

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

**Rôle du canal calcique de type T, $Ca_v3.2$ et
de ses protéines partenaires dans la
tumorigenèse prostatique**

Thèse codirigée par le Docteur Pascal Mariot et le Professeur Morad Roudbaraki

présentée et soutenue publiquement par

Marine Warnier

Le jeudi 19 décembre 2013

Membres du jury :

Dr Legrand Dominique, Directeur de recherche CNRS, Lille
Pr Fabrice Matifat, Professeur d'Université, Amiens
Dr Olivier Soriani, Maître de conférences, Nice
Pr Marc Mesnil, Professeur d'Université, Poitiers
Pr Morad Roudbaraki, Professeur d'Université, Lille
Dr Pascal Mariot, Maître de conférences, Lille

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Thèse réalisée au sein du laboratoire du Physiologie cellulaire, Inserm U1003
Villeneuve d'Ascq

Résumé

Le cancer de la prostate, troisième cause de mortalité par cancer chez l'homme en Europe, est dépendant des androgènes dans les premiers stades de la maladie. Cependant, après une première phase de la maladie sensible à la privation en androgènes circulants, il se produit un échappement thérapeutique conduisant à un cancer androgéno-réfractaire. Cette progression du cancer vers l'androgéno-indépendance s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules neuroendocrines, cellules surexprimant des canaux calciques voltage-dépendants de type T (canaux T), $Ca_v3.2$. Il a été établi que la surexpression de ces canaux favorisait la sécrétion de phosphatase acide prostatique et d'autres facteurs mitogènes potentiellement responsables de la prolifération des cellules avoisinantes. De plus, l'expression de ces canaux est augmentée dans le tissu cancéreux prostatique par rapport au tissu hyperplasique. S'il a été montré que ces canaux T sont constitués d'une sous-unité pore $Ca_v3.2$, la structure multimérique des canaux T reste peu connue à l'heure actuelle. Ces sous-unités pores pourraient s'associer à des sous-unités accessoires ($\alpha 2\delta$, β , γ) comme cela a été décrit pour d'autres canaux calciques voltage-dépendants.

Afin de déterminer l'importance de ces canaux T et de comprendre leur fonctionnement et leur régulation dans la cancérogenèse prostatique, ce travail avait pour objectif de déterminer les protéines avec lesquelles ces canaux interagissent et leur(s) rôle(s) physiopathologique(s). Nous montrons tout d'abord que les canaux $Ca_v3.2$ sont couplés à des canaux potassiques calcium-dépendants à grande conductance (canaux BK) dans les cellules cancéreuses prostatiques et que ces deux familles de canaux interviennent dans la prolifération cellulaire. Nous mettons d'autre part en évidence l'expression d'une sous-unité accessoire du type $\alpha 2\delta 2$ des canaux calciques voltage-dépendants dans les lignées et tissus prostatiques. Selon une hypothèse récente, le gène *CACNA2D2* codant pour la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ pourrait être un gène suppresseur de tumeur. Nous avons donc étudié son implication dans la cancérogenèse prostatique. Contre toute attente, nous montrons qu' $\alpha 2\delta 2$ est exprimée plus fréquemment dans les tissus cancéreux prostatiques par rapport aux tissus sains, et que son expression augmente avec le grade du cancer. De plus, par des études *in vitro* et *in vivo*, nous mettons en évidence son rôle promoteur de la croissance tumorale et de l'angiogenèse. Grâce aux techniques d'immunofluorescence, d'immunoprécipitation et d'électrophysiologie, nous montrons d'autre part que $Ca_v3.2$ et la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ peuvent s'associer dans un même complexe protéique et qu' $\alpha 2\delta 2$ est capable de moduler l'activité de ce canal. Cependant, nos travaux suggèrent également que le rôle de cette sous-unité dans la prolifération prostatique pourrait être indépendant de son association avec $Ca_v3.2$.

En conclusion, ce travail amène à une meilleure compréhension de l'implication des canaux calciques de type T et de ses protéines associées dans le cancer de la prostate.

Abstract

Prostate cancer, the third leading cause of cancer death in men, depends on androgens and is therefore frequently treated using androgen ablation therapies in the early stages. However, after few years of anti-androgen treatments, the disease resumes its progression towards an androgen-refractory aggressive stage. In addition, this progression is associated with an increased number of neuroendocrine cells, which overexpress voltage-dependent $Ca_v3.2$ T-type calcium channels. It has been previously demonstrated that such an overexpression of $Ca_v3.2$ channels leads to the secretion of prostatic acid phosphatase and others mitogenic factors responsible for the proliferation of epithelial cells. Moreover, $Ca_v3.2$ channel expression is increased in prostatic cancerous tissue. Though it has been shown that prostate T-type channels require $Ca_v3.2$ pore subunits, T-type channels multimeric structure still remains unknown. As described for high voltage-activated calcium channels, T-type channels could be constituted by a pore subunit ($Ca_v3.2$ also known as $\alpha1H$) associated with accessories subunits ($\alpha2\delta$, β , γ).

In order to determine the role of T-type channels and to understand their regulation during cancer progression, the aim of this work was to identify proteins that interact with $Ca_v3.2$ channels and their role in physiopathology. First, we demonstrate that $Ca_v3.2$ channels are coupled with high-conductance calcium-gated potassium channels (BK channels) in prostate cancer cells. We show that both channels are involved in proliferation. Moreover, we show that an accessory $\alpha2\delta2$ subunit along with a $\gamma4$ subunit, putative partners of voltage-gated calcium channel pore subunits, are expressed in prostate cancer cell lines and prostatic tissues. According to a recent hypothesis, CACNA2D2 gene which codes for $\alpha2\delta2$ subunit could be a tumor suppressor gene. For this reason, we investigated its role in prostatic carcinogenesis. We show that the $\alpha2\delta2$ subunit is more frequently expressed in cancerous tissues than in healthy ones, and that its expression increases with cancer grade. We propose that the $\alpha2\delta2$ subunit may be used as a biomarker for prostate cancer diagnosis. Moreover, using *in vitro* and *in vivo* studies, we highlight the promoting role of $\alpha2\delta2$ on tumor growth and angiogenesis. In addition, we show that $Ca_v3.2$ and $\alpha2\delta2$ can associate in a protein complex and that $\alpha2\delta2$ can modulate the activity of $Ca_v3.2$ channels. However, our study also suggests that the role of the $\alpha2\delta2$ subunit in prostate cell proliferation could be independent of its association with $Ca_v3.2$.

In conclusion, this work leads to a better understanding of the role of T-type calcium channel and its partners in prostate cancer.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger cette thèse.

Merci, pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et pour votre présence lors de ma soutenance.

Je remercie très sincèrement le Docteur Dominique Legrand d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Ma reconnaissance s'adresse également au Professeur Fabrice Matifat et au Docteur Olivier Soriani qui ont bien voulu être rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'au Professeur Marc Mesnil d'avoir accepté de l'examiner.

J'adresse mes remerciements au Professeur Natalia Prevarskaya pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour m'avoir fait confiance tout au long de cette thèse.

Je tiens à remercier le Docteur Pascal Mariot et le Professeur Morad Roudbaraki pour leur encadrement, leur soutien et leur enthousiasme durant ces 3 années de thèse. Merci pour vos conseils, votre aide et pour toutes ces discussions scientifiques passionnantes. Enfin, merci pour votre courage (je suis bien consciente que je ne suis pas toujours facile à supporter !).

Morad, merci d'avoir essayé de contacter Rafa pour l'un de mes anniversaires et j'espère un jour vous convaincre de venir voir un de ses match avec moi !

Pascal, merci pour ton humour ("niveau primaire" dit-on mais auquel j'adhère totalement !) et pour tes qualités sportives (qui nous ont permis de "participer" au match de foot inter-labo).

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire pour leur aide, leurs conseils, leur bonne humeur et auprès desquels j'ai eu plaisir à travailler. Merci en particulier à Loic, Mirto, Anne-So, Gab, Pauline, Etienne, Christian, Philippe, c'était un plaisir de travailler avec vous et de vous côtoyer.

Un merci particulier à Sandra et Alex d'être à la fois mes collègues et mes "chouettes". Vous êtes les mieux placés pour savoir que j'ai du mal à exprimer ce que je ressens, mais vous savez très bien tout ce que je vous dois. Sachez que c'était un plaisir de partager le bureau, et ces soirées (wii, foot, rugby...) avec vous.

Pour finir, je tiens évidemment à remercier l'ensemble de mes proches, ma famille et mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue durant mes études mais également supportée lors des moments plus difficiles, sans oublier ma sœur et mon frère. Enfin, un grand merci à mes amis d'avoir été à mes côtés pendant ces années.

A ma famille, à mes amis,

SOMMAIRE

<i>INDEX DES FIGURES</i>	10
<i>GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS</i>	11
<i>INTRODUCTION</i>	14
I. Physiologie et Physiopathologie de la prostate humaine	15
A. Anatomie et fonction	15
1. Anatomie	15
2. Rôle sécrétoire	16
3. Rôle mécanique	18
4. Croissance et régulation hormonale de la prostate	19
5. Histologie de la prostate	20
a. Le stroma fibromusculaire	20
b. Le tissu glandulaire	20
6. Histologie comparée de la prostate humaine et murine	22
B. Les pathologies de la prostate	23
1. La prostatite	23
2. L'adénome prostatique	23
3. Cancer de la prostate	23
a. Dépistage et diagnostic	25
b. Biomarqueurs potentiels	26
c. Classification des tumeurs prostatiques	29
C. Traitements et échappement thérapeutique	31
1. Traitements du cancer de la prostate	31
a. Traitements curatifs	31
b. Traitements palliatifs	32
2. Echappement thérapeutique	34
a. Le récepteur aux androgènes	34
b. Inhibition de l'apoptose	36
c. Dérégulation de la croissance cellulaire	37
d. Les cellules souches	39
e. Différenciation neuroendocrine	40
II. Calcium et canaux voltage dépendants	43
A. Homéostasie calcique	43
1. Signaux et signature calcique	44
a. La localisation subcellulaire des signaux	45
b. Durée et cinétique des signaux	46
c. Amplitude et intensité des signaux	47

2. Calcium et transcription	48
a. Voies de transduction régulées par les kinases calcium-dépendantes	49
b. Voies de transduction régulées par phosphatases calcium-dépendantes	52
c. La voie DREAM	53
d. Autres mécanismes	54
B. Les canaux calciques	55
1. Les canaux calciques voltage-indépendants et cancers	56
a. Les canaux calciques chimio-dépendants : ROC, SMOC et canaux réticulaires	56
b. Les canaux SOC	58
c. Les canaux TRP	60
2. Les canaux calciques voltage-dépendants	61
a. Classification biophysique des canaux VDCC	61
b. Classification moléculaire des canaux VDCC	64
c. Les canaux calciques voltage-dépendants HVA	65
d. Les canaux calciques voltage-dépendants LVA	66
C. Canaux calciques voltage-dépendants et cancer	69
1. Expression des canaux T dans les cancers	69
2. Canaux calciques voltage-dépendants et prolifération	70
a. Canaux T et cycle cellulaire	71
b. Effets des bloqueurs des canaux T sur la croissance cellulaire	72
3. Canaux T et implication dans la migration et invasion	72
III. Protéines partenaires des canaux T	73
A. Les canaux potassiques	73
1. Diversité des canaux potassiques	74
a. Les canaux potassiques voltage-dépendants : K_v	74
b. Les canaux potassiques calcium dépendants : K_{Ca}	75
2. Couplage entre les canaux potassiques K_v , K_{Ca} et les canaux calciques voltage-dépendants	78
3. Canaux K_v , K_{Ca} dans les cellules épithéliales	80
4. Canaux potassiques et cancer	81
B. Les sous-unités régulatrices des canaux VDCC	82
1. Les sous-unités β	83
a. Distribution tissulaire	85
b. Rôles physiologiques des sous-unités β	85
2. Les sous-unités γ	87
a. Distribution tissulaire	88
b. Rôles physiologiques des sous-unités γ	88
3. Les sous-unités $\alpha\delta$	89
a. Distribution tissulaire	91
b. Rôles physiologiques d' $\alpha\delta$	91
4. Les sous-unités régulatrices et cancer	93

<i>PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS</i>	95
<i>MATERIELS ET METHODES</i>	98
I. Culture cellulaire	99
A. Lignées cellulaires prostatiques humaines	99
B. Conditions de culture	99
C. Conservation des cellules (Congélation/Décongélation)	100
II. Transfection	100
A. Lipofection des siARN	101
B. Obtention d'une lignée stable	101
III. Expérimentation animale	102
IV. Mesure de la viabilité cellulaire et de la prolifération	103
A. Test de viabilité cellulaire	103
B. Cycle cellulaire	104
C. Mesure de l'activité NFAT	104
V. Mesure de la sécrétion	105
A. Sécrétion de VEGF	105
B. Sécrétion de phosphatase acide prostatique	106
VI. Etudes d'expression des ARN messagers (ARNm)	106
A. Extraction des ARNm	106
B. Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNase I) et rétro-transcription	106
C. Polymerase Chain Reaction (PCR) classique	107
D. La PCR en temps réel (qPCR)	108
VII. Immunodétection	109
A. Extraction des protéines	109
B. Western blot	110
C. Immunohistochimie	110
VIII. Imagerie de fluorescence quantitative du calcium cytoplasmique libre	112
A. Caractéristiques de la sonde calcique Fura-2	112
B. Système optique	113
C. Milieu d'enregistrement	114
D. Charge des cellules en Fura-2	114
IX. Enregistrements électrophysiologiques : technique de Patch Clamp	114
<i>RESULTATS</i>	117
Article 1	118

Article 2	131
Article 3	163
Article 4	189
<i>DISCUSSION/PERSPECTIVES</i>	<i>213</i>
<i>CONCLUSION GENERALE</i>	<i>228</i>
<i>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS PERSONNELLES</i>	<i>228</i>
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<i>228</i>

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale chez l'homme	15
Figure 2 : Anatomie zonale de la prostate selon McNeal	16
Figure 3 : Mécanisme d'action du récepteur aux androgènes sur l'expression génique	19
Figure 4 : Architecture cellulaire du tissu prostatique	21
Figure 5 : Structure histologique comparée de la prostate murine et humain	22
Figure 6 : Evolution anatomique du cancer de la prostate suivant les différents stades du système TNM de la maladie (de 1 à 4)	29
Figure 7 : Aspects histologiques des différents grades du cancer de la prostate selon la classification de Gleason	30
Figure 8 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique responsable de la production d'androgène et de la régulation hormonale de la prostate	33
Figure 9 : Représentation schématique de la transition vers le phénotype androgéno-indépendant du cancer de la prostate	34
Figure 10 : Mécanismes participant à l'androgéno-indépendance des cancers prostatiques	38
Figure 11 : Origine des cellules neuroendocrines prostatiques cancéreuses	41
Figure 12 : Régulation spatio-temporelle du signal calcique	48
Figure 13 : Mécanismes de régulation de l'expression génique calcium-dépendante	51
Figure 14 : Schéma de la régulation transcriptionnelle de la protéine DREAM	54
Figure 15 : Sources des voies d'entrée de calcium dans le cytoplasme	55
Figure 16 : Exemples de courants calciques voltage-dépendants de cellules atriales	62
Figure 17 : Nomenclature des canaux calciques voltage-dépendants	63
Figure 18 : Caractéristiques des courants calciques de type T	67
Figure 19 : Représentation schématique du canal potassique BK	77
Figure 20 : Organisation moléculaires des différentes sous-unités des canaux calciques voltage-dépendants HVA	83
Figure 21 : Représentation schématique des différents domaines de la sous-unité β	84
Figure 22 : Alignement des séquences AID des canaux calciques voltage-dépendants	85
Figure 23 : Structure potentielle des sous-unités γ	88
Figure 24 : Représentation schématique des différents domaines de la protéine $\alpha 2\delta 2$	90
Figure 25 : Validation de l'expression protéique de $Ca_v3.2$ et d' $\alpha 2\delta 2$ dans les clones de surexpression	102
Figure 26 : Schéma d'un test ELISA de type sandwich	105
Figure 27 : Principe de quantification par PCR quantitative	108
Figure 28 : Les différentes configurations de la technique électrophysiologique de patch-clamp	115
Figure 29 : Implication de $Ca_v3.2$ dans la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP	211
Figure 30 : Expression d' $\alpha 2\delta 2$ lors de la différenciation neuroendocrine	212
Figure 31 : Expression et sécrétion de VEGF par les cellules LNCaP neuroendocrines	225
Figure 32 : Implication d' $\alpha 2\delta 2$ dans l'adhésion cellulaire	226
Figure 33 : Sécrétion d' $\alpha 2\delta 2$ par les cellules LNCaP- $\alpha 2\delta 2$	227

GLOSSAIRE ET ABREVIATIONS

1-EBIO	1-Ethyl-2-benzimidazolinone
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AID	Alpha Interaction Domain
AMACR	α -methylacyl-CoA racémase
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARC	Arachidonic Acid Regulated Channel
ARE	Androgen Response Element
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ATCC	American Type Culture Collection
ATID1A	AT-rich interactive domain-containing protein 1A
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BCA	Acide Bicinchoninique
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BDNF	Brain Derived Neurotrophin Factor
BID	Beta Interaction Domain
CAMBD	Calmoduline Binding Domain
CAMK	Calmoduline Kinase
CBP	Ca ²⁺ -Binding Protein
CCAT	Ca ²⁺ channel associated transcriptional
CgA	Chromogranine A
CICR	Calcium-Induced Calcium Release
CK	Cytokératines
CNGC	Cyclic-Nucleotides gated Channels
CRE	Creb Response Element
CREB	Cyclic AMP response Element-binding protein
CREST	Calcium Responsive Transactivator
CsA	Cyclosporine A
DAB	3,3 Diaminobenzidine
DAG	Diacylglycérol
DHPR	Dihydropyridine recpetor
DHT	Dihydrotestostérone
DREAM	Downstream Regulatory Element-Antagonist Modulator
DTT	Dithiothréitol
ECC	Entrée Capacitive de Calcium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal Growth Factor

EGTA	Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblaste Growth Factor
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GH	Growth Hormone
GHRH	Growth Hormone Releasing Factor
GHRHR	Growth Hormone Releasing Factor Receptor
GK	Guanylate Kinase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GRP	Gastrin-Releasing Peptide
HAS	Haute Autorité de la Santé
HBP	Hyperplasie Bénigne de la Prostate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HERG	Human EAG-related K ⁺ Channel
HVA	High Voltage-Activated
IBMX	Isobutylméthylxanthine
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukine
IP3	Inositol tri-phosphate
IP3R	Inositol tri-phosphate receptor
KGF	Keratinocyte Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
LH	Luteinizing Hormone
LH-RH	Luteinizing Hormone Releasing Hormone
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate
LRRC	Leucin Rih Repeat-Containing protein
LVA	Low Voltage-Activated
MAGUK	Membrane Associated Guanylate Kinase
MAP-K	Mitogenic Activated Protein-Kinase
MEC	Matrice extra-cellulaire
MIDAS	Metal ion-dependent adhesion site motif
MMP	Matrix Metalloproteinase
NE	Neuroendocrine
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cell
NFκB	Nuclear Factor Kappa B
NLS	Nuclear Localization Sequence
NMDA	N-Methyl-D-Aspartate
NSCL	Non-small cell lung
NSE	Neuron Specific Enolase
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PAP	Phosphatase acide prostatique
PCA3	Prostate cancer antigen 3

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Protéine Kinase
PSA	Prostate Specific Antigen
PSADT	Prostate Specific Antigen Doubling Time
PSAV	Prostate Specific Antigen Velocity
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein
RA	Récepteur aux androgènes
RCPG	Récepteur membranaire couplé aux petites protéines G
RE	Réticulum endoplasmique
REST	Repressor Element-1 (RE-1) Silencing Transcription Factor
ROC	Receptor-Operated Channel
ROCK	Rho Associated Coiled-coil containing protein Kinase
RyR	Ryanodine Receptor
SERCA	Sarco/Endoplasmique/Reticulum Ca^{2+} -ATPase
SHBP	Sex Hormone Binding Protein
siARN	Small interfering ARN
SMOC	Second-Messenger-Operated Channel
SNAP	Soluble NSF Attachment Protein
SNC	Système nerveux Central
SOC	Store-Operated Channel
SOCE	Store-Operated Channel Entry
sPAP	PAP sécrétée
SRC1	Steroid receptor co-activator-1
TARP	Transmembrane AMPA receptor Regulatory Protein
TCR	T Cell Receptor
TEA	Tétraethylammonium
TGF-β1	Transforming Growth Factor
TIF2	Transcriptional intermediary factor-2
TIRFM	Total internal reflection fluorescence microscopy
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM	Tumor Node Metastasis
TRAIL	Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRP	Transient Receptor Potentiel
TSP	Thrombospondine
uPA	urokinase Plasminogen Activator
uPAR	urokinase Plasminogen Activator receptor
VDCC	Voltage-Dependant Calcium Channel
VEGF	Vascular Endothelium Growth Factor
VGCC	Voltage-gated calcium Channel
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
VOC	Voltage-operated Channel
VWA	Von Willebrand factor A domain

INTRODUCTION

I. Physiologie et Physiopathologie de la prostate humaine

A. Anatomie et fonction

1. Anatomie

La prostate est la glande accessoire la plus volumineuse du système reproducteur masculin. Au vu de sa forme et de sa taille, cet organe fibromusculaire et glandulaire est comparable à une châtaigne (environ 20 cm³, soit 15 à 20 g chez l'adulte jeune). Située en avant des vésicules séminales, immédiatement sous la vessie, cette glande exocrine, entourant le canal éjaculateur et la partie supérieure de l'urètre, participe à la production du liquide séminal ainsi qu'au phénomène de miction (Figure 1) (Seisen et al., 2012).

