S. and Stuhmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* 18 (20):5540-7.
- Parekh, A. B. and Penner, R. (1995). Depletion-activated calcium current is inhibited by protein kinase in RBL-2H3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (17):7907-11.
- Parekh, A. B. and Penner, R. (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev.* 77 (4):901-30.
- Parekh, A. B. and Putney, J. W., Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev.* 85 (2):757-810.
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K. C., Dolmetsch, R. E. and Lewis, R. S. (2009a). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell.* 136 (5):876-90.
- Park, S. H., Kim, K. Y., An, B. S., Choi, J. H., Jeung, E. B., Leung, P. C. and Choi, K. C. (2009b). Cell growth of ovarian cancer cells is stimulated by xenoestrogens through an estrogen-dependent pathway, but their stimulation of cell growth appears not to be involved in the activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and p38. *J Reprod Dev.* 55 (1):23-9.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55 (2):74-108.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D. L., Beck, A., Nadler, M. J., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R. and Kinet, J. P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol.* 8 (7):771-3.
- Perencevich, E. N., Wong, M. T. and Harris, A. D. (2001). National and regional assessment of the antibacterial soap market: a step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. *Am J Infect Control.* 29 (5):281-3.

- Pessah, I. N., Waterhouse, A. L. and Casida, J. E. (1985). The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 128 (1):449-56.
- Petersen, C. C. and Berridge, M. J. (1994). The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 269 (51):32246-53.
- Peterziel, H., Mink, S., Schonert, A., Becker, M., Klocker, H. and Cato, A. C. (1999). Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene.* 18 (46):6322-9.
- Pettit, E. J. and Fay, F. S. (1998). Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiol Rev.* 78 (4):949-67.
- Pirard, C., Sagot, C., Deville, M., Dubois, N. and Charlier, C. (2012). Urinary levels of bisphenol A, triclosan and 4-nonylphenol in a general Belgian population. *Environ Int.* 48C 78-83.
- Placencio, V. R., Sharif-Afshar, A. R., Li, X., Huang, H., Uwamariya, C., Neilson, E. G., Shen, M. M., Matusik, R. J., Hayward, S. W. and Bhowmick, N. A. (2008). Stromal transforming growth factor-beta signaling mediates prostatic response to androgen ablation by paracrine Wnt activity. *Cancer Res.* 68 (12):4709-18.
- Pollak, M., Beamer, W. and Zhang, J. C. (1998). Insulin-like growth factors and prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 17 (4):383-90.
- Porter, V. A., Bonev, A. D., Knot, H. J., Heppner, T. J., Stevenson, A. S., Kleppisch, T., Lederer, W. J. and Nelson, M. T. (1998). Frequency modulation of Ca²⁺ sparks is involved in regulation of arterial diameter by cyclic nucleotides. *Am J Physiol.* 274 (5 Pt 1):C1346-55.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I. and West, A. B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol.* 277 (1 Pt 1):C1-9.
- Pozo-Guisado, E., Campbell, D. G., Deak, M., Alvarez-Barrientos, A., Morrice, N. A., Alvarez, I. S., Alessi, D. R. and Martin-Romero, F. J. (2010). Phosphorylation of STIM1 at ERK1/2 target sites modulates store-operated calcium entry. *J Cell Sci.* 123 (Pt 18):3084-93.
- Prensner, J. R., Rubin, M. A., Wei, J. T. and Chinnaiyan, A. M. (2012). Beyond PSA: the next generation of prostate cancer biomarkers. *Sci Transl Med.* 4 (127):127rv3.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Vacher, P., Daniel, N., Bignon, C., Djiane, J. and Dufy, B. (1994). Early effects of PRL on ion conductances in CHO cells expressing PRL receptor. *Am J Physiol.* 267 (2 Pt 1):C554-62.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., Bidaux, G., Flourakis, M. and Shuba, Y. (2007). Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 14 (7):1295-304.
- Prevarskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat Rev Cancer.* 11 (8):609-18.
- Prevarskaya, N. B., Skryma, R. N., Vacher, P., Daniel, N., Djiane, J. and Dufy, B. (1995). Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 270 (41):24292-9.