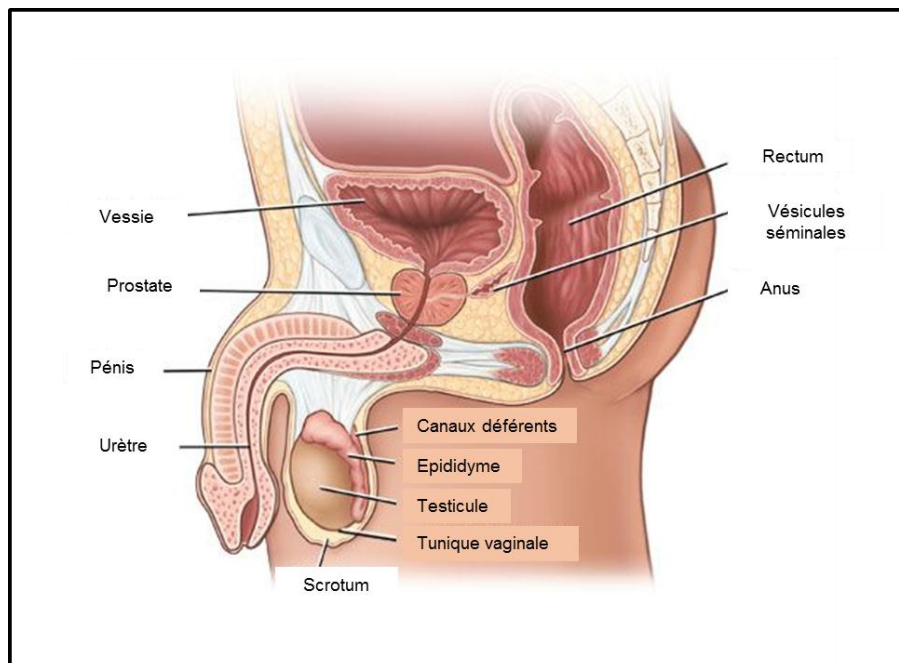


Figure 1 : Localisation de la prostate au sein de la sphère uro-génitale chez l'homme

Ce sont les travaux de McNeal (McNeal, 1968) qui ont permis de constituer un modèle anatomique de la prostate humaine. Ainsi, entourée d'une capsule fibro-élastique, cette glande se divise en 4 zones différentes à la fois sur le plan anatomique et physiopathologique (Figure 2) :

- la zone fibromusculaire antérieure formée de tissu musculaire lisse est une région non glandulaire qui peut être le siège de pathologies comme le léiomyome, le léiomyosarcome ou le rhabdomyosarcome ;

- la zone périphérique constitue la partie postérieure de la prostate, 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 du développement des carcinomes et des prostatites ;
- la zone centrale forme la base de la prostate, entourant l'urètre ;
- la zone de transition, constituée de 2 lobes situés de part et d'autre de la zone centrale, est le siège des hyperplasies bénignes prostatiques (HBP) très fréquentes chez les sujets âgés.

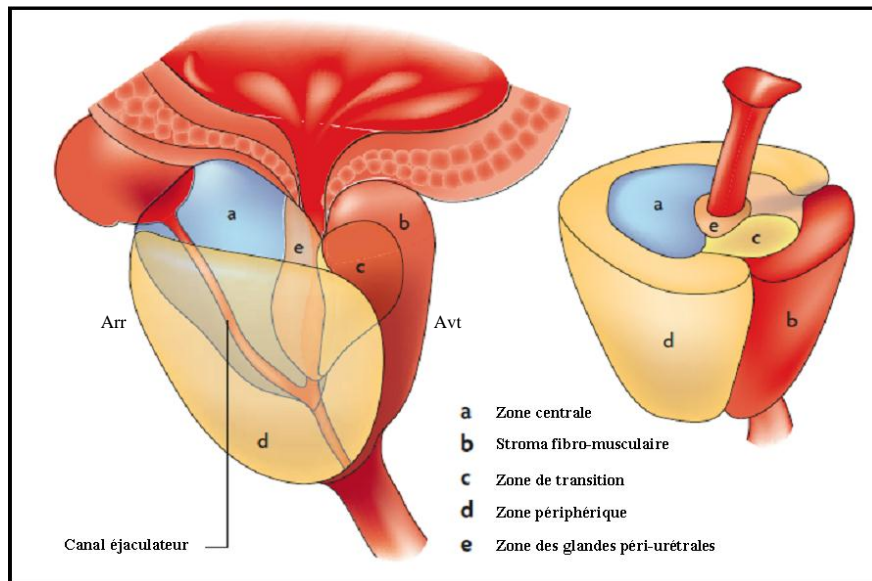


Figure 2 : Anatomie zonale de la prostate selon McNeal en coupe sagittale à gauche et transversale à droite (d'après De Marzo et al., 2007)

2. Rôle sécrétoire

De par sa nature glandulaire, la prostate intervient dans la sécrétion du liquide prostatique. Ce liquide contient de nombreux composants organiques et inorganiques : des ions tels que le zinc, le magnésium, le calcium mais aussi du citrate, des phospholipides, du cholestérol, des enzymes comme des phosphatases acides dont la PAP (Phosphatase acide prostatique), des protéases (fibrinogénase et fibrinolysine), 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, comme le PSA, le citrate ou la spermine (Serkova et al., 2008) (Lynch and Nicholson, 1997) (Kurhanewicz et al., 1995).

Le PSA, caractérisé en 1971 dans le plasma séminal humain, est une sérine protéase membre de la famille des kallikréines. Elle est produite à la fois par les cellules normales et par les cellules cancéreuses puis sécrétée dans la lumière des acini prostatiques. Cette glycoprotéine

de 33-34 kDa joue un rôle dans la liquéfaction du liquide séminal (Lilja, 1985). Elle y est présente à de fortes concentrations allant de 0,5 à 5 g/L (Stephan et al., 2002) et une faible quantité est libérée dans la circulation sanguine. Le PSA sérique circule sous 2 formes, libre (5 à 35% du PSA total) et complexé aux inhibiteurs de protéases (65 à 95%). Une perturbation de l'architecture glandulaire prostatique provoque souvent un transfert du PSA dans la circulation sanguine, ce qui en fait un antigène disponible et facilement dosable. Le taux de PSA varie avec l'âge chez les individus sains, il est en moyenne de 1,0 ng/ml pour les individus âgés de 50 à 59 ans, de 1,4 ng/ml de 60 à 69 ans et de 2,0 ng/ml de 70 à 79 ans (Fleshner and Lawrentschuk, 2009). En outre, l'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, et en particulier du cancer. Cependant, le PSA est associé à de nombreux faux positifs (augmentation du PSA dans HBP, infections...) et de faux négatifs. De plus, d'autres facteurs peuvent influencer le taux de PSA tels que l'appartenance ethnique, l'âge ou l'indice de masse corporelle. Les hommes d'origine africaine ont un taux de PSA plus élevé que les hommes d'origine caucasienne (Fowler et al., 1999) et un faible taux est retrouvé chez les hommes obèses (Baillargeon et al., 2005).

Bien que le PSA soit couramment utilisé aujourd'hui dans le cadre du dépistage du cancer de la prostate chez les hommes de plus de 50 ans, la Haute autorité de Santé recommande de ne plus utiliser le test PSA de manière systématique chez les hommes de plus de 50 ans n'ayant pas de symptômes de pathologies prostatiques (HAS, 2012).

La PAP est une glycoprotéine de 100 kDa constituée de 2 sous-unités de 386 acides aminés chacune (50 kDa) spécifique de l'épithélium prostatique. Cependant, son expression est aujourd'hui retrouvée dans d'autres tissus tels que le colon, le foie, le pancréas (Graddis et al., 2011). Dans la prostate, cette protéine est localisée dans le cytosol des cellules (forme « cellulaire » cPAP) mais aussi dans des vésicules intracellulaires permettant la sécrétion dans le liquide séminal (forme « sécrétée » sPAP). Ces deux formes sont issues de différentes modifications post-traductionnelles à partir du même gène (ACPP) (Muniyan et al., 2013). Son expression est négligeable chez l'adolescent et sa concentration chez l'adulte est de 0,5 mg/g de tissu prostatique sec (Goldfarb et al., 1986). La concentration physiologique de la forme sécrétée dans le liquide séminal est de l'ordre de 1mg/ml (Ronnberg et al., 1981). De plus, chez un individu en parfaite santé, la concentration plasmatique de PAP varie de 1 à 3 ng/ml, tandis que son taux augmente chez les individus atteints d'un cancer avancé dit métastatique, le taux de PAP étant alors corrélé au stade du cancer (Ozu et al., 2008) ; (Ahmann and Schifman, 1987). C'est pourquoi la détection de PAP dans le sang a été le 1^{er}

test de détection du cancer de la prostate utilisé jusque dans les années 1990. De plus, l'expression de la forme cellulaire de PAP a également été étudiée. De manière intéressante, l'expression de la forme cellulaire de PAP diminue lors de la progression de cancer (Sinha et al., 1988) (Sakai et al., 1991), et ceci malgré une augmentation du taux plasmatique de PAP. Ces données et d'autres études *in vivo* et *in vitro* tendent à prouver que la forme cellulaire de PAP serait un suppresseur de tumeur. En effet, une diminution d'expression de PAP induit une augmentation de la prolifération cellulaire prostatique (Lin et al., 2001) et à l'inverse une réduction de la prolifération est observée lors d'une surexpression de la PAP (Chuang et al., 2010); (Veeramani et al., 2005). De plus, sur des xénogreffes de cellules tumorales prostatiques, Igawa et collaborateurs ont montré que le développement tumoral est diminué après injection du vecteur de transfection de PAP dans ces tumeurs (Igawa et al., 2003). Le rôle biologique de la forme sécrétée de PAP reste à définir même s'il a été proposé qu'elle puisse jouer un rôle dans la fertilité et la mobilité des spermatozoïdes. Concernant le rôle physiopathologique de la forme sécrétée, il a été suggéré que la PAP sérique participe au développement des métastases prostatiques. Il a été montré en effet que la sPAP est augmentée dans les métastases prostatiques osseuses et qu'elle stimule la phase ostéoblastique en provoquant des scléroses osseuses réactionnelles (Kirschenbaum et al., 2011). Ce mécanisme d'action impliquerait l'activation des phosphatases alcalines osseuses par la sPAP (Ishibe et al., 1991).

3. Rôle mécanique

La prostate bénéficie d'une place privilégiée pour intervenir à la fois dans la miction et dans le processus éjaculatoire. En effet, la prostate est entourée de 2 sphincters musculaires :

- un sphincter interne formé de fibres musculaires lisses (sphincter lisse) qui entoure la partie supérieure de l'urètre. La tonicité de ce sphincter empêche l'écoulement spontané de l'urine provenant de la vessie.

- un sphincter externe de fibres musculaires striées (sphincter strié) qui comprend un anneau à la partie inférieure de l'urètre prostatique. Ce sphincter externe est responsable de l'acte volontaire de la miction.

Enfin, 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. La prostate intervient donc dans les processus de miction et de reproduction, grâce à un double contrôle glandulaire et musculaire. Ceci explique les lourdes conséquences que peut

entraîner un dérèglement anatomique et fonctionnel de la prostate observées lors d'hyperplasie bénigne ou de cancer.

4. Croissance et régulation hormonale de la prostate

A la naissance, le tissu prostatique est formé d'un réseau de canaux dispersés dans un abondant stroma fibromusculaire. Durant l'enfance, le nombre de structures glandulaires augmente très peu et c'est à partir de la puberté que les croissances simultanées de ces structures et du stroma aboutissent à l'aspect de la prostate adulte. Depuis les travaux de Huggins et Hodges en 1941, il est fermement établi que les androgènes régulent la croissance normale, les activités fonctionnelles mais aussi le développement pathologique de la prostate humaine, considérant donc la prostate comme un organe androgéno-dépendant (Huggins and Hodges, 2002). En effet, la testostérone, principal androgène, synthétisée au niveau des cellules de Leydig des testicules est sécrétée dans le sang où elle est liée à une protéine plasmatique, la SHBG (Sex Hormone Binding Protein), pour atteindre ses organes cibles. Dans la prostate, la testostérone est convertie en dihydrotestostérone (DHT) par l'enzyme 5 α -réductase. Le mode d'action le plus connu et reconnu des androgènes s'exerce par un effet génomique (Figure 3).

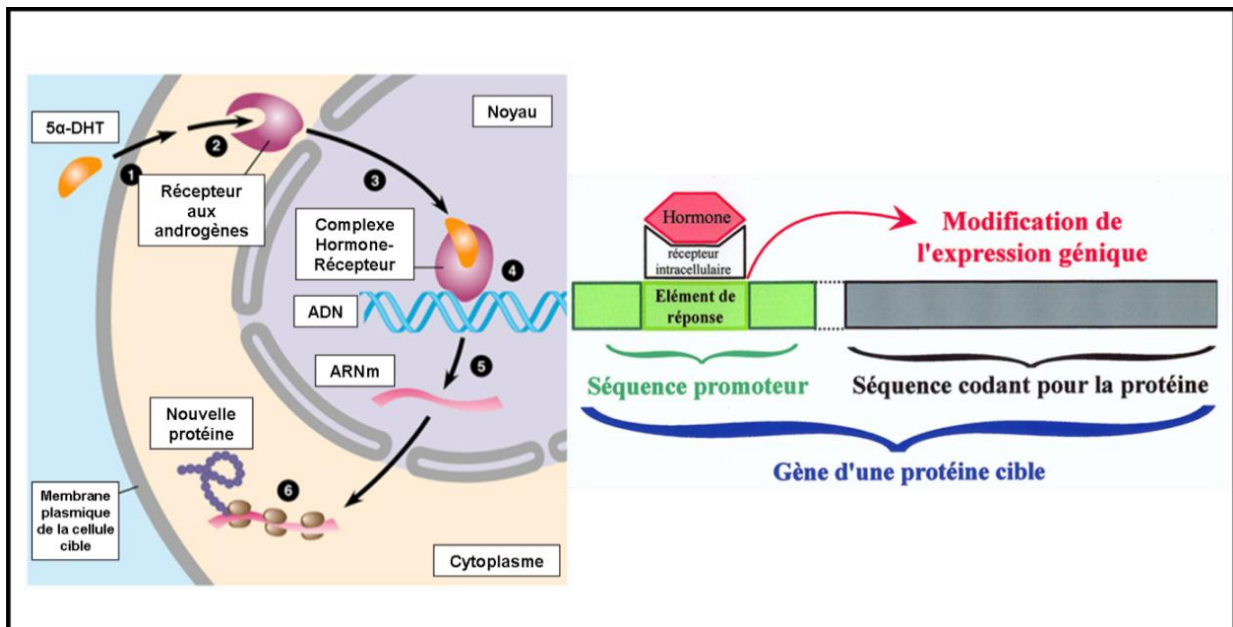


Figure 3 : Mécanisme d'action du récepteur aux androgènes sur l'expression génique. Les androgènes passent la membrane plasmique (1) pour se fixer sur leur récepteur (2) situé dans le cytoplasme. Le complexe hormone-récepteur subit une translocation vers le noyau (3) afin de se fixer sur son élément de réponse sur l'ADN dans le promoteur du gène cible (4). Cette fixation entraîne l'activation ou l'inhibition de la transcription (5) puis la traduction protéique (6).

En effet, la testostérone et la DHT se fixent sur le récepteur aux androgènes (RA), la DHT ayant une affinité 10 fois plus importante pour le récepteur que la testostérone. Le récepteur aux androgènes est une protéine cytosolique qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires et dont le mode d'action principal est celui d'un facteur de transcription (Shang et al., 2002). Le RA possède une forte affinité pour une séquence nucléotidique spécifique appelée Androgen Response Element (ARE), située dans les régions de régulation des gènes cibles des androgènes (Lamont and Tindall, 2010).

Les androgènes peuvent donc ainsi réguler l'expression de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire, mais aussi dans l'expression de la PSA ou de la PAP.

5. Histologie de la prostate

La structure histologique de la prostate normale est caractérisée par la présence de 2 couches histologiques : un épithélium stratifié glandulaire et un stroma fibromusculaire séparés par une lame basale (Figure 4).

a. Le stroma fibromusculaire

Le stroma se compose de cellules musculaires lisses, de fibroblastes, de cellules endothéliales et nerveuses, de cellules du système immunitaire ainsi que de fibres de la matrice extracellulaire comme le collagène. Ce stroma ne permet pas seulement le maintien de l'épithélium glandulaire mais il contribue également à générer un microenvironnement nécessaire à l'homéostasie tissulaire prostatique. En effet, les cellules stromales participent à la prolifération et à la différenciation des cellules par des sécrétions autocrines ou paracrines de facteurs tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), le FGF, d'hormones comme la prolactine, la PTHrP (Parathyroid Hormone Related Peptide) et l'adrénaline.

b. Le tissu glandulaire

L'épithélium prostatique, organisé en acini glandulaires, présente une structure stratifiée comprenant 3 types cellulaires principaux :

- les cellules basales, proches de la lame basale, sont considérées comme le compartiment prolifératif de cet épithélium. Ces cellules sont androgéno-indépendantes et expriment les cytokératines (CK) 5 et 14 (Wernert et al., 1987). De nombreuses études histologiques ont mis en évidence l'existence d'une population de cellules intermédiaires dites « transit-amplifying cells » qui dérive des cellules basales. Ces cellules possèdent des marqueurs épithéliaux apicaux et basaux (CK 5, 8, 14 et 18, et le RA) et sont androgéno-dépendantes. Elles ont un

cycle cellulaire rapide mais un nombre de division limité, subissant alors la différenciation en cellules luminales ou neuroendocrines (De Marzo et al., 1998).

- les cellules luminales constituent le type cellulaire majoritaire qui borde la lumière des acini prostatiques. Ces cellules synthétisent et sécrètent les produits constituant le plasma séminal : le PSA, les phosphatases spécifiques de la prostate comme la PAP, des polyamines, des prostaglandines, des citrates et des ions. Ces cellules sont androgéno-dépendantes. En effet, leur survie, leur prolifération et leur sécrétion sont sous le contrôle des androgènes via le RA (Xue et al., 1998). Enfin, les cellules luminales expriment les CK8 et CK18 (Wernert et al., 1987).

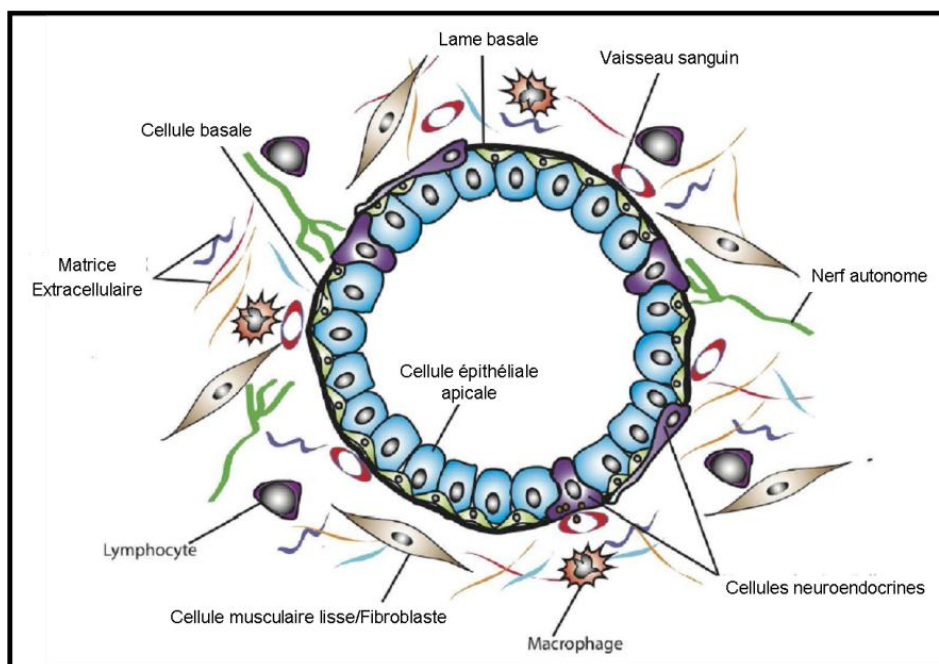


Figure 4 : Architecture cellulaire du tissu prostatique (d'après Barron and Rowley, 2012)

- les cellules neuroendocrines ne représentent que 0,5 à 2% du tissu prostatique chez l'homme et sont dispersées entre des cellules glandulaires mais aussi dans le stroma (Pretl, 1944). Leur nombre est plus important dans la zone de transition et la zone périphérique que dans la zone centrale de la prostate humaine, impliquant leur rôle dans l'HBP et les cancers (Santamaria et al., 2002). Ces cellules sont dites neuroendocrines car elles présentent quelques caractéristiques morphologiques, fonctionnelles et métaboliques similaires à celles des neurones (Day and Salzet, 2002). En effet, ces cellules ont des prolongements de type neuritique qui s'enchevêtrent entre les cellules épithéliales et possèdent de nombreux granules de sécrétion. Ces granules contiennent des substances semblables aux neurohormones telles que la calcitonine (CT), la neurotensine, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), la bombésine

ou la GRP (Gastrin-Releasing Peptide) mais aussi des monoamines comme la sérotonine (Sun et al., 2009). De plus, ces cellules ont la particularité d'exprimer certains marqueurs neuroendocriniens (couramment utilisés pour les caractériser) tels que la NSE (Neuron Specific Enolase), la synaptophysine, et la chromogranine A ou B (Abrahamsson, 1999).

L'origine des cellules neuroendocrines a longtemps été débattue bien qu'il soit admis aujourd'hui qu'elles puissent provenir des crêtes neurales (Fujita et al., 1980; Marcu et al., 2010). Les derniers travaux concernant la différenciation neuroendocrine suggèrent que ces cellules se forment à partir des cellules progénitrices situées dans la couche basale de l'épithélium (Fujita et al., 1980; Marcu et al., 2010).

6. Histologie comparée de la prostate humaine et murine

Les premières études portant sur la prostate ont été effectuées grâce à des modèles animaux et plus particulièrement sur le rat. Cependant, on sait aujourd'hui que l'anatomie prostatique de l'homme et du rat est très différente. Malgré une localisation similaire, les différents lobes se situant en arrière de la vessie et étant fixés à l'urètre par du tissu conjonctif, il existe néanmoins des différences notables. La prostate de rat est plutôt ovale et de couleur blanchâtre, et se divise en 3 paires de lobes distincts : les lobes ventraux, dorsaux et latéraux. Le lobe ventral constitue environ la moitié de la masse de l'ensemble de la prostate de rat (Hayashi et al., 1991). Chez la souris, les lobes latéraux sont absents.

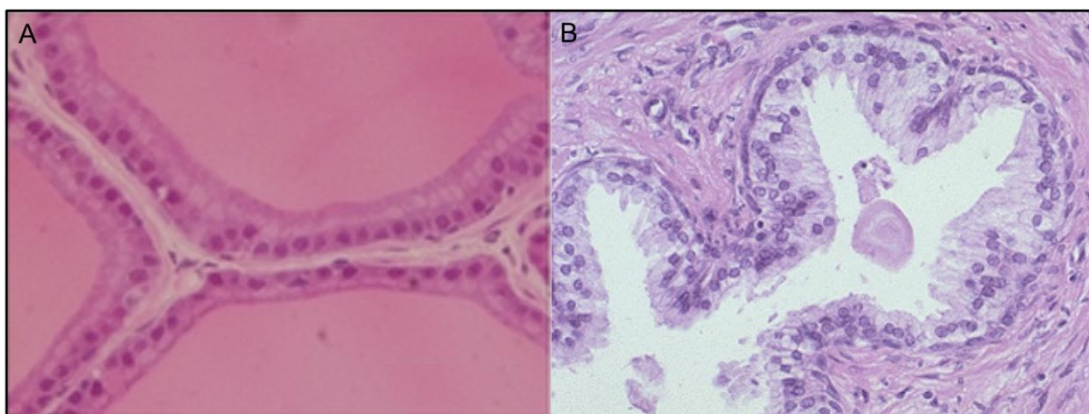


Figure 5 : Structure histologique comparée de la prostate murine (A : Coupe de prostate ventrale de rat d'après (Venancio et al., 2012)) et humaine (B).

Histologiquement, plusieurs différences sont aussi présentes (Figure 5), le tissu prostatique de rat est tubulo-alvéolaire, formé d'acini et d'une matrice stromale. L'épithélium des follicules glandulaire est principalement composé d'une simple couche cellulaire cylindrique dans

laquelle s'intercale quelques cellules sécrétrices dispersées (Jesik et al., 1982) tandis que l'épithélium est pseudostratifié chez l'homme. De plus, une étude montre que les cellules épithéliales prostatiques de rat présentent des microvillosités (Kawai and Aumuller, 1988). Chaque acinus est entouré d'une couche cellulaire unique composée de myofibroblastes. Enfin, la structure du tissu des 3 lobes est différente (Jesik et al., 1982). En effet, les acini de lobes ventraux ont une lumière large avec peu de repliement de l'épithélium. A l'inverse, les acini des lobes latéraux et dorsaux, sont généralement plus étroits avec une petite lumière et de nombreux repliements de l'épithélium (Sharma D.K., 2008).

B. Les pathologies de la prostate

La prostate peut être le siège de 3 affections principales : la prostatite, l'adénome ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate (HBP), et l'adénocarcinome.

1. La prostatite

Dans la grande majorité des cas, la prostatite provient d'une infection d'origine bactérienne. Plusieurs bactéries peuvent être à la source de cette inflammation, la plus fréquente étant *E. coli*. Cette maladie bénigne peut être aiguë ou chronique.

2. L'adénome prostatique

L'adénome ou Hyperplasie Bénigne de la Prostate désigne une tumeur bénigne qui se développe progressivement dans les structures glandulaires de la prostate au sein de la zone de transition (McNeal, 1968). L'adénome correspond à l'apparition d'un tissu fibreux ou glandulaire, entraînant le grossissement et/ou la rigidité de la prostate. C'est la tumeur la plus fréquente chez l'homme (70% des hommes présentent une HBP histologique après 60 ans). Deux facteurs sont reconnus pour avoir une incidence sur cette maladie à savoir l'âge et les androgènes.

3. Cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est l'un des cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez l'homme. Il s'agit de la troisième cause de mortalité par cancer après les cancers pulmonaires et colorectaux chez l'homme en Europe (Ferlay et al., 2013). En 2012, l'incidence du cancer était de 417 000 cas en Europe, ce qui représente 23% des cancers chez l'homme. Le nombre de décès s'élève à 92 200 soit 9.5% des décès par cancer. En France, l'incidence du cancer de

la prostate en 2012 était de 73 600 cas, la plus importante d'Europe et 8 600 décès (Ferlay et al., 2013).

Le vieillissement de la population est l'un des facteurs favorisant l'augmentation de la prévalence de cette maladie. Une étude estime qu'en 2030, 1,7 millions de nouveaux cas seraient susceptibles d'être diagnostiqués dans le monde avec une précision de 499 000 décès, ce qui confirme l'ampleur que va prendre cette pathologie dans les années à venir (Ferlay et al., 2010).

Les principaux facteurs de risque pour le cancer de la prostate sont :

- ***l'âge*** : c'est le facteur de risque le plus important. En effet, moins de 10% des cancers sont diagnostiqués chez des patients de moins de 55 ans et plus de 65% des cancers sont diagnostiqués chez les patients entre 55 à 75 ans (Fleshner and Lawrentschuk, 2009).

- ***l'origine ethnique*** : le nombre de cas de cancers de la prostate est beaucoup plus important dans les pays d'Europe du Nord, d'Amérique du Nord et d'Afrique que dans les pays d'Asie où l'incidence de ce cancer est faible (Bunker et al., 2002). En effet, en 2008, il y a eu 899 000 cas de cancer de la prostate et 258000 décès dans le monde dont 53% dans les pays développés (Nord-Ouest de l'Europe, Amérique du nord, Australie, Nouvelle Zélande et Japon) (Center et al., 2012).

- ***l'hérédité et les antécédents familiaux*** : le cancer de la prostate sporadique est la forme la plus répandue. Cependant, il peut exister un facteur génétique familial responsable d'environ 10% des cancers. Ainsi, un patient dont le père et le frère sont atteints du cancer de la prostate a 2,5 fois plus de risques de développer lui-même un cancer (Chen et al., 2008). Différents loci et polymorphismes de gènes ont été répertoriés, comme par exemple le locus 13q12 du gène BRCA2 qui serait responsable de moins de 2% des cancers prostatiques (Colloca and Venturino, 2011). Mais la recherche des causes génétiques du cancer de la prostate demande encore de nombreuses études.

- ***l'alimentation*** : 80% des cas de cancer de la prostate seraient liés à des régimes particuliers associés, par exemple à une consommation excessive de matières grasses. De plus, de récentes études suggèrent un lien possible entre le cancer de la prostate et des maladies métaboliques telles que le diabète, l'obésité ou l'hypertension (De Nunzio et al., 2012) (Bansal et al., 2013). De nombreuses études se sont penchées sur la question, mais les résultats sont controversés. En effet, l'augmentation du risque de cancer est liée à une augmentation de l'indice de masse corporelle (MacInnis and English, 2006). Cependant, Discacciati et collaborateurs montrent que l'obésité est associée au cancer de haut grade et peu voire pas au cancer localisé (Discacciati et al., 2012). Une nouvelle étude de 2013 montre

que l'obésité est associée à la présence de néoplasies prostatiques intraépithéliales, lésions à l'origine du cancer dans 30% des cas (Rundle et al., 2013). Au contraire, une consommation importante de lycopène, pigment rouge retrouvé dans les tomates notamment, est associée à une réduction du risque de cancer de la prostate (Etminan et al., 2004). En revanche, la consommation d'un autre caroténoïde, le β -carotène, est associée au risque de développer le cancer (Karppi et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que la consommation de thé vert peut entraîner une diminution du risque de cancer de la prostate (Kurahashi et al., 2008). Cependant, ce point reste soumis à controverse (Montague et al., 2012).

Les tumeurs prostatiques ou adénocarcinomes se développent très lentement et dans la majorité des cas dans la zone périphérique (McNeal et al., 1988). Dans les premiers stades, le cancer est localisé et sous la dépendance des androgènes. Lors de l'évolution de la maladie, la tumeur peut s'étendre et ainsi envahir les tissus et organes voisins, jusqu'à former des métastases.

a. Dépistage et diagnostic

Lors de l'évolution des cancers prostatiques, des symptômes peuvent apparaître mais ne se manifestent pas systématiquement chez tous les hommes. Les symptômes les plus courants sont : le besoin d'uriner fréquemment, un débit urinaire irrégulier (débit faible ou qui s'interrompt lors de la miction), des douleurs et sensations de brûlures.

A partir des années 1980, de nouvelles techniques diagnostiques ont fait leur apparition et ont permis de détecter la maladie à un stade très localisé. L'utilisation généralisée de ces techniques serait en grande partie responsable de l'augmentation du nombre de cancers de la prostate dépistés. Il existe 3 grandes techniques de détection (Roobol and Carlsson, 2013) :

- **le toucher rectal** qui permet de détecter une grosseur, une irrégularité au niveau de la glande prostatique.

- **le taux de PSA**. Il correspond au taux d'antigène spécifique prostatique total retrouvé dans le sang qui permet d'évaluer le risque de cancer de la prostate mais également son suivi. Les premières études qui ont proposé d'utiliser le taux de PSA comme biomarqueur furent publiées fin des années 1980 et début des années 1990 (Stamey et al., 1987) ; (Catalona et al., 1991). A l'heure actuelle, il s'agit du seul test diagnostique du cancer de la prostate sur le marché (Zhu et al., 2012).

En condition normale, un faible taux de PSA total est retrouvé dans le sang, et celui-ci est augmenté lors du cancer de la prostate. En effet, si le taux de PSA dépasse le seuil de 4,0ng/ml, le risque de cancer est augmenté et le patient doit subir une biopsie. Cependant, le

taux de PSA est à étudier avec beaucoup de précaution, car il n'est pas automatiquement corrélé à la présence du cancer de la prostate. Ceci ne permet pas de le proposer comme seul marqueur diagnostique dans le cadre d'un dépistage. En effet, les hyperplasies bénignes ou d'autres inflammations peuvent causer l'élévation du taux de PSA, réduisant ainsi la spécificité du PSA au cancer de la prostate (Greene et al., 2009). De plus, 15% des hommes avec un taux de PSA faible ($\leq 4,0$ ng/ml) ont un cancer de la prostate dont 15% avec un score de Gleason avancé (Thompson et al., 2004). Beaucoup d'efforts sont réalisés afin d'améliorer le test PSA : en normalisant le taux de PSA par rapport à la taille de la glande, en étudiant la vélocité de PSA (PSAV pour Prostate Specific Antigen Velocity), c'est-à-dire le changement de concentration de PSA dans le sang, ou encore en mesurant son taux de doublement (PSADT pour Prostate Specific Antigen Doubling Time) (Prensner et al., 2012). Enfin, le ratio PSA libre sur PSA total peut être utilisé afin d'augmenter la spécificité du test et diminuer les biopsies inutiles. Chez les sujets atteints d'un cancer, la proportion de PSA complexé, notamment aux inhibiteurs de protéases tels que l' α 1-antichymotrypsine, l' α 1-antitrypsine ou l' α 2-macroglobuline, est plus grande et le pourcentage de PSA libre plus faible (Nogueira et al., 2009). Ainsi, le ratio (PSA libre/ PSA total) est plus faible chez les sujets atteints d'un cancer.

- *la biopsie*, qui permet d'examiner l'architecture de la prostate au microscope et d'établir un diagnostic définitif. Cette étude histologique précise l'agressivité des cellules cancéreuses définie selon une échelle, appelée score de Gleason.

b. Biomarqueurs potentiels

Le test PSA est actuellement le principal test utilisé comme outil diagnostique du cancer de la prostate. Cependant, son utilisation est associée à un grand nombre de faux positifs et de faux négatifs, ce qui a suscité un rapport récent de la Haute Autorité de Santé (février 2012) qui préconise de ne pas procéder à un dépistage systématique avec le test PSA (HAS, 2012). Afin d'améliorer le diagnostic et le pronostic du cancer de la prostate, d'autres marqueurs émergent à l'heure actuelle. Les biomarqueurs tumoraux sont produits par la tumeur ou par l'organisme en réponse à la tumeur. Parmi ceux-ci, on peut citer les marqueurs de détection et de dépistage utilisés pour évaluer les facteurs de risque et les symptômes de cancer de la prostate ; les marqueurs diagnostiques qui prédisent la présence ou l'absence de cancer en parallèle des caractéristiques histologiques classiques ; les marqueurs pronostiques utilisés pour prédire le devenir des patients basé sur les risques de récurrence et de progression du cancer (Danila et al., 2011). Beaucoup d'études se sont intéressées à la recherche de biomarqueurs du cancer de la

prostate. Ces derniers peuvent être classés en 3 catégories : les biomarqueurs urinaires, sanguins et cellulaires (Artibani, 2012).

- les marqueurs urinaires

Le biomarqueur le plus important pour le cancer de la prostate non basé sur le test PSA est l'antigène du cancer de la prostate 3 (PCA3). PCA3 est un ARNm non codant issu du chromosome 9q21-22, dont la surexpression est observée dans plus de 90% des cancers prostatiques, à l'inverse des prostates saines et hyperplasiques (Bussemakers et al., 1999). 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 lors de la miction) qui fait l'objet d'études (Bourdoumis et al., 2010). Ce test est actuellement sur le marché au Canada. Le gène de fusion TMPRSS2:ERG, gènes d'une protéase (TMPRSS2) et d'un facteur de transcription (ERG), est également proposé comme marqueur diagnostique, seul ou en combinaison avec PCA3 ou PSA (Tomlins et al., 2011).

- les marqueurs sanguins

Parmi les marqueurs sanguins, on trouve une famille de marqueurs de détection : les kallikréines et des marqueurs diagnostiques, l'activateur d'urokinase plasminogène, le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta 1), IL-6 (Interleukin 6) mais aussi les cellules tumorales circulantes (Shariat et al., 2011).

La protéine hK2 (human Kallikrein 2) est une sérine protéase sécrétée appartenant à la même famille que le PSA. Comme ce dernier, hK2 est exprimée dans la prostate et est présente sous deux formes, libre et liée. Plusieurs études montrent que hK2 peut améliorer la détection des cancers de la prostate lorsqu'on l'associe au dosage du PSA (Nam et al., 2000) (Becker et al., 2000).

La protéine uPA (urokinase Plasminogen Activator) représente un biomarqueur potentiel de cancers prostatiques par son implication dans les différentes phases du développement tumoral et dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC). Cette protéase du sérum fixée sur son récepteur uPAR conduit à la conversion du plasminogène en plasmine qui peut ensuite activer les protéases et ainsi induire la dégradation de la MEC. Il a été montré que les surexpressions d'uPA et de son inhibiteur (PAI-1) sont associées à une agressivité des cancers prostatiques (Gupta et al., 2009). De plus, un taux élevé d'uPA et uPAR est lié à la progression de la maladie, à l'invasion et aux métastases (Shariat et al., 2007).

Le TGF- β 1 est un facteur de croissance qui intervient dans différents mécanismes dont la prolifération, la différenciation ou l'angiogenèse. Le TGF- β 1 favorise la progression des

cellules dans le cancer et son expression est associée à des cancers de haut grade, à l'invasion tumorale et à la présence de métastases (Truong et al., 1993) (Shariat et al., 2004).

IL-6 est une cytokine exprimée dans le cancer de la prostate tout comme son récepteur (IL-6R). Une étude montre qu'une augmentation de IL-6 est associée au stade métastatique et aux cancers hormono-indépendants, suggérant qu'IL-6 puisse être un marqueur de progression tumorale (Michalaki et al., 2004) (Nakashima et al., 2000).

De plus, une récente étude suggère que la protéine Cyr 61 (Cysteine rich angiogenic inducer 61) protéine de la matrice extracellulaire, détectable dans le sang puisse être un marqueur pronostique du cancer de la prostate. En effet, la concentration sérique de cette protéine est plus importante en cas de cancer métastatique que lors d'un cancer localisé (Terada et al., 2012). De plus, cette protéine peut également être considérée comme marqueur diagnostique tissulaire, car son expression augmente lors du développement du cancer localisé (D'Antonio et al., 2010).

Enfin, les recherches s'orientent vers la détection des cellules tumorales dans le sang. La corrélation entre le nombre de cellules tumorales circulantes dans le sang et le cancer de la prostate hormono-indépendant a été étudiée (de Bono et al., 2008) (Danila et al., 2007). Ces cellules sont définies comme des cellules nucléées qui n'expriment pas CD45 (protein tyrosine phosphatase, présente sur toutes les cellules hématopoïétiques différenciées) mais expriment les cytokératines 8, 18 et 19 (de Bono, *et al.*, 2008). Une augmentation du nombre de ces cellules dans le sang est observée chez des patients atteints d'un cancer résistant à la castration (hormono-indépendant) et est associée à une diminution de survie. C'est pourquoi, la détection de cellules tumorales circulantes fait actuellement l'objet de nombreuses recherches.

- les marqueurs cellulaires

Les marqueurs cellulaires ont l'inconvénient de nécessiter une biopsie contrairement aux marqueurs sanguins et urinaires plus faciles d'accès. Cependant, ils sont parfois nécessaires afin de déterminer clairement la nature cancéreuse ou non d'une tumeur et le grade d'une tumeur cancéreuse. L' α -methylacyl-CoA racémase (AMACR) fait également l'objet d'étude. En effet, dans un premier temps, son taux d'expression augmente dans les cancers précoces puis diminue dans les cancers métastatiques ou en cas de récurrence après castration (Rubin et al., 2005). Cependant, ce marqueur ne serait pas spécifique du cancer de la prostate (Jiang et al., 2003). D'autres marqueurs existent, comme GOLPH2 et SPINK1, respectivement protéine golgienne et inhibiteur de serine protéase, mais ne sont pas non plus spécifiques du cancer de

la prostate (Prensner et al., 2012). Des recherches sont donc toujours nécessaires afin d'améliorer les tests biologiques de détection du cancer de la prostate.

c. Classification des tumeurs prostatiques

Les traitements des cancers de la prostate dépendent notamment de l'étendue de la pathologie au moment de son diagnostic et de son évolution potentielle. Afin d'évaluer ces paramètres, il existe plusieurs systèmes de classification : le système TNM (Tumor Node Metastasis) et le score de Gleason.

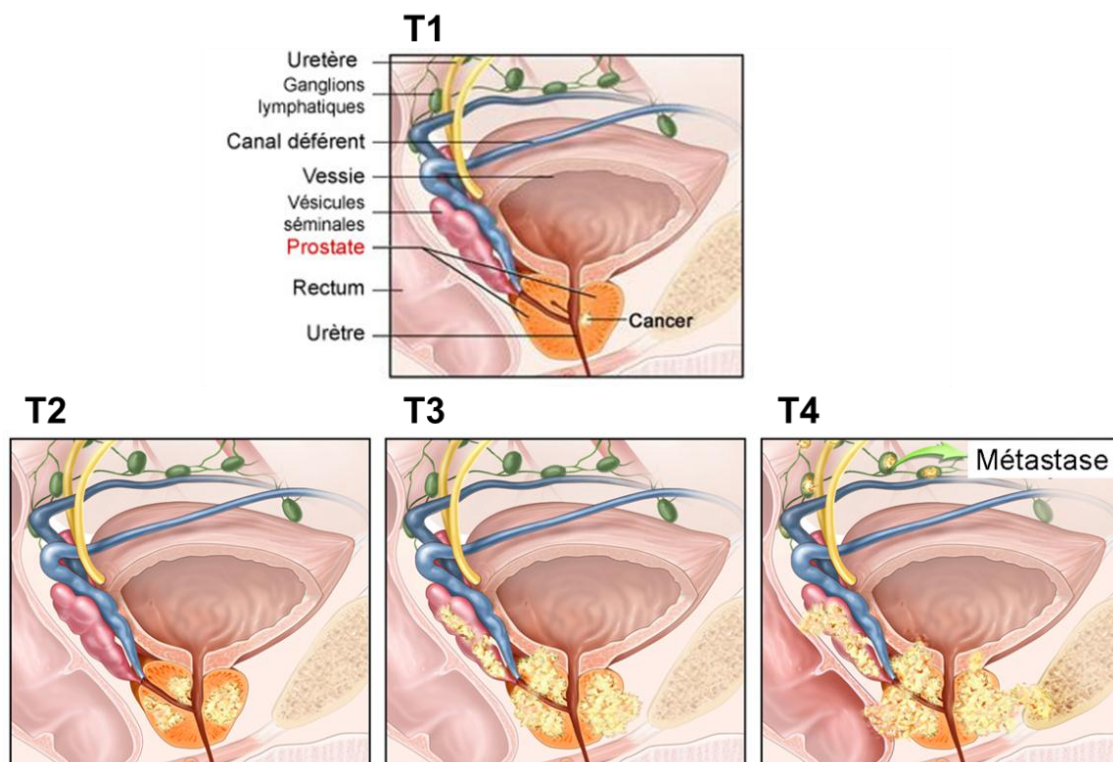


Figure 6 : Evolution anatomique du cancer de la prostate suivant les différents stades du système TNM de la maladie (de 1 à 4) modifiée d'après <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media>.