- Prins, G. S., Tang, W. Y., Belmonte, J. and Ho, S. M. (2008). Developmental exposure to bisphenol A increases prostate cancer susceptibility in adult rats: epigenetic mode of action is implicated. *Fertil Steril.* 89 (2 Suppl):e41.
- Pronzato, P. and Rondini, M. (2005). Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol.* 16 Suppl 4 iv80-84.
- Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M. F., De Francesco, E. M., Abonante, S., Rosano, C. and Maggiolini, M. (2012). Bisphenol A Induces Gene Expression Changes and Proliferative Effects through GPER in Breast Cancer Cells and Cancer-Associated Fibroblasts. *Environ Health Perspect.* 120 (8):1177-82.
- Putney, J. W., Jr., Broad, L. M., Braun, F. J., Lievremont, J. P. and Bird, G. S. (2001). Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci.* 114 (Pt 12):2223-9.

- Queckenberg, C., Meins, J., Wachall, B., Doroshenko, O., Tomalik-Scharte, D., Bastian, B., Abdel-Tawab, M. and Fuhr, U. (2010). Absorption, pharmacokinetics, and safety of triclosan after dermal administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 54 (1):570-2.
- Queiroz, T. M., Machado, N. T., Furtado, F. F., Oliveira-Filho, A. A., Alustau, M. C., Figueiredo, C. S., Miranda, G. E., Barbosa-Filho, J. M., Braga, V. A. and Medeiros, I. A. (2011). Vasorelaxation, induced by *Dictyota pulchella* (Dictyotaceae), a brown alga, is mediated via inhibition of calcium influx in rats. *Mar Drugs.* 9 (10):2075-88.
- Quesada, I., Fuentes, E., Viso-Leon, M. C., Soria, B., Ripoll, C. and Nadal, A. (2002). Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J.* 16 (12):1671-3.
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Costabel, L., Munoz-De-Toro, M. and Luque, E. H. (2003). Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology.* 144 (7):3206-15.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 414 (6859):105-11.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302 (5651):1704-9.
- Roderick, H. L. and Cook, S. J. (2008). Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer.* 8 (5):361-75.
- Roudbaraki, M., Lorsignol, A., Langouche, L., Callewaert, G., Vankelecom, H. and Denef, C. (1999). Target cells of gamma3-melanocyte-stimulating hormone detected through intracellular Ca²⁺ responses in immature rat pituitary constitute a fraction of all main pituitary cell types, but mostly express multiple hormone phenotypes at the messenger ribonucleic acid level. Refractoriness to melanocortin-3 receptor blockade in the lactosomatotroph lineage. *Endocrinology.* 140 (10):4874-85.
- Rowley, D. and Barron, D. A. (2012). The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.*
- Rozengurt, E. (1992). Growth factors and cell proliferation. *Curr Opin Cell Biol.* 4 (2):161-5.
- Russell, A. D. (2004). Whither triclosan? *J Antimicrob Chemother.* 53 (5):693-5.
- Russell, P. J., Bennett, S. and Stricker, P. (1998). Growth factor involvement in progression of prostate cancer. *Clin Chem.* 44 (4):705-23.
- Sabaliunas, D., Webb, S. F., Hauk, A., Jacob, M. and Eckhoff, W. S. (2003). Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Res.* 37 (13):3145-54.
- Sabino, M. A. and Mantyh, P. W. (2005). Pathophysiology of bone cancer pain. *J Support Oncol.* 3 (1):15-24.
- Sadofsky, L. R., Campi, B., Trevisani, M., Compton, S. J. and Morice, A. H. (2008). Transient receptor potential vanilloid-1-mediated calcium responses are inhibited by the alkylamine antihistamines dexbrompheniramine and chlorpheniramine. *Exp Lung Res.* 34 (10):681-93.
- Sadofsky, L. R., Boa, A. N., Maher, S. A., Birrell, M. A., Belvisi, M. G. and Morice, A. H. (2011). TRPA1 is activated by direct addition of cysteine residues to the N-hydroxysuccinyl esters of acrylic and cinnamic acids. *Pharmacol Res.* 63 (1):30-6.
- Saidak, Z., Boudot, C., Abdoune, R., Petit, L., Brazier, M., Mentaverri, R. and Kamel, S. (2009). Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp Cell Res.* 315 (12):2072-80.
- Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Aoki, Y., Yonemoto, J. and Tohyama, C. (2001). Bisphenol-A Affects Spermatogenesis in the Adult Rat Even at a Low Dose. *J Occup Health.* 43 185-190.

- Samuelsen, M., Olsen, C., Holme, J. A., Meussen-Elholm, E., Bergmann, A. and Hongslo, J. K. (2001). Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biol Toxicol.* 17 (3):139-51.
- Sanda, M. G., Beaty, T. H., Stutzman, R. E., Childs, B. and Walsh, P. C. (1994). GENETIC SUSCEPTIBILITY OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA. *Journal of Urology.* 152 (1):115-119.
- Sawai, C., Anderson, K. and Walser-Kuntz, D. (2003). Effect of bisphenol A on murine immune function: modulation of interferon-gamma, IgG2a, and disease symptoms in NZB X NZW F1 mice. *Environ Health Perspect.* 111 (16):1883-7.
- Schaff, U. Y., Dixit, N., Procyk, E., Yamayoshi, I., Tse, T. and Simon, S. I. (2010). Orai1 regulates intracellular calcium, arrest, and shape polarization during neutrophil recruitment in shear flow. *Blood.* 115 (3):657-66.
- Schauer, I. G., Ressler, S. J., Tuxhorn, J. A., Dang, T. D. and Rowley, D. R. (2008). Elevated epithelial expression of interleukin-8 correlates with myofibroblast reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 72 (1):205-13.
- Schauer, I. G. and Rowley, D. R. (2011). The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 82 (4-5):200-10.
- Scherer, G. (2005). Biomonitoring of inhaled complex mixtures--ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 57 Suppl 1 75-110.
- Schroder, F., Crawford, E. D., Axcrone, K., Payne, H. and Keane, T. E. (2012). Androgen deprivation therapy: past, present and future. *BJU Int.* 109 Suppl 6 1-12.
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B. and Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127 (3-5):204-15.
- Schuur, A. G., Legger, F. F., van Meeteren, M. E., Moonen, M. J., van Leeuwen-Bol, I., Bergman, A., Visser, T. J. and Brouwer, A. (1998). In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol.* 11 (9):1075-81.
- Serkova, N. J., Gamito, E. J., Jones, R. H., O'Donnell, C., Brown, J. L., Green, S., Sullivan, H., Hedlund, T. and Crawford, E. D. (2008). The metabolites citrate, myo-inositol, and spermine are potential age-independent markers of prostate cancer in human expressed prostatic secretions. *Prostate.* 68 (6):620-8.
- Séronie-Vivien, S. (2005). Biologie de la transition vers l'hormonorésistance des cancers de la prostate. *Oncologie.* 7 391-396.
- Séronie-Vivien, S. and Rambeaud, J. J. (2006). Biologie de la transition des cancers de la prostate vers l'hormono-résistance : mécanismes et implications thérapeutiques. *Progrès en Urologie.* 16 675-680.
- Shen, M. M. and Abate-Shen, C. (2007). Pten inactivation and the emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 67 (14):6535-8.
- Shintani, Y., Wheelock, M. J. and Johnson, K. R. (2006). Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 17 (7):2963-75.
- Shou, Y., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J. L. and Isom, G. E. (2004). Calcineurin-mediated Bad translocation regulates cyanide-induced neuronal apoptosis. *Biochem J.* 379 (Pt 3):805-13.
- Shuttleworth, T. J. (1997). Intracellular Ca²⁺ signalling in secretory cells. *J Exp Biol.* 200 (Pt 2):303-14.
- Signoretti, S. and Loda, M. (2007). Prostate stem cells: from development to cancer. *Semin Cancer Biol.* 17 (3):219-24.
- Silins, I. and Hogberg, J. (2011). Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. *Int J Environ Res Public Health.* 8 (3):629-47.

- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K. and Detmar, M. (2001). Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med.* 7 (2):192-8.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X. L., Coppenolle, F. V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B. and Prevarskaya, N. (2000). Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol.* 527 Pt 1 71-83.