- Le système TNM

Cette classification TNM fut proposée par Ammon en 1977 et réactualisée à plusieurs reprises, la dernière version datant de 2010 (Ammon et al., 1977) (Cheng et al., 2012). Cette classification prend en compte 3 critères, la taille de la tumeur (T), la présence ou non de cellules tumorales dans les ganglions (N) et la présence ou non de métastases (M) (Figure 6).

Au stade T1, la tumeur est généralement petite, non palpable et difficilement visible en imagerie. Le stade T2 se caractérise par une tumeur encore localisée dans la capsule épithéliale mais plus étendue. A ce stade, la tumeur est détectable par palpation et cause les

premiers symptômes. Au stade T3, la tumeur dépasse la barrière prostatique et se propage vers les vésicules séminales. Enfin, au stade T4, les cellules cancéreuses se sont propagées vers des organes périphériques autres que les vésicules séminales comme la vessie par exemple. Ce stade T4 définit les métastases loco-régionales. La propagation des métastases au niveau des ganglions lymphatiques se définit par le statut N. Le statut M détermine les métastases lointaines c'est-à-dire les organes touchés (tels que le foie, les os ou le cerveau).

- Le score de Gleason

Le score de Gleason est fondé sur le degré de différenciation du tissu cancéreux et met en évidence 5 grades distinctifs après observations histologiques (grades de 1 à 5, du moins agressif au plus agressif). Le score de Gleason est la somme des deux grades les plus fréquemment représentés au sein de la tumeur (donc gradué de 2 à 10). Plus le score est élevé, plus le tissu est indifférencié, anaplasique et plus la tumeur est agressive (Figure 7).

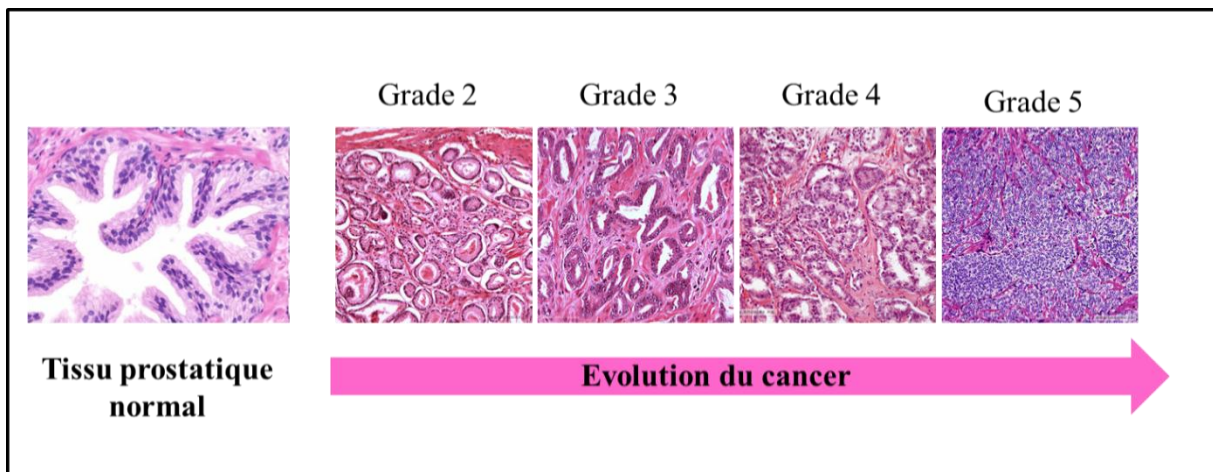


Figure 7 : Aspects histologiques des différents grades du cancer de la prostate selon la classification de Gleason

Grade 1 : le nodule est 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. C'est un modèle rare, peu retrouvé en biopsie.

Grade 2 : Le nodule est assez circonscrit, mais aux bords mal définis. Les acini sont de taille moyenne, plus rapprochés les uns des autres mais sans disruption de la lame basale.

Grade 3 : La tumeur est composée d'acini irréguliers, serrés et encore séparés mais avec des bords mal définis. La taille et la morphologie des acini sont donc très variables avec une invasion du stroma.

Grade 4 : Tumeur à glandes fusionnées, les glandes distinctes ont une faible lumière.

Grade 5 : Zone cancéreuse indifférenciée, avec une perte de la structure du tissu.

C. Traitements et échappement thérapeutique

1. Traitements du cancer de la prostate

La rémission du cancer de la prostate pourrait être réalisée par la privation de testostérone, ce qui constitue un premier repère dans le traitement de la maladie (Glina et al., 2010). A l'heure actuelle, il existe deux types de traitements: les traitements curatifs qui visent les formes localisées de cancer prostatique et les traitements palliatifs, comme l'hormonothérapie, destinés aux formes plus avancées. Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou associés les uns aux autres.

Le choix du traitement dépend donc des caractéristiques du cancer, de sa localisation précise, de son type histologique, de son stade et de son grade établis après diagnostic.

a. Traitements curatifs

Les traitements curatifs radicaux consistent à enlever la tumeur ou supprimer les cellules tumorales. Parmi ces traitements, on retrouve la prostatectomie radicale, la radiothérapie externe et la brachythérapie ou curiethérapie. La prostatectomie radicale est la plus fréquemment pratiquée pour les patients ayant une espérance de vie supérieure à 10 ans (85% de survie à 15 ans) (Krongrad et al., 1997). Il s'agit du traitement de référence pour les cancers de la prostate localisés. La radiothérapie externe utilise des rayonnements pour détruire les cellules cancéreuses les empêchant ainsi de se multiplier (Martin and Gaya, 2010). Les rayonnements de photons ou rayons X sont produits par un accélérateur de particules. Les doses habituellement délivrées pour la radiothérapie externe d'un cancer de la prostate sont de 70 à 80 Gy. Enfin, la curiethérapie consiste à placer une source radioactive, généralement iode 125 et plus rarement iridium 192, à l'intérieur de la prostate détruisant de ce fait les cellules tumorales (Aronowitz and Rivard, 2013). La curiethérapie permet donc de limiter les effets secondaires sur les tissus sains voisins. Une autre méthode de traitement est également utilisée, il s'agit du traitement par ultrasons focalisés de haute intensité ou Ablatherm® (Crouzet et al., 2010). Ce traitement a pour but de détruire localement, par la chaleur, la prostate et par conséquent la tumeur. En effet, une sonde endorectale provoque des « tirs » qui vont détruire définitivement les tissus placés dans la zone visée. Ce traitement récent est en cours d'évaluation. Actuellement, une autre technique fait l'objet d'essais, il s'agit de la cryothérapie (Nguyen et al., 2013). La cryothérapie détruit les cellules cancéreuses par congélation brutale et répétée grâce à un gaz, l'argon. Ce traitement conduit à la mort cellulaire par dénaturation des protéines cellulaires, par déshydratation, par rupture de la membrane cellulaire et par ischémie et apoptose.

b. Traitements palliatifs

Afin d'empêcher l'action stimulante des androgènes et plus particulièrement de la testostérone sur les cellules cancéreuses, et par conséquent le développement tumoral et la formation de métastases, la suppression androgénique reste un traitement de choix. En effet, seulement 6% des cancers ne répondent pas à la suppression androgénique (Palmberg et al., 1999). La production d'androgènes étant finement régulée par l'axe hypothalamo-hypophysaire, l'hormonothérapie peut avoir différentes cibles (Tammela, 2012).

- la castration chirurgicale ou chimique

La castration chirurgicale (ablation des 2 testicules) permet une réduction rapide de plus de 95% du taux de testostérone. La castration chirurgicale se réalise par orchidectomie ou pulpectomie. Le risque de cette opération est minime, mais le caractère irréversible du traitement dissuade les patients qui préfèrent alors s'orienter vers des traitements hormonaux médicamenteux.

La castration chimique consiste à utiliser des analogues de la LH-RH (pour Luteinizing Hormone Releasing Hormone, appelée aussi gonadolibérine) afin de diminuer le taux d'hormones sexuelles. En effet, la LH-RH est une petite hormone peptidique, synthétisée par les neurones hypothalamiques, qui stimule la synthèse et la libération des gonadotrophines hypophysaires, LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle Stimulating Hormone). La stimulation continue du récepteur à la LH-RH produit une désensibilisation du récepteur et une inhibition de la libération de LH et par conséquent une diminution de la production de testostérone (Figure 8).

Les agonistes de la LH-RH (goserelin, leuprorelin, buserolin) augmentent la production de LH dans les premiers temps, produisant ainsi un pic sécrétoire transitoire de testostérone, connu sous le nom de « flare effect » qui peut temporairement provoquer une accélération de la croissance tumorale. Pour éviter cet effet, le traitement est accompagné de la prise d'anti-androgènes par les patients.

- les anti-androgènes périphériques

Les anti-androgènes stéroïdiens (acétate de cyprotérone) ou non stéroïdiens (bicalutamide, flutamide et nilutamide) sont des inhibiteurs compétitifs de la DHT et de la testostérone et vont ainsi bloquer la liaison ligand-récepteur. Ces anti-androgènes, qui offrent une meilleure qualité de vie au patient, peuvent être utilisés ou non en combinaison avec la castration de manière à obtenir un blocage total des androgènes.

Un nouveau membre de la famille des anti-androgènes (MDV3100) fait actuellement l'objet d'essais cliniques. Cet antagoniste du RA a une affinité beaucoup plus importante pour le récepteur et inhibe sa translocation vers le noyau (Tran et al., 2009).

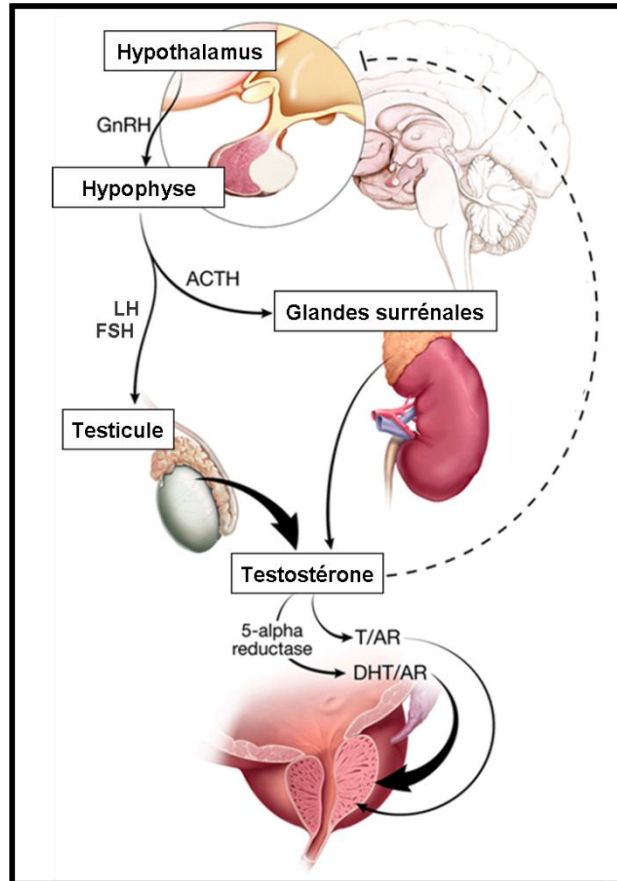


Figure 8 : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire responsable de la production d'androgène et de la régulation hormonale de la prostate

- les antagonistes de la LH-RH

L'utilisation d'antagonistes à la LH-RH (degarelix, abarelix) est une nouvelle génération de castration chimique. Ils ont un mode d'action rapide, similaire à la castration chirurgicale (résultat visible après une journée de traitement) et ont l'avantage de ne pas déclencher de « flare effect » (Van Poppel, 2010).

- l'utilisation d'inhibiteurs de la 5 α -réductase

La 5 α -réductase, une enzyme avec 2 isoformes (de type 1 et de type 2), convertit la testostérone en dihydrotestostérone (DHT). Son expression est associée au cancer de la prostate, avec l'expression de l'isoforme de type 1 augmentant dans les cancers par rapport aux HBP alors que celle de type 2 augmente seulement dans les HBP (Thomas et al., 2008).

Les inhibiteurs de la 5 α -réductase sont le finastéride et le dutastéride et permettent de diminuer la DHT circulante respectivement de 70% et 95%.

2. Echappement thérapeutique

Malgré une réponse initiale excellente aux traitements anti-androgéniques, dans la plupart des cas, la tumeur prostatique progresse vers un stade androgéno-indépendant, hormono-réfractaire, dit « castration-résistant » (Figure 9). En effet, les cellules cancéreuses prostatiques hormono-réfractaires se comportent comme si les androgènes étaient toujours présents alors que le patient est maintenu castré. Une fois cette étape franchie, la survie moyenne du patient est de 18 à 24 mois (Attar et al., 2009). Afin d'améliorer la qualité de vie et la survie de ces patients, la chimiothérapie (molécules : docetaxel ou paclitaxel) est mise en place.

A l'heure actuelle, plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la transition du phénotype hormono-sensible au phénotype androgéno-indépendant comme décrit dans les parties suivantes. (Cabrespine et al., 2004).

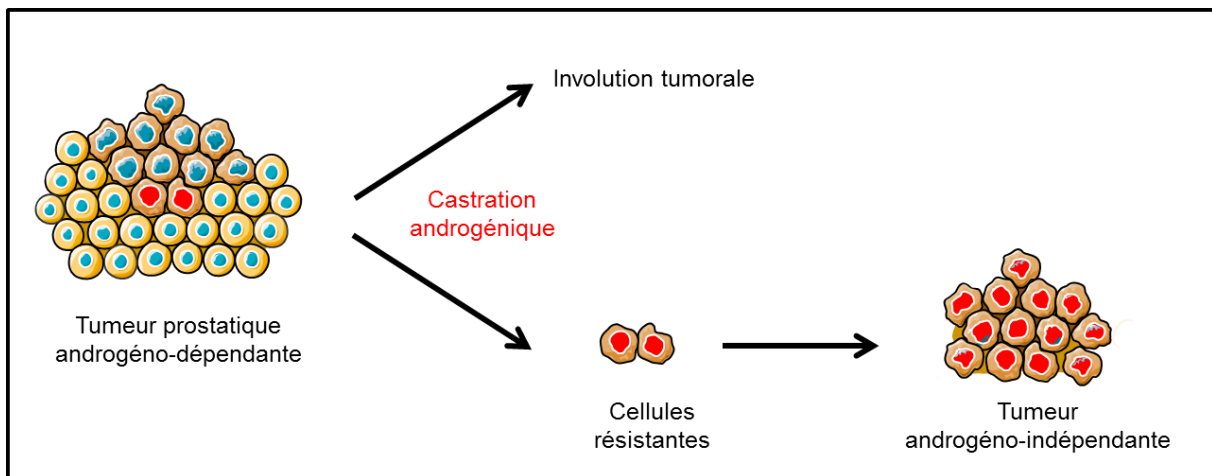


Figure 9 : Représentation schématique de la transition vers le phénotype androgéno-indépendant du cancer de la prostate

a. Le récepteur aux androgènes

Les androgènes ayant un rôle majeur dans le cancer de la prostate, cette transition vers l'androgéno-indépendance peut passer par l'altération du récepteur aux androgènes. En effet, via ces altérations, les cellules cancéreuses se comportent comme si les androgènes étaient toujours présents (Figure 10).

- **La surexpression quantitative du RA** par une amplification génique est observée dans 30 % des tumeurs hormono-résistantes alors que cette amplification n'est pratiquement jamais

observée dans les tumeurs primitives. Cette surexpression est également possible sans amplification génique mais par la stabilisation de la protéine ou par une augmentation de la translocation nucléaire ou encore par la régulation transcriptionnelle du gène de ce récepteur (Chen et al., 2004).

-La mutation du RA est un phénomène retrouvé plus fréquemment dans les cancers prostatiques métastatiques, et chez 10 à 30 % des patients ayant reçu une thérapie antiandrogénique. Les mutations les mieux caractérisées sont localisées au niveau du domaine de fixation du ligand, permettant ainsi d'élargir son panel de ligands. La mutation la plus étudiée (Thr877Ala), retrouvée chez de nombreux patients, a pour conséquence un changement de spécificité de récepteur, le rendant activable par plusieurs hormones stéroïdiennes (progestérone, œstradiol) et surtout par des anti-androgènes (4-hydroxyflutamide, métabolite actif du flutamide) (Veldscholte et al., 1992). Cela suggère donc que les anti-androgènes agissent de façon agoniste sur les cellules tumorales pour promouvoir leur croissance.

- Epissage alternatif de l'ARNm du récepteur conduisant à la suppression du domaine de fixation du ligand induisant une accumulation nucléaire de ce récepteur indépendamment du ligand.

- L'implication de co-facteurs, ou de protéines co-régulatrices, dans l'hormono-résistance du cancer de la prostate a également été étudiée. Ces protéines sont définies comme des protéines qui interagissent avec les récepteurs nucléaires afin d'augmenter ou de diminuer leur activation. Des études montrent que certains co-activateurs du RA (TIF2 (Transcriptional intermediary factor-2), SRC1 (Steroid receptor co-activator-1), ARA70 et ARA55) sont surexprimés dans les tumeurs prostatiques hormono-résistantes par rapport aux tumeurs hormono-sensibles (Gregory et al., 2001) (Fujimoto et al., 2001).

- L'activation du RA peut être indépendante de son ligand. En effet, ce mécanisme, que l'on appelle transactivation, passe par la phosphorylation du récepteur, dont les premiers messagers sont les facteurs de croissance (IGF-1, KGF, EGF) et les cytokines (IL6) (Culig et al., 1994). Ces messagers peuvent être d'origine endocrine, paracrine (alors produits par le stroma, la matrice extracellulaire ou encore par les cellules neuroendocrines), ou autocrine. Les effecteurs, les kinases intracellulaires (Akt, PKA, MAP-K), sont ensuite capables d'activer seules ou avec le peu d'androgènes restant le RA (Cabrespine et al., 2004).

b Inhibition de l'apoptose

Le maintien de l'homéostasie tissulaire repose sur deux mécanismes physiologiques opposés que sont la division cellulaire et l'apoptose. Une explication possible en faveur de l'échappement thérapeutique est le développement d'une résistance à l'apoptose.

L'apoptose est un phénomène physiologique menant à la mort cellulaire programmée qui est déclenchée lors de la sénescence, par des altérations de l'ADN trop importantes ne pouvant pas être réparées ou par une carence en facteurs de croissance. L'apoptose est caractérisée par une série d'événements biochimiques et morphologiques, comme le clivage de multiples protéines, l'exposition sur le feuillet externe de la cellule de la phosphatidyl sérine, une diminution du volume cellulaire et enfin d'une condensation accompagnée d'une fragmentation de la chromatine. L'apoptose est initiée par 2 voies différentes, une voie extrinsèque qui utilise les récepteurs de mort (CD95, APO1, Fas) et le TNF, et une voie intrinsèque impliquant les mécanismes mitochondriaux. Les enzymes effectrices et régulatrices de l'apoptose sont :

- les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) qui comprennent à la fois des protéines pro-apoptotiques (Bad, Bax, Bak, Bcl-xL) et anti-apoptotiques (Bcl-2) ;
- les caspases qui sont produites par les cellules sous forme inactive (procaspase) et doivent donc subir un clivage protéolytique pour être fonctionnelles ;
- les calpaïnes, protéases calcium-dépendantes

De plus, de nombreuses études ont montré le rôle pro-apoptotique du Ca^{2+} . En effet, les différents flux calciques (vidange des stocks calciques réticulaires notamment) et les compartiments cellulaires impliqués dans ce processus sont très étudiés (Mariot et al., 2000) ; (Vanoverberghe et al., 2004). Ainsi, il a été observé qu'une surcharge mitochondriale en Ca^{2+} ou l'activation de la protéine proapoptotique Bad suite à sa déphosphorylation par la calcineurine activée par le Ca^{2+} ou le clivage de la caspase 3 étaient des événements susceptibles de déclencher l'apoptose (Bernardi and Rasola, 2007). De plus, un stress réticulaire, résultat de la déplétion chronique de Ca^{2+} contenu dans le RE, induit un signal menant à la mort cellulaire (Breckenridge et al., 2003).

Une ou plusieurs altérations de ces voies peuvent contribuer à l'hormono-résistance des tumeurs prostatiques *via* une prolifération continue et une survie cellulaire en absence d'androgènes. (Uzzo et al., 2008).