- Smyth, J. T., Petranka, J. G., Boyles, R. R., DeHaven, W. I., Fukushima, M., Johnson, K. L., Williams, J. G. and Putney, J. W., Jr. (2009). Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol.* 11 (12):1465-72.
- Soboloff, J., Spassova, M. A., Hewavitharana, T., He, L. P., Xu, W., Johnstone, L. S., Dziadek, M. A. and Gill, D. L. (2006). STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry. *Curr Biol.* 16 (14):1465-70.
- Socci, R., Chu, A., Reinach, P. and Meszaros, L. G. (1993). In situ Ca(2+)-induced Ca²⁺ release from a ryanodine-sensitive intracellular Ca²⁺ store in corneal epithelial cells. *Comp Biochem Physiol B.* 106 (4):793-7.
- Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Novials, A., Muhammed, S. J., Salehi, A., Gustafsson, J. A., Quesada, I. and Nadal, A. (2012). Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PLoS One.* 7 (2):e31109.
- Sorrentino, V. and Volpe, P. (1993). Ryanodine receptors: how many, where and why? *Trends Pharmacol Sci.* 14 (3):98-103.
- Sotomayor, M., Corey, D. P. and Schulten, K. (2005). In search of the hair-cell gating spring elastic properties of ankyrin and cadherin repeats. *Structure.* 13 (4):669-82.
- Spanel, P., Smith, D., Holland, T. A., Al Singary, W. and Elder, J. B. (1999). Analysis of formaldehyde in the headspace of urine from bladder and prostate cancer patients using selected ion flow tube mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 13 (14):1354-9.
- Stacewicz-Sapuntzakis, M., Borthakur, G., Burns, J. L. and Bowen, P. E. (2008). Correlations of dietary patterns with prostate health. *Mol Nutr Food Res.* 52 (1):114-30.
- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T. and Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere.* 36 (10):2149-73.
- Stephan, C., Jung, K., Diamandis, E. P., Rittenhouse, H. G., Lein, M. and Loening, S. A. (2002). Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer. *Urology.* 59 (1):2-8.
- Stetler-Stevenson, W. G., Kruttsch, H. C. and Liotta, L. A. (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem.* 264 (29):17374-8.
- Stokes, A., Wakano, C., Koblan-Huberson, M., Adra, C. N., Fleig, A. and Turner, H. (2006). TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal.* 18 (10):1584-94.
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S. and Patapoutian, A. (2003). ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell.* 112 (6):819-29.
- Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Sonta, S., Makino, T. and Suzumori, K. (2005). Exposure to bisphenol A is associated with recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 20 (8):2325-9.
- Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K. and Mori, Y. (2008). Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators. *Channels (Austin).* 2 (4):287-98.

- Takai, Y., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Kamei, Y., Osuga, Y., Yano, T. and Taketan, Y. (2001). Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reprod Toxicol.* 15 (1):71-4.
- Tamaoki, M., Imanaka-Yoshida, K., Yokoyama, K., Nishioka, T., Inada, H., Hiroe, M., Sakakura, T. and Yoshida, T. (2005). Tenascin-C regulates recruitment of myofibroblasts during tissue repair after myocardial injury. *Am J Pathol.* 167 (1):71-80.
- Tamura, I., Saito, M., Nishimura, Y., Satoh, M., Yamamoto, H. and Oyama, Y. (2011). Elevation of intracellular Ca²⁺ level by Triclosan in rat thymic lymphocytes: increase in membrane Ca²⁺ permeability and induction of intracellular Ca²⁺ release. *Journal of Health Science.* 57 (6):540-546.
- Tang, H., Macpherson, P., Argetsinger, L. S., Cieslak, D., Suhr, S. T., Carter-Su, C. and Goldman, D. (2004). CaM kinase II-dependent phosphorylation of myogenin contributes to activity-dependent suppression of nAChR gene expression in developing rat myotubes. *Cell Signal.* 16 (5):551-63.
- Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K. and Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ Sci.* 11 (2):133-40.