-La voie de la famille Bcl-2. Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que Bcl-2 et d'autres protéines anti-apoptotiques, voient leur expression augmenter de manière significative dans

les cancers agressifs (Kajiwara et al., 1999) (Raffo et al., 1995). De plus, la surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL s'avère être plus élevée dans les tumeurs prostatiques de haut grade et métastatiques que dans les tumeurs de faibles grades. Dans les cellules « normales », les androgènes diminuent l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 telle que Bax, ce qui laisse penser que la surexpression de Bcl-2 et Bcl-xL joue un rôle clef dans la transition de la tumeur vers l'androgéno-indépendance (Figure 10). Deux études semblent montrer que cette surexpression est due à la perte de l'effet inhibiteur des androgènes sur Bcl-2. Enfin, il semblerait que l'expression de Bcl-2 soit corrélée à une augmentation d'expression de p21 et à une diminution de cycline D1 (Cabrespine et al., 2004). De même, la surexpression de Bcl-2 dans les cellules LNCaP (lignée prostatique tumorale androgéno-dépendante, (cf Matériels et méthodes) entraîne de profonds changements de l'homéostasie calcique, comme une réduction de l'expression de protéines chaperonnes du Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique (la calréticuline) et des pompes SERCA (Sarco/Endoplasmique/Reticulum Ca^{2+} -ATPase) (Vanden Abeele et al., 2002). Dans ce cas, la vidange calcique réticulaire, qui seule peut induire l'apoptose, ne permet plus d'induire la mort des cellules.

- **La voie TRAIL.** TRAIL est un agent cytotoxique qui induit l'apoptose en se fixant sur son récepteur DR5 (voie de récepteurs de mort). Le gène de ce récepteur se situe sur le locus chromosomique 8p21-22, région fréquemment délétée dans les cancers de la prostate, ce qui conduit à une résistance apoptotique (Sanlioglu et al., 2007).

- **La voie PI3K-Akt.** Physiologiquement, les signaux de survie induits par les androgènes entraînent la production de phosphatidylinositol(3,4,5) tris-phosphate (PIP3) à partir du PIP2 (phosphatidylinositol (3,4) bisphosphate) par la PI3 kinase (Phosphatidylinositide 3 kinase). Le PIP3 active ensuite la kinase Akt, qui par une cascade de voies de signalisation, va inhiber les caspases responsables de l'induction de l'apoptose. Un des mécanismes de résistance peut passer par la perte d'expression de PTEN (molécule dégradant le PIP3 en PIP2) ou par la surexpression de PI3K, aboutissant ainsi à une augmentation du signal de survie, PIP3 (Murillo et al., 2001).

c. Dérégulation de la croissance cellulaire

La prolifération anarchique et excessive des cellules peut aboutir à la formation de tumeurs cancéreuses. Ainsi des altérations de la prolifération cellulaire sont impliquées dans le cancer de la prostate. En effet, parallèlement à l'échappement thérapeutique suite aux traitements anti-androgéniques, une évolution du « phénotype paracrine » vers un « phénotype

autocrine » est observée. De plus, il a été démontré que les tumeurs androgéno-indépendantes prolifèrent de manière plus importante que les tumeurs sensibles aux androgènes (Zhou et al., 2004)

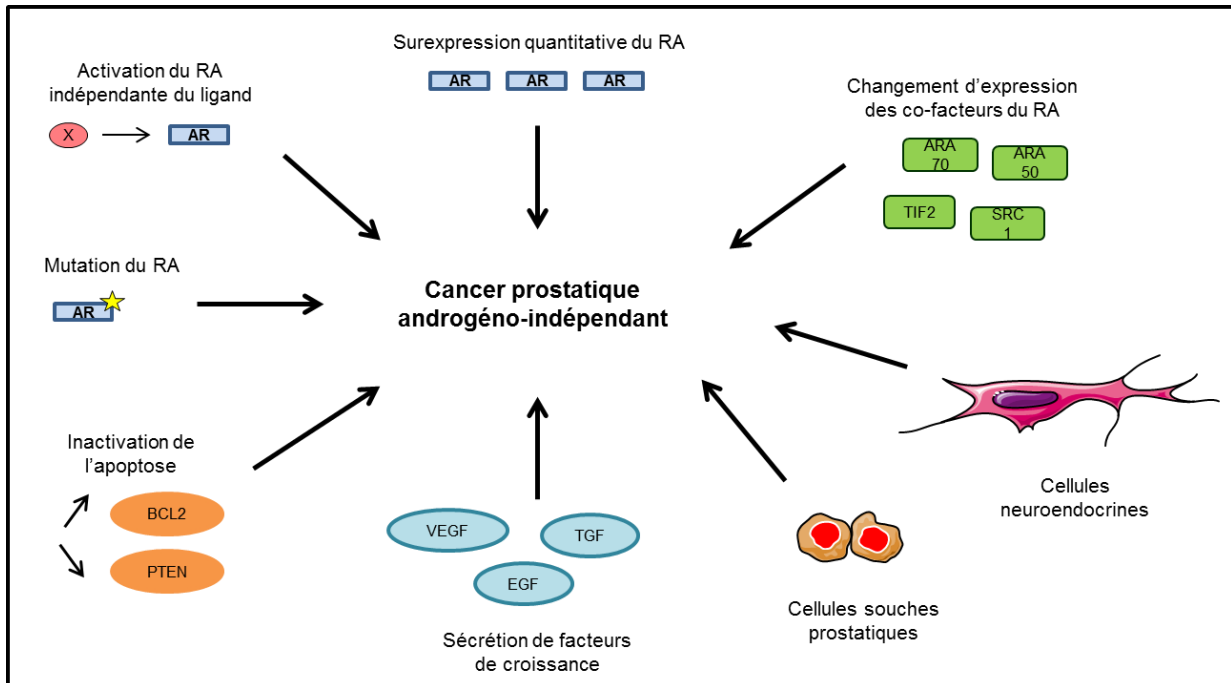


Figure 10 : Mécanismes participant à l'androgéno-indépendance des cancers prostatiques

Cette prolifération accrue est corrélée à une augmentation de la sécrétion de facteurs de croissance (EGF, TGF α , KGF, FGF, IGF1) par les cellules stromales ou épithéliales et de l'expression de leur récepteur (Figure 10) (Ishii et al., 2009) (Ligeza and Klein, 2011). Ces voies sont connues pour être impliquées dans la croissance cellulaire. En effet, les facteurs de croissance, comme par exemple IGF, et leurs récepteurs tyrosine kinase sont capables d'activer une cascade de signalisation induisant l'expression de différents gènes impliqués dans la croissance cellulaire et la survie. Plusieurs de ces voies activent des kinases (MAPK, Ras, Raf, PKC) qui influencent la régulation du cycle cellulaire et augmentent la prolifération *via* les facteurs de transcription AP1, cMyc et NF κ B (Edwards and Bartlett, 2005). En effet, Weber et collaborateurs ont montré que la récurrence du cancer de la prostate chez les souris castrées est corrélée à l'augmentation de l'expression et de l'activité de la MAPK (Weber and Gioeli, 2004).

Par ailleurs, plusieurs études démontrent que la croissance tumorale prostatique est notamment régulée par une sécrétion autocrine grâce aux couples EGF/EGFR, IGF/IGFR et FGF/FGFR (Bellezza et al., 2006) (Gennigens et al., 2006). Ligeza et collaborateurs ont

montré récemment que les cellules DU145 stimulent leur propre prolifération *via* une importante sécrétion autocrine de VEGF (Ligeza and Klein, 2011). En outre, ces différents facteurs de croissance sont régulés *via* l'axe hypothalamo-hypophysaire. En effet, la GHRH (Growth Hormone Releasing Factor ou somatolibérine), sécrétée par l'hypothalamus, stimule la sécrétion de GH (Growth Hormone) à partir de la glande pituitaire antérieure par l'intermédiaire de son récepteur GHRHR. La GH sécrétée peut ensuite stimuler la production des différents facteurs de croissance. Ces hormones peuvent également agir directement sur le tissu prostatique. En effet, de nombreuses études ont montré que la GHRH et son récepteur sont exprimés et impliqués dans différents types de cancers, dont le cancer de la prostate (Schally et al., 2008) (Havt et al., 2005) (Schally, 2008). De plus, la GHRH et GHRHR sont exprimés dans les cellules prostatiques cancéreuses et sont alors capables de stimuler leur prolifération *via* une sécrétion autocrine ou paracrine aussi bien dans les cellules androgéno-dépendantes qu'androgéno-indépendantes (Chopin and Herington, 2001). Une étude récente menée par Rick et collaborateurs montre que les antagonistes de la GHRH inhibent la prolifération et la croissance tumorale des cellules androgéno-indépendantes (Rick et al., 2011). Ces données suggèrent que cette boucle hormonale peut constituer une cible thérapeutique dans les traitements des cancers prostatiques.

d. Les cellules souches

La récurrence du cancer de la prostate suite à la suppression androgénique peut également s'expliquer par la présence de cellules souches au sein de la tumeur. La présence de ces cellules dans les tissus cancéreux prostatiques (Collins et al., 2005) et dans les lignées cellulaires (Hurt et al., 2008) a été montrée récemment sur les bases d'expression d'antigènes de surface, ces cellules ayant donc deux profils : $CD44^+/\alpha2\beta1/CD133$ ($\alpha2\beta1$ étant une intégrine) et $CD44^+CD24$ des protéines de surface (Lawson et al., 2007). Les cellules souches représentent une petite population de cellules quiescentes (1 à 15 %) avec un haut potentiel prolifératif et la capacité de composer un nouveau tissu *in vivo* (Richardson et al., 2004). Les caractéristiques moléculaires de ces cellules révèlent qu'elles ne possèdent pas de récepteurs aux androgènes et n'expriment ni la PAP ni le PSA, indiquant une survie androgéno-indépendante de ces cellules (Maitland et al., 2011). La castration peut alors favoriser la progression du cancer en causant une augmentation du nombre de cellules souches et/ou en activant ces cellules afin de former une nouvelle tumeur androgéno-indépendante (Figure 10). Une étude récente menée par Salvatori montre que les cellules souches, issues d'une population cellulaire de cellules DU145, possèdent la capacité de générer une tumeur

fortement agressive (Salvatori et al., 2012). Ainsi, de nombreuses études menées sur divers cancers concluent que les cellules souches doivent être prises en considération lors de la conception de nouvelles thérapies afin d'éviter les rechutes (Frank et al., 2010) (Fabian et al., 2009).

e. Différenciation neuroendocrine

Dans la prostate humaine, les cellules neuroendocrines sont dispersées dans l'épithélium normal et représentent de 0,5 à 2% de la population cellulaire totale. Cependant, leur densité est augmentée dans les cancers hormono-résistants (Abrahamsson, 1999), ceci étant associé à un pronostic défavorable. Les cancers prostatiques présentant une différenciation neuroendocrine sont fréquemment caractérisés par la présence de foyers de cellules neuroendocrines au sein des cellules malignes. Les cellules neuroendocrines sont présentes dans la majorité des cancers de la prostate mais sont retrouvés en très grand nombre dans seulement 5 à 10% d'entre eux (Gluck et al., 2012). La présence de cellules neuroendocrines dans les cancers de la prostate entraîne une diminution du taux de survie (35% de survie sur 2 ans) en comparaison avec des cancers dans lesquels ces cellules sont absentes (97% de survie sur 2 ans) (Ranno et al., 2006).

Les cellules neuroendocrines sécrètent de nombreux facteurs peptidiques tels que la somatostatine, la bombésine, la calcitonine, ou encore des amines biogènes comme la sérotonine (Sun et al., 2009). Plusieurs études montrent que la bombésine est impliquée dans la prolifération des cellules tumorales (Stangelberger et al., 2005) (Xiao et al., 2005). Ces cellules n'expriment ni le PSA ni le récepteur aux androgènes et sont donc insensibles aux traitements androgénique (Huang et al., 2006) (Bonkhoff, 2001). En effet, une étude montre que les traitements anti-androgéniques augmentent le nombre de cellules neuroendocrines dans les tumeurs (Hirano et al., 2004), laissant penser qu'il existe une sélection cellulaire en faveur de celles-ci. De plus, ces cellules qui semblent quiescentes, n'expriment pas de marqueurs de prolifération cellulaire comme Ki67, mais interviennent dans la prolifération de cellules avoisinantes *via* la sécrétion de facteurs mitogènes (Alberti, 2010) (Bonkhoff et al., 1991). Enfin, ces cellules sont résistantes à l'apoptose (Vanoverberghe et al., 2004). En outre, il existe une corrélation entre le nombre de cellules neuroendocrines, la vascularisation de la tumeur et le grade tumoral (Grobholz et al., 2000). Une étude montre que l'expression de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le taux de cellules neuroendocrines exprimant VEGF sont associés à la densité des microvaisseaux et au grade cancéreux (Borre et al., 2000). De plus, il a été démontré que la bombésine, un facteur libéré par les cellules

neuroendocrines, augmente l'expression de VEGF tandis que la calcitonine, également sécrétée par les cellules neuroendocrines, peut stimuler l'angiogenèse en agissant directement sur les cellules endothéliales (Levine et al., 2003). Ces données suggèrent que les cellules neuroendocrines, *via* la sécrétion de facteurs, peuvent moduler la croissance tumorale en stimulant la prolifération des cellules épithéliales et/ou en favorisant l'angiogenèse.

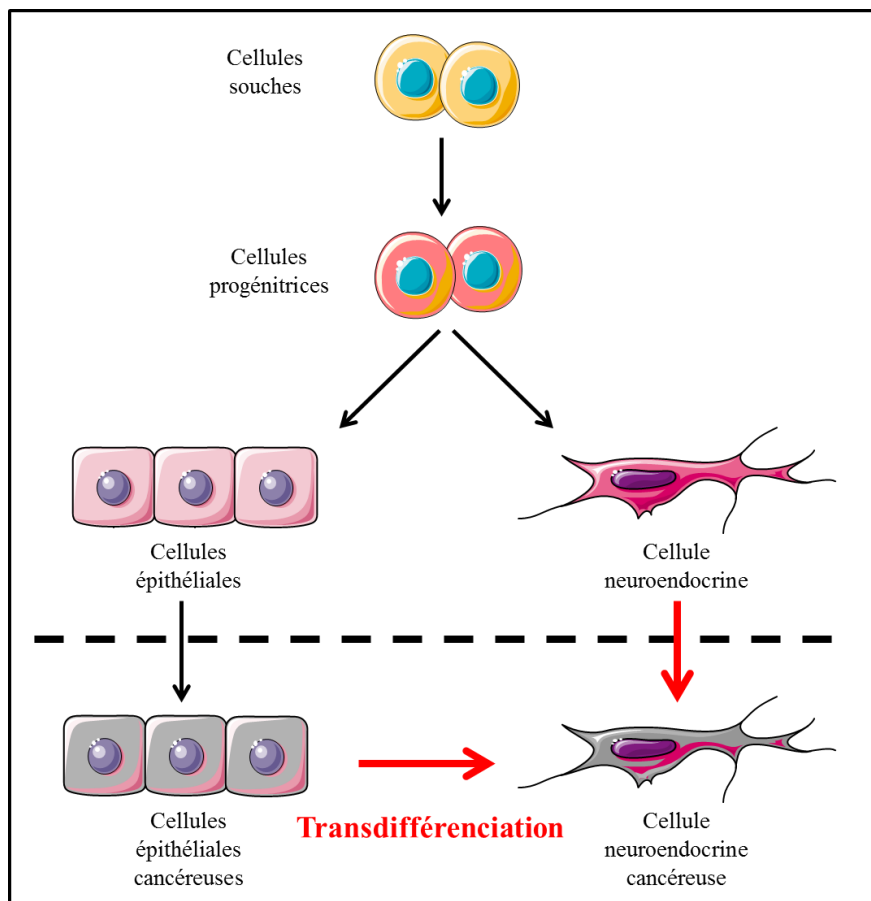


Figure 11 : Origine des cellules neuroendocrines prostatiques cancéreuses

Au niveau moléculaire, il est possible de distinguer des cellules neuroendocrines normales et cancéreuses. En effet, les cellules normales expriment CK5 (marqueur des cellules basales) tandis que les cellules neuroendocrines tumorales expriment CK18 (marqueur des cellules luminales) (Marcu et al., 2010). De la même manière, une étude démontre l'existence d'une corrélation entre le niveau d'expression de Bcl-2 et de NSE dans les cancers prostatiques, alors que les cellules normales n'expriment pas la protéine Bcl-2 (Yuan et al., 2007). De plus, une analyse génétique a montré que les cellules neuroendocrines cancéreuses partagent un profil allélique identique à celui des cellules épithéliales cancéreuses, mais différent des cellules normales neuroendocrines (Sauer et al., 2006). Ces différences entre cellules

neuroendocrines normales et cancéreuses pourraient être expliquées par leur origine. Deux hypothèses s'opposent sur l'origine des cellules neuroendocrines prostatiques cancéreuses mais il est de plus en plus clair que ces cellules sont différentes des cellules neuroendocrines normales (Figure 11). Pour certains auteurs, les cellules neuroendocrines cancéreuses et normales proviendraient d'une même origine, des cellules souches intermédiaires qui subiraient ensuite une différenciation neuroendocrine et une prolifération accrue lors de l'évolution cancéreuse (Bonkhoff et al., 1995) (Bonkhoff, 1998). D'autres auteurs suggèrent que les cellules neuroendocrines de l'adénocarcinome sont issues d'une transdifférenciation à partir de cellules épithéliales luminales cancéreuses (Sun et al., 2009). Dans ce contexte, de nombreuses études sur les modèles animaux, sur les lignées cellulaires et sur des cultures primaires de cellules issues de cancer montrent que plusieurs mécanismes mènent à la transdifférenciation des cellules cancéreuses prostatiques épithéliales en cellules neuroendocrines : la déplétion en androgène, une augmentation de la concentration cytosolique d'AMPc et la voie de signalisation de IL-6 (Yuan et al., 2007). Cependant, d'autres voies sont actuellement étudiées :

- **L'interleukine 6** peut réguler la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP en activant diverses voies de transduction : STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), PKA (Protein Kinase A), PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) (Mori et al., 2009) (Wang et al., 2004) (Deeble et al., 2001). Récemment Wu et collaborateurs ont montré que la voie PI3K-Akt-mTOR (Akt ou PKB pour Protein Kinase B, mTOR pour Mammalian Target of Rapamycin) est essentielle et suffisante pour induire la différenciation neuroendocrine (Wu and Huang, 2007).

- **La déplétion en androgènes** s'accompagne d'une augmentation du nombre de cellules neuroendocrines dans les cancers de la prostate. Plusieurs études menées sur les cellules LNCaP montrent qu'une déplétion de stéroïdes induit un changement phénotypique des cellules, avec l'apparition de prolongements et l'augmentation de NSE (Marchiani et al., 2010) (Yuan et al., 2006) (Mariot et al., 2002). Comme l'IL-6, la déplétion en androgènes active la voie de signalisation PI3K. De plus, IGF-1 peut également induire la différenciation *via* l'activation d'Akt (Komiya et al., 2009). Enfin, la déplétion androgénique aboutit à une augmentation de la concentration d'AMPc, également corrélée à la différenciation (Cox et al., 2000).

- **L'activation de la voie PKA** par l'élévation du taux d'AMPc induit la différenciation neuroendocrine (Cox et al., 2000). En effet, Bang et collaborateurs sont les premiers à montrer en 1994 que des traitements augmentant la concentration cytosolique d'AMPc

provoquent la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP (Bang et al., 1994). Cette différenciation s'accompagne de changements morphologiques, prolongements de type neurites, et moléculaires, expression de NSE, CgA et neuropeptides. En effet, la différenciation est induite au niveau des cellules LNCaP par des traitements combinant des analogues perméants de l'AMPC avec des inhibiteurs de la phosphodiesterase, par la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase, par l'épinéphrine, un agoniste du récepteur β -adrénergique (Cox et al., 1999) ou par le PACAP (Pituitary adenylylating polypeptide) (Farini et al., 2003). De plus, comme l'a montrée une étude, la surexpression de la sous-unité catalytique de la PKA entraîne à elle seule, sans autres stimulateurs, la différenciation tandis qu'un mutant négatif de la PKA l'inhibe (Cox et al., 2000). Une étude récente, menée par Jones et Palmer, signale d'autre part que les changements morphologiques observés lors de la différenciation neuroendocrine avec l'expansion des neurites notamment, sont dus à l'inhibition de rhoA (Ras Homolog gene family A) *via* sa phosphorylation par la PKA conduisant à l'inhibition de la voie ROCK (Rho Associated Coiled-coil containing protein Kinase) (Jones and Palmer, 2012).

Enfin, d'autres voies de signalisation peuvent intervenir dans l'induction de la différenciation neuroendocrine, comme celles des facteurs de croissance, tel que l'EGF (Li et al., 2009).

II. Calcium et canaux voltage dépendants

A. Homéostasie calcique

Le calcium, de par ses propriétés chimiques spécifiques (divalence, large rayon ionique), possède une affinité importante pour les ligands à base d'oxygène (groupements carbonyle, carboxylique). Cet ion a donc un rôle unique en biologie puisqu'il est capable de se lier, plus que tout autre ion, à un très grand nombre de protéines (qu'on qualifie de calcium-dépendantes) et de ce fait permet de réguler leur activité biologique ou leur stabilité. Le calcium joue ainsi un rôle d'interrupteur dans l'activation ou l'inactivation de ces protéines ou dans leur stabilité (Kordel, 1994). Cette propriété, une très grande réactivité chimique, est nécessaire à la propriété de second messenger de l'ion calcium.

D'autre part, le calcium est le métal le plus abondant du corps humain (2% de la masse totale), une grande partie étant fixée dans l'os. La concentration de calcium dans le milieu intérieur est de l'ordre de 1 à 2 mM. La concentration de calcium est finement régulée au sein de l'organisme, entre les différents compartiments organiques (os et milieu intérieur) et au sein même des cellules dans les différents compartiments subcellulaires. Les cellules

dépensent une bonne partie de leur métabolisme, pour maintenir une concentration de calcium très faible dans le cytosol, environ 10000 fois moindre que dans le milieu intérieur. La concentration de calcium libre cytosolique est ainsi de l'ordre de 10^{-7} M. Au niveau cellulaire, l'homéostasie calcique résulte d'un équilibre entre influx et efflux de calcium à travers la membrane plasmique et entre stockage et libération de calcium des réserves intracellulaires. De plus, les organites intracellulaires, réticulum endoplasmique et mitochondries notamment, constituent des réserves calciques dont les concentrations sont comparables à celle du milieu extracellulaire. Par conséquent, il existe un gradient très important de part et d'autre des membranes plasmique et réticulaire. Ce gradient participe à la genèse d'une force motrice favorisant, à l'occasion de l'ouverture de canaux calciques, la diffusion passive du calcium depuis le milieu extérieur (ou le réticulum endoplasmique) vers le cytosol. Ces mécanismes de diffusion passifs par des canaux permettent aux cellules de générer des augmentations importantes (de quelques dizaines de nM à quelques centaines de μ M localement) de la concentration de calcium libre cytosolique, engendrant des signaux calciques, qui se distinguent selon leur cinétique, leur amplitude et leur localisation cellulaire. Le gradient (calcique), qui entretient une concentration basale de calcium faible dans le cytosol, est donc également une condition nécessaire à la propriété de messenger intracellulaire du calcium.

Les mécanismes concourant à l'homéostasie calcique cellulaire impliquent de nombreux acteurs (calcium toolkit ou boîte à outils calcique) : des transporteurs calciques assurant les transports actifs (les pompes ou Ca^{2+} ATPase ainsi que les échangeurs, contre le gradient de concentration calcique (que je ne présenterai pas ici)) ou facilités du calcium (les canaux calciques), les protéines tampons (chélateurs calciques intracellulaires), des enzymes calcium-dépendantes, des protéines senseurs de calcium, ainsi que les organelles (réticulum, mitochondrie, Golgi...) impliqués dans le stockage du calcium. L'ensemble de ces mécanismes est regroupé sous le terme d'homéostasome calcique.

Ainsi chaque phénotype cellulaire, sain ou pathologique, est caractérisé par « une signature calcique » particulière qui va dépendre de cet homéostasome calcique (Schwaller, 2012). Chaque acteur va contribuer à la signature calcique et par conséquent participer à la régulation cellulaire.

1. Signaux et signature calcique

Les signaux calciques sont de différentes natures en fonction de leur localisation, de leur amplitude, de leur durée et de leur fréquence. Les différentes variétés des signaux calciques reflètent leurs propriétés spatio-temporelles. Ainsi, on parle d'un pic calcique (« calcium

spike») lors d'une augmentation transitoire de calcium. Cependant, outre ces « calcium spikes », on peut parler de « puff », de « spark » et de « burst ». Le « puff » correspond à une entrée transitoire de calcium d'une amplitude de 50 à 600 nM qui s'étend sur 6 µm avec une durée totale de 1 seconde (Bootman et al., 2001). Les premiers « puff » calciques ont été observés dans les oocytes de xénopes. Le « spark » présente également une augmentation transitoire de calcium induite par les canaux RyR. La vague calcique correspond à la diffusion du calcium intracellulaire issu d'un pic calcique au niveau cellulaire ou tissulaire. Enfin, l'association et la répétition de ces pics calciques vont engendrer des oscillations calciques (Bootman and Berridge, 1995).

Du point de vue physiologique, les signaux calciques sont impliqués dans de multiples processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la contraction, la sécrétion ou l'excitabilité. En effet, un signal calcique dans une même cellule peut aboutir à plusieurs réponses. C'est le cas par exemple des cellules neuronales, où le calcium joue un rôle central dans la réception du signal, dans la neurotransmission, dans la régulation de l'excitabilité et dans l'expression génique. La signature doit par conséquent être finement régulée et définie par plusieurs paramètres fondamentaux afin d'engendrer une réponse bien précise. Ces paramètres sont la localisation, la durée ou la cinétique, la fréquence et enfin l'amplitude ou l'intensité du signal calcique, mis en évidence grâce aux méthodes d'imagerie reposant sur l'utilisation d'indicateurs calciques fluorescents (Berridge et al., 2000).

a. La localisation subcellulaire des signaux

Un signal calcique peut être limité dans l'espace, donc dit local, ou être étendu à l'ensemble de la cellule, dit global. Cette différence spatiale va contribuer aux différentes réponses physiologiques observées (Figure 12). En effet, il existe des microdomaines calciques (de 10 à 100 nm environ) à proximité des canaux ioniques notamment qui vont permettre l'activation des cibles spécifiques de la signalisation calcique situées dans ces microdomaines. Dans les synapses, lors de l'exocytose, les cellules vont utiliser des protéines d'échafaudage spécialisées telles que les SNARE couplées aux canaux calciques voltage-dépendants, notamment N et P/Q, qui permettent, *via* une entrée de Ca^{2+} , la libération du neurotransmetteur. Ce couplage est qualifié de nanodomaine s'il ne fait intervenir qu'un seul canal calcique, ou de microdomaine si plusieurs canaux calciques sont impliqués et permet une exocytose extrêmement rapide (Augustine, 2001). La synaptotagmine, une protéine intégrée à la membrane vésiculaire, qui possède des domaines de liaisons au Ca^{2+} et aux phospholipides, va interagir avec la membrane plasmique afin de mettre en place l'exocytose

(Augustine, 2001). Des mutations touchant la synaptotagmine-1 réduisent la libération de neurotransmetteur parallèlement à une diminution de sa liaison Ca^{2+} -dépendante aux lipides membranaires (Fernandez-Chacon et al., 2001). De plus, il a été montré que les sites d'exocytose et d'endocytose sont colocalisés avec les canaux VOCS (Voltage-Operated Channels), canaux calciques voltage-dépendants de type L, dans les neurones bipolaires de la rétine (Llobet et al., 2003). Par la technique de TIRFM, (total internal reflection fluorescence microscopy) cette même équipe a démontré que le calcium entre dans la cellule par les canaux voltage-dépendants (VOCs), ce qui crée un microdomaine calcique responsable de la libération de vésicules de sécrétion dans un rayon de 200 nm (Beaumont et al., 2005). Un autre exemple de l'importance de la localisation subcellulaire a été montré dans les cellules Hela, où l'histamine déclenche des puffs calciques situés à 2-3 μm de l'enveloppe nucléaire. Ces variations calciques brèves sont ensuite capables de diffuser rapidement directement vers le noyau afin de réguler la transcription génique (Lipp et al., 1997).

A l'inverse, les variations de calcium peuvent avoir un effet plus global au niveau cellulaire comme l'implication des vagues calciques dans la contraction musculaire (Kovac et al., 2008). En outre, les signaux calciques peuvent se transmettre aux cellules adjacentes *via* des jonctions «gap» qui permettent de diffuser l'information et donc d'avoir un effet généralisé au niveau tissulaire. Une étude montre par exemple que l'injection d'IP₃, dans les cellules de l'épithélium des glandes salivaires, déclenche une augmentation calcique dans la cellule stimulée mais que cette augmentation calcique se propage dans les cellules avoisinantes non stimulées (Zimmermann and Walz, 1999).

b. Durée et cinétique des signaux

La réponse calcique peut varier en fonction de la fréquence ou de la durée des oscillations calciques. De même, les vagues calciques, selon leur fréquence et le tissu où elles sont initiées vont engendrer des réponses différentes (Figure 12) (Uhlen and Fritz, 2010). On observe par exemple une oscillation calcique toutes les 10 à 200 sec dans les cellules β pancréatiques ce qui permet la sécrétion d'insuline (Berggren et al., 2004) (Dyachok et al., 2008). A contrario, la période des oscillations calciques permettant la production d'interleukine en réponse à l'ATP dans les macrophages est de 12 minutes (Hanley et al., 2004). De la même façon, dans les voies aériennes, une étude montre que la vitesse des battements ciliaires est dépendante de l'amplitude et de la fréquence des oscillations calciques (Lansley and Sanderson, 1999). Ainsi, la cellule peut répondre au changement d'intensité de stimuli en variant la fréquence des vagues et des oscillations calciques. Les cellules ont par conséquent développé un

système moléculaire afin de décoder les signaux calciques. Ce système est composé de protéines chélatrices (Ca^{2+} Binding Protein ou CBP) présentes aussi bien dans le cytosol (paralbumine, calréticuline et calmoduline) (Ikura et al., 2002) que dans le réticulum endoplasmique (calréticuline, calséquestrine, calnexine) (Michalak et al., 2002). L'une des protéines principales intervenant dans le « décodage » de la fréquence des signaux calciques est la CAMKII, composée de plusieurs sous-unités identiques qui sont activées à des degrés différents selon la fréquence des oscillations calciques (De Koninck and Schulman, 1998).

De même, la fréquence des oscillations calciques peut agir sur l'expression génique *via* l'activation de facteurs de transcription. En effet, 2 facteurs de transcription sensibles au calcium (NFAT et NF- κ B) permettent la transcription du gène de l'interleukine 2 (IL-2) dans les lymphocytes B de manière fréquence-dépendante. Ainsi, il a été montré qu'une période d'oscillations calciques de 1800 secondes active le facteur de transcription NF- κ B tandis qu'une période plus courte de 400 secondes active NFAT (Dolmetsch et al., 1998). De ce fait, la cinétique des vagues calciques peut provoquer divers phénomènes *via* l'activation de voies différentes.

c. Amplitude et intensité des signaux

Cette dernière caractéristique peut également encoder l'information (Figure 12). Afin d'activer les protéines effectrices intervenant dans la signalisation calcique, les événements calciques vont se sommer pour atteindre le seuil d'activation de ces protéines. En effet, chaque protéine senseur de calcium (calmoduline, calnexine, calréticuline, gelsoline, calséniline, troponine C, calcineurine, protéine S100.....) possède plusieurs domaines EF-Hand ou des domaines C2 (synaptotagmine, PKC...) capables de fixer le calcium (Ikura, 1996) lui conférant une affinité spécifique pour le calcium, qui détermine le seuil de concentration calcique à partir duquel ces protéines sont activées. Ces seuils sont très différents d'une protéine à une autre, ce qui leur permet d'être activées de manière ciblée. La synaptotagmine présente par exemple des domaines C2 (C2A et C2B) possédant des affinités pour le calcium comprises entre 100 μM et 1 mM (Radhakrishnan et al., 2009). Ceci lui permet d'être activée uniquement en présence d'une concentration importante de calcium, c'est-à-dire lorsqu'elle se trouve dans le microdomaine calcique généré par le canal calcique voltage-dépendant situé à quelques nm. En revanche, la calmoduline possède un K_d de $5 \cdot 10^{-7}$ M à $5 \cdot 10^{-6}$ M pour le calcium (Chin and Means, 2000). De plus, cette protéine possède 2 domaines de type EH-Hand, l'un situé en C-terminale dispose d'une forte affinité pour le calcium, l'autre en N-terminale possède une faible affinité. Ceci permet aux deux domaines

d'interagir indépendamment l'un de l'autre (Tadross et al., 2008). De plus, plusieurs CBP, dont le K_d est inférieur à 10^{-7} M, jouent un rôle sur le temps de séquestration du Ca^{2+} tandis que les CBP avec un K_d supérieur à 10^{-5} M ne jouent pas de rôle en tant que tampon calcique (Chin and Means, 2000).

Enfin, il a été montré que les cellules peuvent interpréter des changements minimes de la concentration en Ca^{2+} en activant sélectivement la transcription de certains gènes (Dolmetsch et al., 1997).

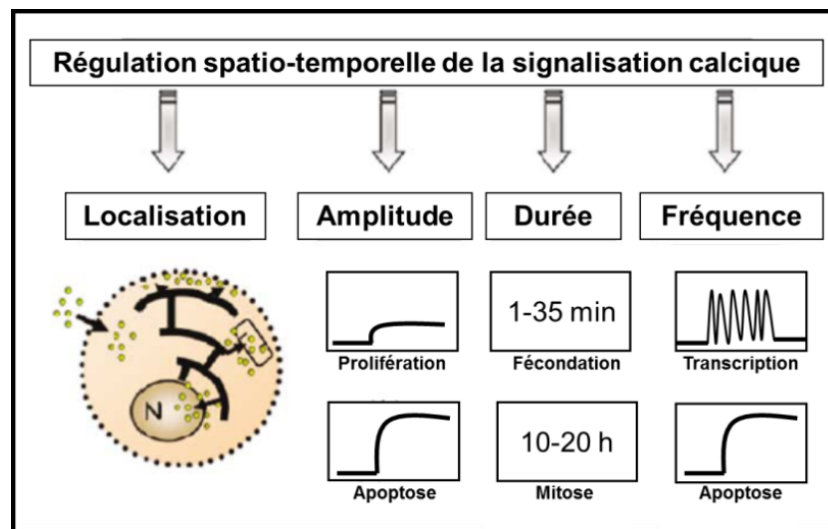


Figure 12 : Régulation spatio-temporelle du signal calcique (d'après Prevarskaya et al., 2007)

2. Calcium et transcription

En 1986, Greenberg et collaborateurs montrent qu'une entrée de calcium induite par un agoniste cholinergique dans les cellules PC12, lignée cellulaire neuronale différenciée, est capable de provoquer l'expression de certains gènes, le proto-oncogène *cfos* et le gène de l'actine (Greenberg et al., 1986). Depuis une trentaine d'années, de nombreux travaux cherchent à comprendre et à caractériser les mécanismes moléculaires utilisés par la cellule pour transformer un signal calcique cytosolique en un signal spécifique agissant sur l'expression génique (Crabtree, 2001) (Hardingham et al., 2001) (Valdes et al., 2013). En effet, une forte augmentation de la concentration de calcium cytosolique, induite par l'activation des canaux calciques de type L, est responsable de la transcription de gènes par l'intermédiaire du facteur de transcription CREB (Wheeler et al., 2008). La modification de l'expression génique peut être induite par des changements de concentration calcique à la fois au niveau du cytoplasme et/ou du noyau (Bading, 2000) (Hardingham et al., 1997). Les variations cytoplasmiques de la concentration de calcium libre activent des messagers qui

transitent jusqu'au noyau afin d'atteindre les effecteurs adéquats et modifier l'expression génique, tandis que les variations de calcium nucléaires agissent directement sur les gènes. Le calcium peut alors activer diverses voies en parallèle via l'activation de plusieurs facteurs de transcription (Alonso and Garcia-Sancho, 2011; Papadia et al., 2005).

a. Voies de transduction régulées par les kinases calcium-dépendantes

Ces voies font intervenir principalement deux familles de kinases, les CaM kinase (Ca^{2+} /Calmoduline dependant kinase) et les PKC (Protein Kinase C) qui permettent l'activation de facteurs de transcription tels que NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) et CREB (Cyclic AMP Response Element Binding).

- Les kinases PKC et CaMK

La famille des PKC, qui regroupe 11 isoenzymes calcium-dépendantes, est divisée en 3 groupes basés sur leur structure et sur leur capacité de réponse au calcium et au DAG (Diacylglycerol) (Newton, 1995).

Tout d'abord, les PKC conventionnelles (α , β I, β II et γ) sont régulées par le DAG et par le calcium, puis les nouvelles PKC (δ , ϵ , η et θ) seulement par le DAG et enfin les PKC atypiques (ζ , λ et μ) ne sont régulées ni par le DAG ni par le calcium.

Plusieurs études ont montré que la PKC sensible au calcium active la transcription génique *via* NF- κ B (Saijo et al., 2002) (Su et al., 2002). De plus, la PKC est également impliquée dans l'expression génique en augmentant l'activité nucléaire de l'acétyltransférase (HAT) (Muniyan et al.). Ce mécanisme a été décrit dans les cellules de l'épiderme où le calcium induit la différenciation et l'expression de certain marqueurs *via* une augmentation de l'activité HAT (Dlugosz and Yuspa, 1993).

Les CaMK sont des sérine-thréonine kinases avec un domaine N-terminal catalytique et un domaine C-terminal régulateur qui inclut le domaine de liaison au complexe Ca^{2+} /calmoduline (Mellstrom et al., 2008).

Il existe 3 types de CaMK, CaMKI, CaMKII et CaMKIV. Seule CaMKII a une structure multimérique tandis que CaMKI et CaMKIV sont monomériques. Ces kinases vont avoir des modes d'activation différents basés sur leur structure. En effet, CaMKI et CaMKIV vont être phosphorylées par des CaM kinase kinase alors que la CaMKII nécessite la liaison du complexe Ca^{2+} /calmoduline pour s'autophosphoryler sur la Th286 et s'activer. Suite à cette autophosphorylation, cette kinase devient Ca^{2+} /calmoduline indépendante. L'activité de cette CaMK peut être interrompue à travers l'action de phosphatases spécifiques, PP1, PP2A et PP2C (Protein Phosphatase family) ou par d'autres autophosphorylations comme notamment

sur les résidus Th305 et Th306 (Colbran, 2004). Enfin, les CaMK ont une distribution cellulaire différente. Ainsi la CaMKI est exclusivement cytoplasmique tandis que les CaMKII et CaMKIV sont essentiellement nucléaires.

Ces CaMK sont souvent associées à une activité directe de phosphorylation sur la protéine CREB (Sackmann et al., 2011), CBP (Ca²⁺ binding protein) et à la translocation de NF-κB. Il a été démontré que la CaMKII active le facteur de transcription NF-κB dans les lymphocytes T. Ainsi, en réponse à l'activation du TCR (T Cell Receptor), la translocation nucléaire de NF-κB peut-être bloquée par des inhibiteurs de CaMK, tel que KN93 (Hughes et al., 2001).

De plus, ces CaMK interviennent dans la modulation de l'expression génique. Ainsi, une étude menée sur les cellules myéloïdes montre que la CaMKII s'associe directement aux récepteurs RAR (Rétinoïc Acid Receptor). Cette colocalisation se fait sur les sites des gènes cibles de RAR (RAR ayant un rôle dans la transcription de gènes). CaMKII peut alors phosphoryler RAR et ainsi empêcher celui-ci de jouer son rôle (Si et al., 2007). De même, durant un exercice, dans les cellules musculaires, la CaMKII favorise l'expression de GLUT4 (Glucose Transporter 4) en jouant sur l'accessibilité de MEF2 à son site de liaison. Une inhibition de CaMKII diminue le niveau d'acétylation de site MEF2 et empêche donc ce facteur de se fixer et de jouer son rôle de facteur de transcription (Smith et al., 2008).

- les facteurs de transcription NF-κB et CREB

Le facteur de transcription *NF-κB* est retenu dans le cytoplasme par une autre protéine appelée IκB (inhibiteur de κB) *via* de multiples motifs ankyrine. Cette association permet le masquage de signaux de localisation nucléaire. Son activation est alors rendue possible par une augmentation de calcium cytoplasmique qui va induire une cascade de phosphorylations (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). En effet, c'est la phosphorylation d'IκB par la CaMK ou par la PKC qui permet la dissociation de IκB/NF-κB et ainsi la translocation du facteur de transcription dans le noyau (Figure 13) (Theatre et al., 2009) (Moscat et al., 2003). NF-κB peut alors activer la transcription de gènes impliqués notamment dans la survie cellulaire et la prolifération. En effet, Hussain et collaborateurs montrent que les cellules de lymphome possèdent une activité constitutive de NF-κB et l'inhibition de la voie PI3K/AKT/NF-κB induit l'apoptose de ces cellules (Hussain et al., 2012). De même, une étude montre que la prolifération et la survie cellulaire sont diminuées avec une altération de la voie de signalisation IL6/STAT3/NF-κB (Lin et al., 2013).