- Taylor, R. A., Toivanen, R. and Risbridger, G. P. (2010). Stem cells in prostate cancer: treating the root of the problem. *Endocr Relat Cancer.* 17 (4):R273-85.
- Thiery, J. P. and Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7 (2):131-42.
- Thomas, P. and Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102 (1-5):175-9.
- Thompson, A., Griffin, P., Stuetz, R. and Cartmell, E. (2005). The fate and removal of triclosan during wastewater treatment. *Water Environ Res.* 77 (1):63-7.
- Thorndike, J. and Beck, W. S. (1977). Production of formaldehyde from N5-methyltetrahydrofolate by normal and leukemic leukocytes. *Cancer Res.* 37 (4):1125-32.
- Thorpe, J. F., Jain, S., Marczyklo, T. H., Gescher, A. J., Steward, W. P. and Mellon, J. K. (2007). A review of phase III clinical trials of prostate cancer chemoprevention. *Ann R Coll Surg Engl.* 89 (3):207-11.
- Timms, B. G., Howdeshell, K. L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C. A. and vom Saal, F. S. (2005). Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102 (19):7014-9.
- Tombal, B. and Van Cangh, P. J. (2001). TRAITEMENT DU CANCER DE LA PROSTATE: NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES. *LOUVAIN MED.* 120 77-86.
- Trevisani, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D. M., Nassini, R., Campi, B., Imamachi, N., Andre, E., Patacchini, R., Cottrell, G. S., Gatti, R., Basbaum, A. I., Bunnett, N. W., Julius, D. and Geppetti, P. (2007). 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104 (33):13519-24.
- Tsai, W. T. (2006). Human health risk on environmental exposure to Bisphenol-A: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 24 (2):225-55.
- Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S. and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res.* 61 (9):3760-9.
- Tsien, R. Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* 19 (11):2396-404.

- Tsien, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T. J. (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol.* 94 (2):325-34.
- Tsurusaki, T., Kanda, S., Sakai, H., Kanetake, H., Saito, Y., Alitalo, K. and Koji, T. (1999). Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 80 (1-2):309-13.
- Tulp, M. T., Sundstrom, G., Martron, L. B. and Hutzinger, O. (1979). Metabolism of chlorodiphenyl ethers and Irganox DP 300. *Xenobiotica.* 9 (2):65-77.
- Tuxhorn, J. A., Ayala, G. E. and Rowley, D. R. (2001). Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol.* 166 (6):2472-83.
- Tuxhorn, J. A., Ayala, G. E., Smith, M. J., Smith, V. C., Dang, T. D. and Rowley, D. R. (2002). Reactive stroma in human prostate cancer: induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res.* 8 (9):2912-23.
- Vali, S., Carlsen, R., Pessah, I. and Gorin, F. (2000). Role of the sarcoplasmic reticulum in regulating the activity-dependent expression of the glycogen phosphorylase gene in contractile skeletal muscle cells. *J Cell Physiol.* 185 (2):184-99.
- Van Coppenolle, F., Skryma, R., Ouadid-Ahidouch, H., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Humez, S., Crepin, A., Gourdou, I., Djiane, J., Bonnal, J. L., Mauroy, B. and Prevarskaya, N. (2004). Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and K⁺ channel activation. *Biochem J.* 377 (Pt 3):569-78.
- van der Heul-Nieuwenhuijsen, L., Hendriksen, P. J., van der Kwast, T. H. and Jenster, G. (2006). Gene expression profiling of the human prostate zones. *BJU Int.* 98 (4):886-97.
- van Leenders, G., Dijkman, H., Hulsbergen-van de Kaa, C., Ruiten, D. and Schalken, J. (2000). Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Lab Invest.* 80 (8):1251-8.
- van Leenders, G. J. and Schalken, J. A. (2003). Epithelial cell differentiation in the human prostate epithelium: implications for the pathogenesis and therapy of prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 46 Suppl S3-10.
- Vanden Abeele, F., Skryma, R., Shuba, Y., Van Coppenolle, F., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Mauroy, B., Wuytack, F. and Prevarskaya, N. (2002). Bcl-2-dependent modulation of Ca²⁺ homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell.* 1 (2):169-79.
- Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003a). Store-operated Ca²⁺ current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca²⁺ transporter type 1. *J Biol Chem.* 278 (17):15381-9.
- Vanden Abeele, F., Shuba, Y., Roudbaraki, M., Lemonnier, L., Vanoverberghe, K., Mariot, P., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2003b). Store-operated Ca²⁺ channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium.* 33 (5-6):357-73.
- Vanden Abeele, F., Lemonnier, L., Thebault, S., Lepage, G., Parys, J. B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004). Two types of store-operated Ca²⁺ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem.* 279 (29):30326-37.
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S. and Soto, A. M. (2009). Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev.* 30 (1):75-95.
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J. and Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 118 (8):1055-70.

- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J. and Schoenfelder, G. (2012). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Cien Saude Colet.* 17 (2):407-34.
- Vandenbos, F., Chevallier, D. and Michiels, J. F. (2004). Cancers de la prostate : classification histopathologique. *Oncologie.* 6 385-393.
- Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R. and Prevarskaya, N. (2004). Ca²⁺ homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 11 (3):321-30.
- Vanoverberghe, K., Lehen'kyi, V., Thebault, S., Raphael, M., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Mariot, P. and Prevarskaya, N. (2012). Cytoskeleton reorganization as an alternative mechanism of store-operated calcium entry control in neuroendocrine-differentiated cells. *PLoS One.* 7 (9):e45615.
- Varnai, P., Hunyady, L. and Balla, T. (2009). STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry. *Trends Pharmacol Sci.* 30 (3):118-28.
- Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D. J., Gunderson, M. P., Van Aggelen, G. and Helbing, C. C. (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat Toxicol.* 80 (3):217-27.
- Velupillai, P., Sung, C. K., Tian, Y., Dahl, J., Carroll, J., Bronson, R. and Benjamin, T. (2010). Polyoma virus-induced osteosarcomas in inbred strains of mice: host determinants of metastasis. *PLoS Pathog.* 6 (1):e1000733.
- Venkatachalam, K. and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 76 387-417.
- Verhagen, A. P., Ramaekers, F. C., Aalders, T. W., Schaafsma, H. E., Debruyne, F. M. and Schalken, J. A. (1992). Colocalization of basal and luminal cell-type cytokeratins in human prostate cancer. *Cancer Res.* 52 (22):6182-7.
- Vis, A. N. and Schroder, F. H. (2009). Key targets of hormonal treatment of prostate cancer. Part 2: the androgen receptor and 5alpha-reductase. *BJU Int.* 104 (9):1191-7.
- Vo, T. T., Jung, E. M., Choi, K. C., Yu, F. H. and Jeung, E. B. (2011). Estrogen receptor alpha is involved in the induction of Calbindin-D(9k) and progesterone receptor by parabens in GH3 cells: a biomarker gene for screening xenoestrogens. *Steroids.* 76 (7):675-81.
- Volkel, W., Bittner, N. and Dekant, W. (2005). Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos.* 33 (11):1748-57.
- Volkel, W., Kiranoglu, M. and Fromme, H. (2008). Determination of free and total bisphenol A in human urine to assess daily uptake as a basis for a valid risk assessment. *Toxicol Lett.* 179 (3):155-62.
- vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., Farabollini, F., Guillette, L. J., Jr., Hauser, R., Heindel, J. J., Ho, S. M., Hunt, P. A., Iguchi, T., Jobling, S., Kanno, J., Keri, R. A., Knudsen, K. E., Laufer, H., LeBlanc, G. A., Marcus, M., McLachlan, J. A., Myers, J. P., Nadal, A., Newbold, R. R., Olea, N., Prins, G. S., Richter, C. A., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Talsness, C. E., Vandenberg, J. G., Vandenberg, L. N., Walser-Kuntz, D. R., Watson, C. S., Welshons, W. V., Wetherill, Y. and Zoeller, R. T. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol.* 24 (2):131-8.
- Wadhwa, S., Wadhwa, P., Dinda, A. K. and Gupta, N. P. (2009). Differential expression of potassium ion channels in human renal cell carcinoma. *Int Urol Nephrol.* 41 (2):251-7.