CREB (Cyclic AMP response binding protein) est un facteur de transcription nucléaire. La protéine CREB reconnaît son élément de réponse CRE sur l'ADN et ainsi régule la transcription génique. Plusieurs gènes régulés par CREB ont été identifiés. On peut citer par

exemple le gène à réponse immédiate *c-fos*, le gène de la neurotrophine BDNF (Brain Derived Neurotrophin Factor), le gène de l'enzyme tyrosine hydroxylase et des gènes de neuropeptides tels que somatostatine, enképhaline et corticolibérine (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). La protéine CREB est activée par phosphorylation par différentes kinases (PKA, PKC, MAPK, ERK ou CaMK) ce qui permet son activité transcriptionnelle dans le noyau (Figure 13) (Alonso and Garcia-Sancho, 2011). Il a été montré par exemple qu'un microdomaine présentant une forte concentration calcique générée par un canal calcique voltage-dépendant de type L active la CaMKII, qui est alors transloquée dans le noyau afin d'activer la protéine CREB (Wheeler et al., 2008). Néanmoins, la phosphorylation de CREB n'est pas un indicateur fiable d'activation de gènes cibles, car des protéines partenaires sont nécessaires telles que CBP (CREB binding protein) et de protéines impliquées dans la transduction, TORCs (Transducers regulated CREB activity). Tout comme CREB, ces protéines sont aussi sensibles au calcium (Hardingham et al., 2001)

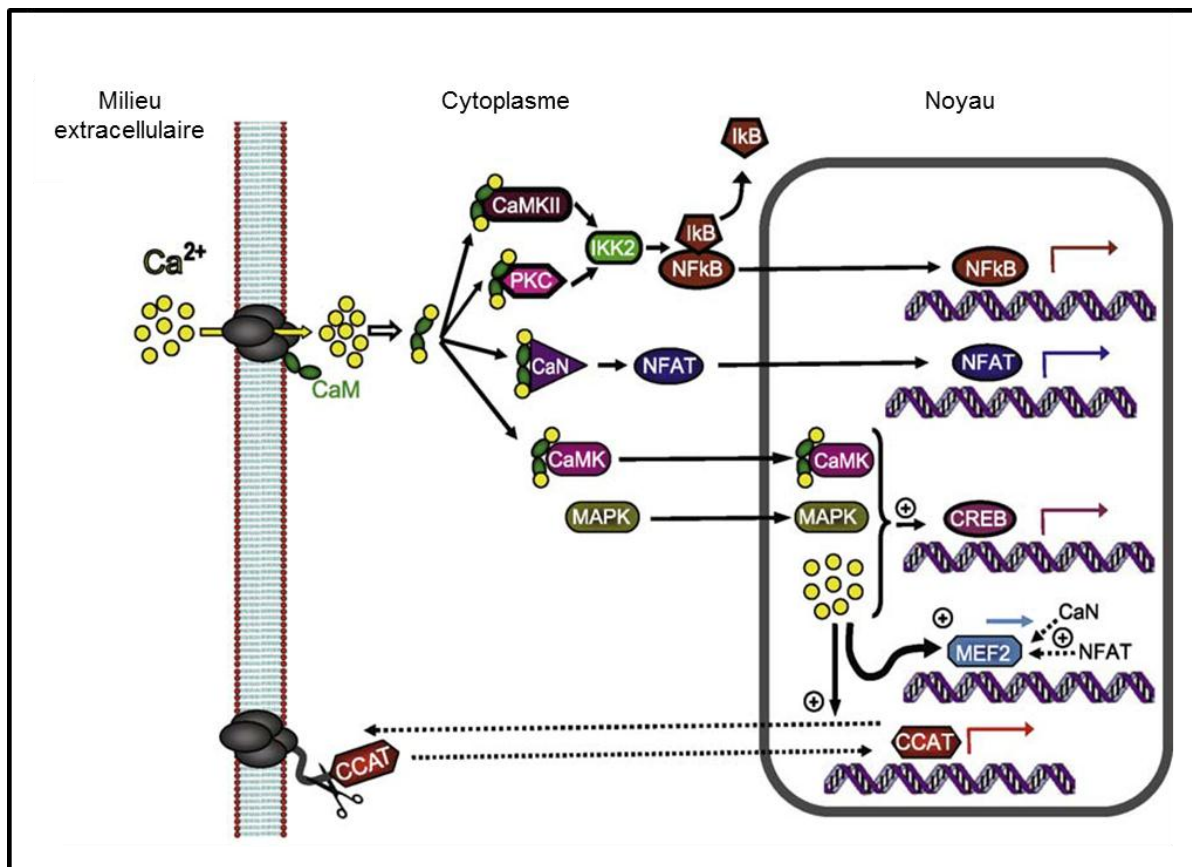


Figure 13 : Mécanismes de régulation de l'expression génique calcium-dépendante (d'après Alonso and Garcia-Sancho, 2011)

b. Voies de transduction régulées par phosphatases calcium-dépendantes

Ces voies font appel à une phosphatase majeure, la calcineurine.

- la calcineurine

La calcineurine ou PP2B (Protein phosphatase 2B) est une serine/thréonine phosphatase activée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline. Elle est composée d'une sous-unité catalytique A qui lie la calmoduline et d'une sous-unité régulatrice B qui fixe le calcium. La calcineurine est un intermédiaire transmettant les signaux calciques du cytosol au noyau régulant ainsi l'activité de trois facteurs de transcription, NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), TORC (Transducers of Regulated CREB protein) et MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor-2) (Figure 13). Elle peut ainsi interférer sur l'expression des gènes suite à une augmentation du calcium intracellulaire (Wada et al., 2002) (Swoap et al., 2000) (Crabtree, 2001). Des travaux montrent que parmi les gènes induits par l'activation de la calcineurine se trouvent des gènes des éléments intervenant dans la signalisation calcique. En effet, la calcineurine module l'expression de protéines intervenant dans l'homéostasie calcique comme le récepteur à la ryanodine ou le récepteur à l'IP3 (Genazzani et al., 1999) (Bultynck et al., 2003).

- NFAT

Les facteurs de transcription de la famille NFAT sont importants dans la réponse immunitaire, dans le développement du cœur et du muscle squelettique et enfin dans le système nerveux. Tout comme NF- κ B, NFAT est situé dans le cytoplasme et sa translocation nucléaire nécessite une activation calcique (Figure 13). En effet, le calcium se fixe sur la calmoduline et le complexe Ca^{2+} -CaM se lie à la calcineurine permettant son activation. La calcineurine ainsi activée déphosphoryle NFAT et expose les domaines NLS (Nuclear Localization Sequence) de ce facteur, domaines qui interviennent dans la translocation nucléaire. NFAT déphosphorylé est transloqué ensuite dans le noyau, se fixe sur son élément de réponse et active la transcription de gènes spécifiques du type cellulaire (Hogan et al., 2003) . La voie NFAT est inhibée par la cyclosporine A (CsA) ou par FK506 qui empêchent l'action de la calcineurine (Martinez-Martinez and Redondo, 2004) .

Par ailleurs, comparée aux autres mécanismes de régulation génique calcium-dépendants, la calcineurine a une affinité plus importante pour le complexe Ca^{2+} /calmoduline que la CaMKII. Ainsi, une augmentation de calcium, qu'elle soit brève ou maintenue, est suffisante pour activer NFAT, tandis que l'activation de NF- κ B nécessite des oscillations calciques de forte amplitude (Dolmetsch et al., 1997).

Par conséquent, les différents signaux calciques peuvent induire des expressions géniques différentes responsables, en partie, des diverses fonctions physiologiques impliquant le calcium.

c. La voie DREAM

DREAM (Downstream Responsive Element Antagonist Modulator) est une protéine multifonctionnelle appartenant à la famille des protéines calcium-senseur. DREAM, aussi appelé calséniline, est codé par KCNIP3, un gène codant pour un canal potassique qui interagit avec le calcium (Mellstrom et al., 2008). En fonction du type cellulaire et des conditions physiologiques, DREAM montre une localisation variée, dans le noyau, dans le cytoplasme ou à la membrane plasmique. Dans le noyau, DREAM joue un rôle de répresseur transcriptionnel en se liant à l'ADN (Carrion et al., 1999). De plus, une étude récente atteste que la translocation nucléaire de DREAM peut être régulée par la sumoylation (Palczewska et al., 2011). Dans le cytoplasme, DREAM peut être associée à diverses protéines. Ainsi, il a été démontré que DREAM peut interagir avec la préséniline, une protéase intervenant dans la maladie d'Alzheimer, et ainsi réguler son niveau de production (Buxbaum et al., 1998). De plus, dans le cerveau, la protéine DREAM s'associe au canal potassique Kv4 et par conséquent régule son expression membranaire et ses propriétés fonctionnelles (Ruiz-Gomez et al., 2007). En outre, une étude récente montre que DREAM interagit avec la calmoduline de manière calcium-dépendante et augmente l'activité de la calcineurine (Ramachandran et al., 2012). De plus, Ledo et collaborateurs ont montré l'existence d'une interaction protéique entre DREAM et CREB indépendamment de la phosphorylation de CREB. DREAM empêche alors le recrutement de CBP par phosphoCREB et réprime la transcription CRE-dépendante (Ledo et al., 2002). La protéine DREAM est fortement exprimée dans le cerveau mais également dans d'autres tissus tels que la glande thyroïde, les organes reproducteurs et le système immunitaire (Mellstrom et al., 2008).

Cette protéine calcium-senseur possède 4 sites de fixation au calcium de type EF-Hand, suggérant un mécanisme direct de régulation génique par le calcium. DREAM a la capacité de lier l'ADN *via* le site DRE de manière constitutive et de réprimer la transcription. En effet, une augmentation de calcium nucléaire provoque l'association Ca^{2+} /DREAM et diminue l'affinité de DREAM pour DRE (Figure14). Par conséquent, il y a dissociation du complexe et arrêt de la transcription. DREAM est donc un répresseur transcriptionnel capable de détecter des variations calciques au niveau nucléaire et de réguler directement l'expression de gènes cibles dans de nombreux tissus comme le cerveau (Gomez-Villafuertes et al., 2005)

(Carrion et al., 1999), la glande thyroïde (Rivas et al., 2004) ou le système immunitaire (Savignac et al., 2010). Ainsi, les souris transgéniques, ayant la protéine DREAM mutée au niveau des régions EF-Hand, rendant DREAM incapable de répondre aux stimulations calciques le laissant fixé sur DRE, voient leur taux d'IgM et IgG diminuer dans les lymphocytes B (Savignac et al., 2010) et une réduction d'expression de la protéine NCX3 (échangeur sodium/calcium) dans les cellules de l'hippocampe et du cervelet (Gomez-Villafuertes et al., 2005).

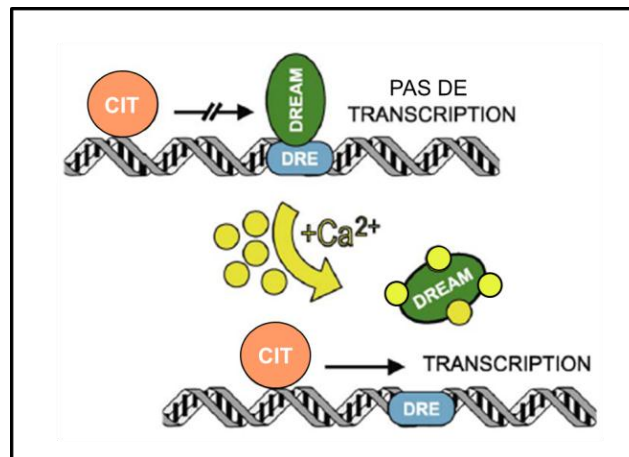


Figure 14 : Schéma de la régulation transcriptionnelle de la protéine DREAM, (d'après Alonso and Garcia-Sancho, 2011). CIT : complexe d'initiation de la transcription, DRE : Downstream Regulatory Element.

d. Autres mécanismes

Il existe d'autres mécanismes sensibles au calcium régulant l'expression génique. En effet, une étude a montré que le clivage d'une partie C-terminale d'un canal calcique voltage-dépendant était impliqué dans la régulation de l'activité du canal en réduisant l'influx calcique. La partie C-terminale clivée du canal $Ca_v1.2$, nommée CCAT (Ca^{2+} channel associated transcriptional regulator), est retrouvée dans le noyau des interneurons inhibiteurs gabaergiques du cortex et régule la transcription de gènes cibles (Figure 13) (Gomez-Ospina et al., 2006).

Un autre mécanisme fait intervenir la protéine CREST (Calcium Responsive Transactivator). CREST est une protéine nucléaire qui interagit avec la protéine CBP. Des études par mutation ont montré que ses parties N-terminale et C-terminale interviennent dans l'activation génique induite par le calcium (Aizawa et al., 2004). Le mécanisme par lequel CREST régule la transcription n'est pas encore connu. Cependant, CREST interfère avec des protéines ATID1A (AT-rich interactive domain-containing protein 1A) et l'activateur de transcription BRG-1, protéines altérant la structure de l'ADN, suggérant un rôle de CREST dans une

modification calcium-dépendante de la structure de la chromatine (Qiu and Ghosh, 2008). De récents travaux exposent que CREST est exprimé dans les cellules β -pancréatiques et impliqué dans l'apoptose (Men et al., 2013).

B. Les canaux calciques

Des canaux calciques sont présents aussi bien au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau de la membrane du réticulum tous capables de générer des signaux calciques (Figure 15). Il est possible de distinguer, sur le plan fonctionnel, des canaux ligand-dépendants (ROC pour Receptor-Operated Channel), des canaux chimio-dépendants (SMOC pour Second-Messenger-Operated Channel) activés par des seconds messagers, des canaux SOC (Store-Operated Channel) activés suite à une déplétion de calcium des stocks intracellulaires et des canaux VOC (Voltage-Operated Channel) activés par une variation de potentiel de membrane (Berridge et al., 2000).

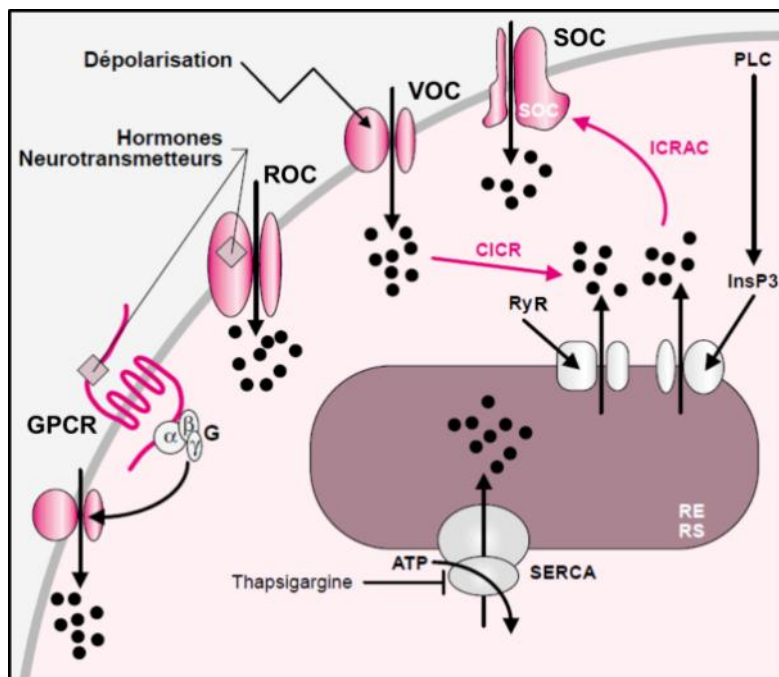


Figure 15 : Sources des voies d'entrée de calcium dans le cytoplasme. Les points noirs désignent les ions calcium. Le Ca^{2+} peut entrer depuis le milieu extracellulaire par un canal associé à un récepteur couplé à une protéine G (GPCR), un récepteur canal (ROC), un canal sensible au potentiel (VOC) ou un canal activé par la vidange des réserves intracellulaires (SOC). Le Ca^{2+} peut être libéré du RE par des récepteurs à l'IP3 (IP3R) ou par les récepteurs à la ryanodine (RyR). Les réserves réticulaires sont maintenues grâce aux pompes SERCA. Le CICR (Calcium-Induced Calcium Release) est l'activation des canaux IP3R ou RyR suite à l'ouverture des canaux VOC.

1. Les canaux calciques voltage-indépendants et cancers

a. Les canaux calciques chimio-dépendants : ROC, SMOC et canaux réticulaires

Les canaux ligands-dépendants peuvent être subdivisés en trois sous-familles (Figure 15) :

- *des canaux de la membrane plasmique activés par des ligands extracellulaires* : à ce titre les canaux ROC (Receptor-Operated Channels) sont des canaux dotés d'une fonction de récepteurs sensibles à différents ligands. Il existe de nombreux exemples où le canal ionique et le récepteur sont la même entité moléculaire. Parmi les canaux ROC, certains possèdent une perméabilité au calcium tels que les récepteurs au glutamate (récepteurs NMDA (N-Methyl-D-Aspartate), kaïnate et AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) et les récepteurs purinergiques P2X. En revanche, d'autres ROC n'ont pas des conductances calciques. On peut citer par exemple les récepteurs nicotiques sensibles à l'acétylcholine, les récepteurs GABA_A (acide gamma amino-butérique) et les récepteurs à la sérotonine 5HT₃. Il a été démontré que l'activation du récepteur purinergique P2X par l'ATP mène à l'apoptose des cellules cancéreuses prostatiques hormono-dépendantes, PC3 (Calvert et al., 2004).

- *des canaux de la membrane plasmique activés par des ligands intracellulaires* : les canaux SMOC (Second Messenger Operated Calcium Channels). Les canaux SMOC sont tributaires d'une manière générale d'un ligand intracellulaire tels que les différents second messagers générés par l'activation d'un récepteur membranaire couplé à une protéine G (Clementi et al., 1996). Ces canaux peuvent ainsi être activés par des nucléotides cycliques, du DAG (diacylglycérol), de l'IP₃ ou encore de l'acide arachidonique. Parmi ces canaux, on peut citer les canaux CNGC (Cyclic-Nucleotides gated Channels) (Biel and Michalakakis, 2009) et les canaux ARC (Arachidonic Acid Regulated Channel), mais aussi certains canaux TRP tels que TRPC3 et C6 (Thebault et al., 2005), des canaux TRPC4 et C5 (Plant and Schaefer, 2005) et enfin TRPV4 (Lorenzo et al., 2008) qui permettent l'entrée du calcium à travers la membrane plasmique. Ainsi, une étude a montré que la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques issues de culture primaires est induite par la voie NFAT sensible à l'entrée calcique *via* le canal TRPC6 activé par le DAG (Thebault et al., 2006).

- *les canaux réticulaires* : les récepteurs à la ryanodine (RyR) et à l'inositol triphosphate (IP₃R) ont la particularité d'être des canaux sensibles à des seconds messagers exprimés au niveau du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique et par conséquent d'être impliqués dans la vidange calcique du réticulum endoplasmique, principale source intracellulaire de

calcium. La liaison du ligand sur son récepteur (cADPribose pour RyR et IP3 pour IP3R) va induire un changement de conformation interne qui permet au canal de s'ouvrir et de conduire les ions calciques.

- chez l'homme, *IP3R* existe sous 3 isoformes (IP3R1-3) codés par 3 gènes différents, ITPR1, ITPR2 et ITPR3. Ce sont des glycoprotéines, de 310 kDa environ, formant des tétramères. Ces protéines sont présentes dans la plupart des types cellulaires et jouent un rôle crucial dans la conversion du stimulus extracellulaire en signal intracellulaire (Mikoshiya, 2007) (Berridge, 1993). En effet, les voies de signalisation de divers agonistes comme les hormones, facteurs de croissance ou encore les neurotransmetteurs vont activer la Phospholipase C (PLC) qui clive PIP2 en IP3 et DAG. L'IP3 se fixe sur son récepteur, conduit à son activation permettant ainsi la libération du Ca²⁺ du RE.

Les IP3R jouent un rôle majeur dans la physiologie cellulaire allant du couplage excitation/contraction à la régulation de l'apoptose et de l'autophagie.

Il a été montré que la protéine antiapoptotique Bcl2 peut interagir avec l'IP3R afin de diminuer la sortie de calcium du RE et ainsi diminuer l'apoptose des cellules Cos7, apoptose restaurée lors de l'inhibition de l'interaction Bcl2/IP3R (Rong et al., 2008).

Une étude menée par Kang et collaborateurs, sur les cellules de glioblastome, montre que la caféine, un inhibiteur de IP3R, inhibe la libération de calcium du RE. Cette inhibition provoque une diminution de l'invasion et une augmentation de la survie cellulaire (Kang et al., 2010).

Dans le tissu prostatique, l'implication d'IP3R dans la régulation de la prolifération cellulaire a été démontrée il y a une dizaine d'année. En effet, le traitement des cellules LNCaP avec du cadmium de l'ordre du micromolaire stimule la prolifération avec en parallèle une augmentation d'IP3 intracellulaire et du calcium cytosolique. Ceci est accompagné d'une augmentation de la phosphorylation d'Akt et du niveau de transcription *via* l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et CREB (Misra et al., 2003). Plus tard, Szado et collaborateurs ont montré que la kinase Akt phosphoryle directement l'IP3R1 et que cette phosphorylation diminue la sensibilité cellulaire aux stimuli apoptotiques (Szado et al., 2008) (Khan et al., 2006).

- le *RyR* existe sous 3 isoformes (RyR1-3) issus des gènes, RYR1, RYR2 et RYR3 et a été nommé ainsi en raison de sa haute affinité et spécificité pour la ryanodine, substance dérivée d'une plante de la famille des Flacourtiaceae. Les RyR sont des homotétramères dont la taille totale est supérieure à 2000 kDa (chaque sous-unité faisant plus de 550 kDa). Ce sont les plus grands canaux ioniques connus à l'heure actuelle. Ces protéines ont une conductance

importante (supérieure à 500 pS) et sont capables de provoquer des augmentations rapides de calcium cytosolique. Les RyR peuvent être activés physiologiquement par l'ATP et l'ADP ribose cyclique (Lanner et al., 2010).