- Walsh, D. E., Dockery, P. and Doolan, C. M. (2005). Estrogen receptor independent rapid non-genomic effects of environmental estrogens on $[Ca^{2+}]_i$ in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 230 (1-2):23-30.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F. and Reed, J. C. (1999). Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* 284 (5412):339-43.
- Wang, S. and El-Deiry, W. S. (2004). Cytochrome c: a crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis. *Cancer Biol Ther.* 3 (1):44-6.
- Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2008). Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain.* 131 (Pt 5):1241-51.
- Wang, X., Kruithof-de Julio, M., Economides, K. D., Walker, D., Yu, H., Halili, M. V., Hu, Y. P., Price, S. M., Abate-Shen, C. and Shen, M. M. (2009). A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature.* 461 (7263):495-500.
- Wang, Y. Z. and Wong, Y. C. (1997). Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer: a review. *Urol Oncol.* 3 (2):41-6.
- Watanabe, H., Suzuki, A., Kobayashi, M., Lubahn, D. B., Handa, H. and Iguchi, T. (2003). Similarities and differences in uterine gene expression patterns caused by treatment with physiological and non-physiological estrogens. *J Mol Endocrinol.* 31 (3):487-97.
- Watson, C. S., Bulayeva, N. N., Wozniak, A. L. and Finnerty, C. C. (2005). Signaling from the membrane via membrane estrogen receptor- α : estrogens, xenoestrogens, and phytoestrogens. *Steroids.* 70 (5-7):364-71.
- Watson, C. S., Bulayeva, N. N., Wozniak, A. L. and Alyea, R. A. (2007). Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses. *Steroids.* 72 (2):124-34.
- Webb, D. J., Parsons, J. T. and Horwitz, A. F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol.* 4 (4):E97-100.
- Wei, C., Wang, X., Zheng, M. and Cheng, H. (2012). Calcium gradients underlying cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 24 (2):254-61.
- Welgus, H. G., Stricklin, G. P., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Cooney, R. V. and Jeffrey, J. J. (1979). A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J Biol Chem.* 254 (6):1938-43.
- Welshons, W. V., Thayer, K. A., Judy, B. M., Taylor, J. A., Curran, E. M. and vom Saal, F. S. (2003). Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect.* 111 (8):994-1006.
- Welshons, W. V., Nagel, S. C. and vom Saal, F. S. (2006). Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology.* 147 (6 Suppl):S56-69.
- Wernert, N. (1997). The multiple roles of tumour stroma. *Virchows Arch.* 430 (6):433-43.
- West, R. B. and van de Rijn, M. (2007). Experimental approaches to the study of cancer-stroma interactions: recent findings suggest a pivotal role for stroma in carcinogenesis. *Lab Invest.* 87 (10):967-70.
- Wetherill, Y. B., Petre, C. E., Monk, K. R., Puga, A. and Knudsen, K. E. (2002). The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 1 (7):515-24.
- Wetherill, Y. B., Fisher, N. L., Staubach, A., Danielsen, M., de Vere White, R. W. and Knudsen, K. E. (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Res.* 65 (1):54-65.
- Wetherill, Y. B., Hess-Wilson, J. K., Comstock, C. E., Shah, S. A., Buncher, C. R., Sallans, L., Limbach, P. A., Schwemberger, S., Babcock, G. F. and Knudsen, K. E. (2006). Bisphenol A

- facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 5 (12):3181-90.
- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T. and Belcher, S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 24 (2):178-98.
- Whang, Y. E., Wu, X., Suzuki, H., Reiter, R. E., Tran, C., Vessella, R. L., Said, J. W., Isaacs, W. B. and Sawyers, C. L. (1998). Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (9):5246-50.
- Whitehead, S. A. and Rice, S. (2006). Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 20 (1):45-61.
- Whittemore, A. S., Kolonel, L. N., Wu, A. H., John, E. M., Gallagher, R. P., Howe, G. R., Burch, J. D., Hankin, J., Dreon, D. M., West, D. W. and et al. (1995). Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst.* 87 (9):652-61.
- Wilson, N. K., Chuang, J. C., Morgan, M. K., Lordo, R. A. and Sheldon, L. S. (2007). An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res.* 103 (1):9-20.
- Wiseman, B. S. and Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science.* 296 (5570):1046-9.
- Wolff, J. M. and Mason, M. (2012). Drivers for change in the management of prostate cancer - guidelines and new treatment techniques. *BJU Int.* 109 Suppl 6 33-41.
- Wonderlin, W. F. and Strobl, J. S. (1996). Potassium channels, proliferation and G1 progression. *J Membr Biol.* 154 (2):91-107.
- Wong, Y. C. and Wang, Y. Z. (2000). Growth factors and epithelial-stromal interactions in prostate cancer development. *Int Rev Cytol.* 199 65-116.
- Wozniak, A. L., Bulayeva, N. N. and Watson, C. S. (2005). Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect.* 113 (4):431-9.
- Wu, F., Khan, S., Wu, Q., Barhoumi, R., Burghardt, R. and Safe, S. (2008). Ligand structure-dependent activation of estrogen receptor alpha/Sp by estrogens and xenoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 110 (1-2):104-15.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M. and Lewis, R. S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol.* 174 (6):803-13.
- Yang, R. M., Naitoh, J., Murphy, M., Wang, H. J., Phillipson, J., deKernion, J. B., Loda, M. and Reiter, R. E. (1998). Low p27 expression predicts poor disease-free survival in patients with prostate cancer. *J Urol.* 159 (3):941-5.
- Yang, S. and Huang, X. Y. (2005). Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem.* 280 (29):27130-7.
- Yang, S., Zhang, J. J. and Huang, X. Y. (2009a). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell.* 15 (2):124-34.
- Yang, Y. J., Hong, Y. C., Oh, S. Y., Park, M. S., Kim, H., Leem, J. H. and Ha, E. H. (2009b). Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women. *Environ Res.* 109 (6):797-801.
- Yegnasubramanian, S., Kowalski, J., Gonzalzo, M. L., Zahurak, M., Piantadosi, S., Walsh, P. C., Bova, G. S., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B. and Nelson, W. G. (2004). Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res.* 64 (6):1975-86.

- Yoshino, S., Yamaki, K., Yanagisawa, R., Takano, H., Hayashi, H. and Mori, Y. (2003). Effects of bisphenol A on antigen-specific antibody production, proliferative responses of lymphoid cells, and TH1 and TH2 immune responses in mice. *Br J Pharmacol.* 138 (7):1271-6.
- Yoshino, S., Yamaki, K., Li, X., Sai, T., Yanagisawa, R., Takano, H., Taneda, S., Hayashi, H. and Mori, Y. (2004). Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunology.* 112 (3):489-95.
- Yueh, M. F., Li, T., Evans, R. M., Hammock, B. and Tukey, R. H. (2012). Triclocarban mediates induction of xenobiotic metabolism through activation of the constitutive androstane receptor and the estrogen receptor alpha. *PLoS One.* 7 (6):e37705.
- Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S. and Perdu, E. (2011). Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere.* 82 (3):424-30.
- Zare, L., Esmaeili-Mahani, S., Abbasnejad, M., Rasouljan, B., Sheibani, V., Sahraei, H. and Kaeidi, A. (2012). Oleuropein, Chief Constituent of Olive Leaf Extract, Prevents the Development of Morphine Antinociceptive Tolerance through Inhibition of Morphine-induced L-type Calcium Channel Overexpression. *Phytother Res.* 26 (11):1731-7.
- Zerbib, M. and Conquy, S. (2001) *La Prostate.* Editions Doin.
- Zhao, F., Li, P., Chen, S. R., Louis, C. F. and Fruen, B. R. (2001). Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem.* 276 (17):13810-6.
- Zorrilla, L. M., Gibson, E. K., Jeffay, S. C., Crofton, K. M., Setzer, W. R., Cooper, R. L. and Stoker, T. E. (2009). The effects of triclosan on puberty and thyroid hormones in male Wistar rats. *Toxicol Sci.* 107 (1):56-64.
- Zurborg, S., Yurgionas, B., Jira, J. A., Caspani, O. and Heppenstall, P. A. (2007). Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* 10 (3):277-9.