Les RyR peuvent être directement ou indirectement associés et modulés avec différentes protéines, dont les récepteurs aux dihydropyridine (les canaux de type L), la PKA, les protéines liant FK506 (FKBP12), la calmoduline, la CaMKII, la calséquestrine, mais aussi des ions comme le Ca^{2+} et le Mg^{2+} (Lanner et al., 2010). Leur structure est inégalement divisée en une grande partie cytoplasmique, représentant 80% de la protéine, et une partie transmembranaire (Grunwald and Meissner, 1995). La partie cytoplasmique contient deux sites de fixation au calcium, un de haute affinité qui permet d'ouvrir le canal, et un de faible affinité qui le ferme (Meissner et al., 1997). Ce canal peut donc s'ouvrir pour de faibles augmentations de la concentration de calcium cytosolique. Ainsi, cette faible augmentation calcique cytosolique à proximité des RyR déclenche la libération du contenu des stocks calciques intracellulaires par stimulation de ces récepteurs. Ce processus est appelé « Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} Release » (CICR) (Figure 15). Dans les cellules musculaires, les récepteurs RyR jouent un rôle important dans le couplage excitation/contraction dans les muscles squelettiques pour RyR1 et cardiaques pour RyR2 (Lanner, 2012).

Il a été établi que les cellules LNCaP, lignée cellulaire cancéreuse prostatique androgéno-dépendante, expriment les récepteurs à la ryanodine RyR1 et RyR2 et que ceux-ci sont fonctionnels et interviennent dans l'apoptose (Mariot et al., 2000). Il a été montré que la GnRH-II, une isoforme de le GnRH exprimée dans le cerveau et dans les tissus reproducteurs, provoque une augmentation du taux de calcium libre cytosolique bloqué par les antagonistes (dantrolène) de RyR dans les cellules cancéreuses prostatiques DU145 (Maiti et al., 2005). Ceci indique que la GnRH-II cause une mobilisation calcique *via* l'activation de RyR dans ces cellules. De plus, leur stimulation par la caféine ou par un agoniste spécifique (4-chloro-m-cresol) provoque une libération de calcium conduisant ces cellules à l'apoptose (Mariot et al., 2000). Enfin, l'inhibition de la prolifération des cellules LNCaP et DU145 (lignée cellulaire cancéreuse prostatique androgéno-indépendante) est associée à une inhibition de la libération de calcium par les RyR (Henderson et al., 2009) (Barranco and Eckhert, 2006).

b. Les canaux SOC

L'entrée de calcium dans le cytoplasme par les canaux SOC (Store-Operated Channel) de la membrane plasmique est une voie essentielle et représente l'influx calcique majeur des cellules non excitables. Cette voie implique une entrée massive de calcium, appelée entrée

capacitive de calcium (ECC) ou SOCE (SOC Calcium Entry), suite à la déplétion de calcium des stocks intracellulaires, notamment du réticulum. Cette déplétion du réticulum peut se faire *via* l'activation de différents mécanismes : activation des IP3R ou des RyR (Bennett et al., 1998) (Putney et al., 2001), blocage pharmacologique des pompes SERCA, ou encore par la perfusion intracellulaire de chélateurs calciques (BAPTA et EGTA). Cette vidange de calcium des réserves internes a pour conséquence l'activation de canaux calciques membranaires, les canaux SOC.

L'origine moléculaire des canaux impliqués dans l'ECC a longtemps été discutée. Il a été suggéré avant la découverte des canaux Orai que les canaux TRP (Transient Receptor Potentiel, canaux décrits ci-dessous) puissent participer à cette entrée calcique (Salido et al., 2011). Récemment, deux nouvelles familles de protéines ont fait l'objet de nombreuses études sur l'ECC. En 2005, les protéines STIM ont été identifiées et présentées comme protéines senseurs de calcium localisées au niveau du RE (Liou et al., 2005) (Roos et al., 2005). Il existe 2 protéines STIM, STIM1 et STIM2, mais STIM1 intervient de façon prédominante dans l'ECC. L'autre protéine intervenant dans l'ECC est la protéine Orai, située à la membrane plasmique. Il existe 3 isoformes des protéines Orai, Orai1, Orai2 et Orai3. Ces protéines forment un pore ionique à travers lequel entre le calcium après transmission du signal par la protéine STIM1 (Muik et al., 2012). Des expériences d'immunoprécipitation ont rendu compte de l'association de STIM1 et Orai1 (Yeromin et al., 2006). STIM1 voit son domaine N-terminal se situer dans la lumière du réticulum avec des domaines de liaison au calcium de type EF-Hand, qui lui permettent de détecter la concentration calcique luminale, et un long domaine C-terminal cytosolique capable d'interagir avec Orai1 (Muik et al., 2012).

L'ECC est connue pour être impliquée dans divers processus cellulaires tels que la contraction (Kiviluoto et al., 2011) (Kovac et al., 2008) et l'exocytose (Campos-Toimil et al., 2002).

Par ailleurs, les constituants de l'ECC (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 xéno greffes tumorales (Yang et al., 2009). En effet, l'inhibition d'Orai1 ou de STIM1 supprime la migration des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 ainsi que la propagation des cellules tumorales chez la souris. De plus, des travaux du laboratoire ont mis en évidence que ces 2 protéines 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). Enfin, une étude montre qu'Orai1 constitue un composant de l'ECC dans le tissu prostatique et permet de déclencher l'apoptose dans ces cellules. Ainsi, la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses

androgéno-indépendante est associée à une dérégulation de l'expression d'Orai1 et donc de l'ECC (Flourakis et al., 2010).

c. Les canaux TRP

Le premier gène codant pour un canal TRP (Transient Receptor Potential) fut caractérisé chez la drosophile comme un gène impliqué dans la transduction du message visuel (Montell et al., 2002). Chez les mammifères, la grande famille des TRP est composée de 28 membres, dont la plupart est perméable au calcium. Ces canaux sont exprimés de manière ubiquitaire au sein de l'organisme.

La superfamille des TRP est divisée en six sous-familles :

- TRPC (1 à 7), C pour Canonique
- TRPV (1 à 6), V pour Vanilloïde
- TRPM (1 à 8), M pour Mélastatine
- TRPML (1 à 3), ML pour Mucopolipine
- TRPA (TRPA1 ou ANKTM1), A pour Ankyrine
- TRPP (1 à 5), P pour Polycystic kidney disease

Ces canaux sont d'une importance particulière dans la physiologie sensorielle. En effet, les protéines TRP jouent un rôle dans le goût, la perception de la douleur, et de la pression. Ces canaux permettent également aux cellules de détecter des modifications de l'environnement local, telles que l'osmolarité ou la température. En effet, TRPV1 peut être activé par la chaleur tandis que TRPV4 l'est par un changement d'osmolarité, TRPM8 par le froid ou par des molécules qui le mime comme le menthol. Les TRPC pourraient participer à l'ECC et certains sont activés par un second messager, le DAG (diacylglycerol) (Montell, 2005).

Au-delà de leur fonction sensorielle, ces canaux sont largement impliqués dans diverses fonctions (développement, croissance et maintien de différents organes, rythme respiratoire, sécrétion...) (Nilius and Owsianik, 2011). Il n'est donc pas surprenant que les dysfonctionnements de ces canaux soient impliqués dans plusieurs pathologies. Ainsi, TRPC6 est impliqué dans l'hyalinose segmentaire et focale, TRPV4 dans la dysplasie squelettique ou la chondrodysplasie, TRPM1 dans la cécité stationnaire congénitale nocturne, TRPM2 et 7 dans le syndrome de Guam, PRPML1 dans la mucopolipidose de type IV, et enfin TRPP2 dans la polykystose rénale de type dominant (Nilius et al., 2007).

En outre, certains de ces canaux sont proposés jouer un rôle dans la physiologie normale mais aussi dans la carcinogenèse. Ainsi, TRPV1, un canal sensible à la chaleur et à la capsaïcine, joue un rôle physiologique important dans la perception de la douleur. Cependant, une étude

montre l'implication de ce canal dans la migration des cellules cancéreuses de foie (Waning et al., 2007). De plus, certaines études expliquent que le canal TRPC6 voit son expression augmentée dans les gliomes par rapport au tissu sain. Cette augmentation de TRPC6 est responsable d'un taux de calcium cytoplasmique élevé et d'une augmentation de l'activité du facteur de transcription NFAT. De plus, l'expression de ce canal est corrélée à une augmentation de la croissance cellulaire, de l'invasion et de l'angiogenèse (Chigurupati et al., 2010) (Ding et al., 2010). De manière similaire, TRPM8, un canal sensible au froid et au menthol, voit son expression augmentée dans le tissu cancéreux (Tsavaler et al., 2001). Cependant, son expression fortement augmentée dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes semblerait inhiber la migration de ces cellules dans les premiers stades de la maladie (Gkika et al., 2010). Le canal TRPV6 est, quant à lui, proposé comme marqueur pronostique de la progression tumorale. En effet, son expression augmente avec le grade du cancer de la prostate (Fixemer et al., 2003). De plus, Lehen'kyi et collaborateurs ont montré que TRPV6 augmente la survie cellulaire et diminue l'apoptose en activant la voie Ca^{2+} /calmoduline/calcineurine/NFAT (Lehen'kyi et al., 2007). Par ailleurs, TRPV2 participe à la migration des cellules cancéreuses prostatiques. De plus son expression est augmentée dans les cancers agressifs androgéno-indépendants et lors de la différenciation neuroendocrine (Monet et al., 2010).

2. Les canaux calciques voltage-dépendants

Les canaux calciques voltage-dépendants ont été identifiés pour la première fois en 1953 par Fatt et Katz (Fatt and Katz, 1953). Dès lors, des progrès notables ont été réalisés en ce qui concerne les propriétés physiques par les techniques d'électrophysiologie et la structure moléculaire par les techniques de biologie moléculaire et de biochimie des VOC (voltage-operated calcium channels) encore appelés VGCC (voltage-gated calcium channels) ou VDCCs (Voltage-Dependant Calcium Channel). Ces canaux sont tous activés par une variation de potentiel (une dépolarisation) mais leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques particulières permettent de les classer en plusieurs sous-familles.

a. Classification biophysique des canaux VDCC

Une première classification des canaux calciques voltage-dépendants repose sur leurs propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques. Sur ces bases, deux grandes classes de VDCC sont reconnues. La première catégorie est constituée des canaux calciques voltage-dépendants à haut seuil d'activation, HVA (High Voltage-Activated). Ces canaux HVA sont activés pour des potentiels de membrane supérieur à -30 mV (Figure 16). En raison de leur

grande conductance et d'une inactivation plutôt lente, ces canaux ont également été nommés canaux de type L (pour « Large » ou « Long Lasting »).

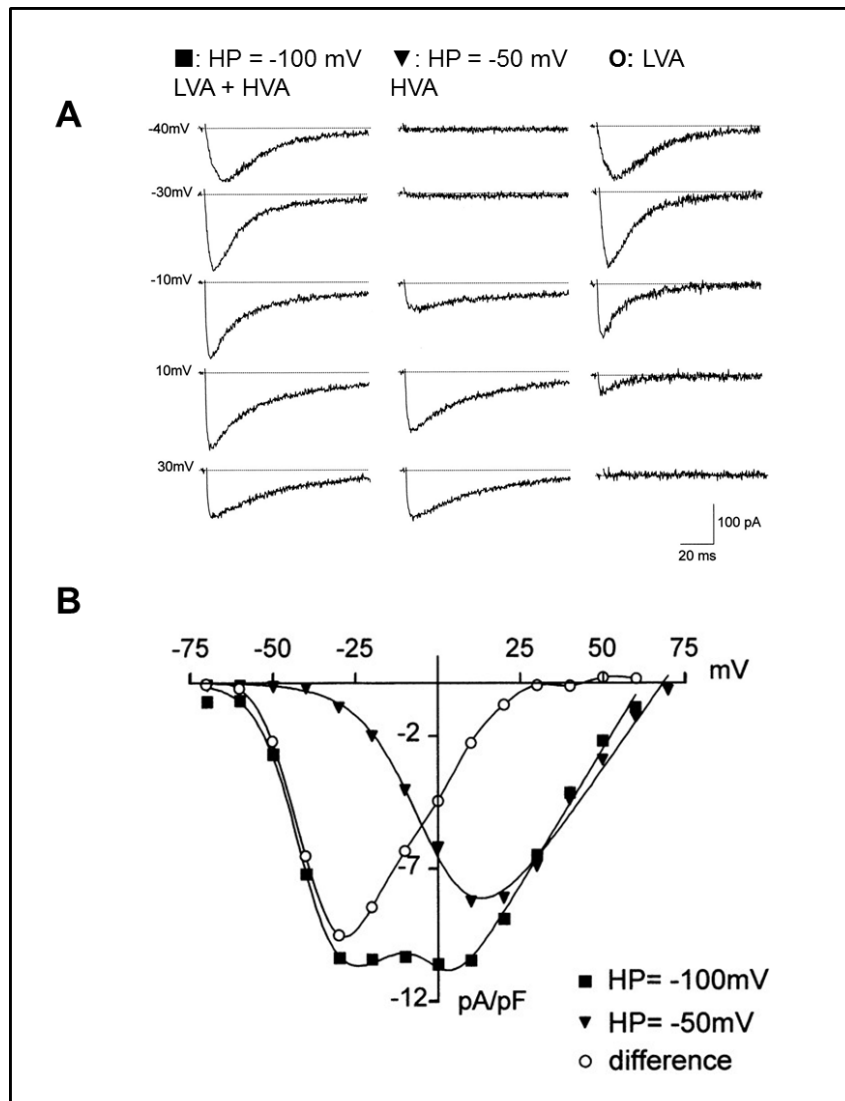


Figure 16: Exemples de courants calciques voltage-dépendants de cellules atriales (d'après Leuranguer et al., 2000) **(A)** Courants obtenus en configuration cellule-entière en réponse à des dépolarisations au potentiel indiqué à gauche à partir d'un potentiel de maintien de -100 mV (tracés de gauche), et -50 mV (tracés du milieu). Les traces montrées à droite représentent la différence de courant attribuable au courant à bas seuil (LVA). **(B)** Courbes courant-potentiel. ■ : courbe i-v obtenue à partir d'un HP de -100 mV. Les courants correspondent à la somme des courants HVA et LVA. ▼: courbe i-v obtenue à partir d'un HP de -50 mV. Les courants correspondent aux courants HVA. ○ : courbe i-v des courants LVA correspondant à la différence des deux courbes précédentes (■-▼). On voit bien sur cette illustration que les courants LVA s'activent pour des potentiels plus hyperpolarisés que les courants HVA.

Au point de vue pharmacologique, ces canaux sont sensibles aux DHP (dihydropyridine), une classe de drogues qui peut avoir une action inhibitrice (nifédipine, nisoldipine et isradipine) ou activatrice (Bay K8644) sur ces canaux. Dans les années 1980, d'autres canaux insensibles aux DHP et avec une conductance intermédiaire ont été caractérisés dans les

neurones (Nowycky et al., 1985) (Fox et al., 1987). Ces canaux sont nommés canaux calciques de type N (pour « Neuronal »). Plus tard, il a été montré que ces canaux pouvaient être classés en deux catégories selon leur sensibilité à diverses toxines. Par conséquent, les canaux sensibles à la ω -conotoxine GVIA gardent le nom de canaux calciques de type N, tandis que les canaux sensibles à ω -agatoxine IVA sont appelés canaux de type P/Q (P pour Purkinje cells) (Llinas et al., 1989). Enfin, les canaux résistants à ces toxines ainsi qu'aux DHP appartiennent aux canaux calciques de type R (pour « Resistant »).

La deuxième catégorie est constituée de canaux calciques voltage-dépendants à bas seuil, LVA (Low Voltage Activated), activés par une dépolarisation relativement faible (entre -80 mV et -60 mV) (Figure 16). Ces canaux ont la particularité d'avoir une faible conductance et une activité transitoire et ont donc été appelés canaux de type T (pour « tiny » ou « transient »). L'une des particularités des canaux T est leur inhibition par certains cations bivalents tels que le Nickel (Ni^{2+}), le Cadmium (Cd^{2+}) et le Zinc (Zn^{2+}) (Huc et al., 2009) (Lacinova, 2005). En effet, le canal $\text{Ca}_v3.2$ est bloqué par le Ni^{2+} avec un IC_{50} d'environ 5 μM , alors que pour les 2 autres formes ($\text{Ca}_v3.1$ et $\text{Ca}_v3.3$) il est d'environ 150 μM (Lee et al., 1999b).

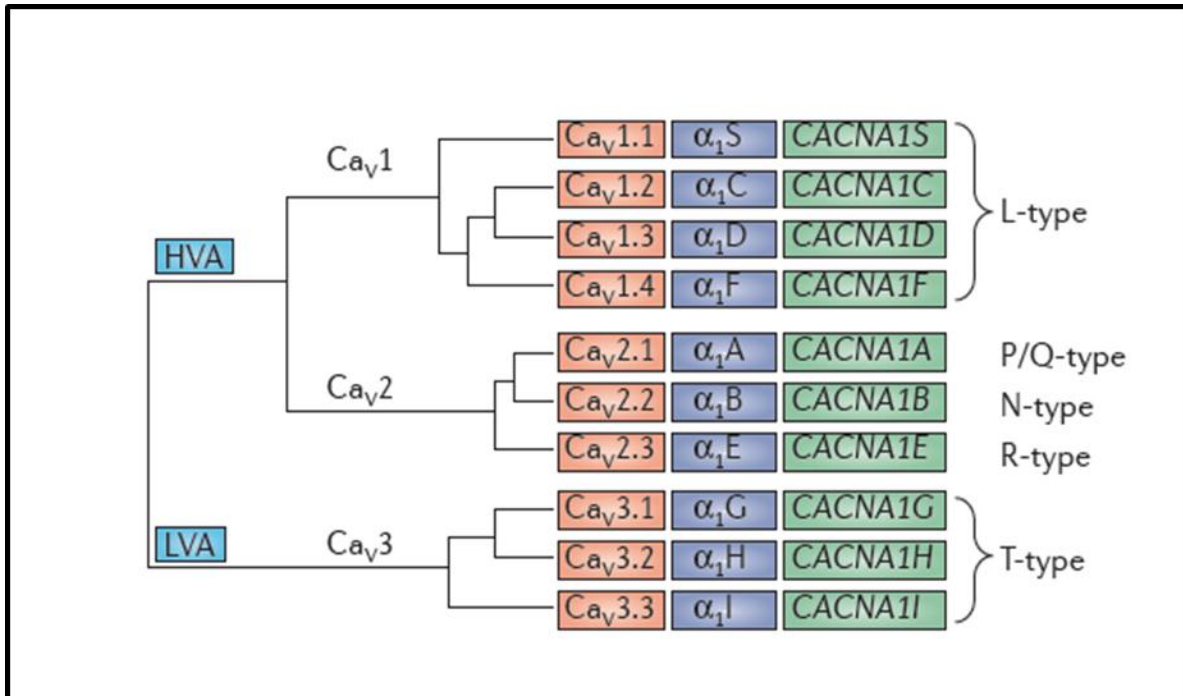


Figure 17 : Nomenclature des canaux calciques voltage-dépendants (d'après Dolphin, 2012). Les canaux calciques voltage-dépendants sont classés en deux grandes familles, en fonction de leur seuil d'activation : HVA (High Voltage Activated) et LVA (Low Voltage Activated). Les canaux HVA correspondent aux canaux de type L ($\text{Ca}_v1.Y$), P/Q, N et R ($\text{Ca}_v2.Y$). Les canaux de type T ($\text{Ca}_v3.Y$) constituent les seuls canaux LVA. Le nom de la nouvelle nomenclature est surligné en rouge, de l'ancienne en bleu et le nom du gène en vert.

b. Classification moléculaire des canaux VDCC

La seconde classification des canaux calciques voltage-dépendants est basée sur la structure moléculaire de chaque type de canaux. Le clonage, associé à des études fonctionnelles, a révélé que les canaux calciques pouvaient être composés d'une sous-unité principale α_1 et de sous-unités régulatrices β , $\alpha_2\delta$ et γ . Les sous-unités α_1 , appelées sous-unités pores, sont responsables des propriétés électrophysiologiques et pharmacologiques principales des canaux VDCC et forment la base de cette classification (Figure 17). En effet, plusieurs sous-unités α_1 représentant les canaux de type L furent identifiées, à savoir α_{1S} , codé par le gène CACNA1S, cloné dans le muscle squelettique (Curtis and Catterall, 1984) ; (Tanabe et al., 1987), α_{1C} cloné dans le tissu cardiaque et le muscle lisse, codé par CACNA1C (Mikami et al., 1989) (Biel et al., 1990), et enfin α_{1D} (Seino et al., 1992) (Williams et al., 1992) et α_{1F} (Bech-Hansen et al., 1998) (Strom et al., 1998), respectivement codés par les gènes CACNA1D et CACNA1F. Trois autres sous-unités, représentant respectivement les canaux de type P/Q, N et R furent ensuite identifiées, respectivement les sous-unités α_{1A} (Mori et al., 1991) (Starr et al., 1991), α_{1B} (Dubel et al., 1992) et α_{1E} (Niidome et al., 1992) (Soong et al., 1993), codés par les gènes CACNA1A, CACNA1B et CACNA1E. Enfin, trois membres de la famille des canaux LVA ont été caractérisés plus tard, α_{1G} (Perez-Reyes, 1998), α_{1H} (Cribbs et al., 1998) et α_{1I} (Lee et al., 1999a). La sous-unité α_1 est une protéine allant de 210 à 280 kDa. Ces protéines sont formées de 4 domaines transmembranaires dont chacun est composé de 6 segments transmembranaires. Le pore est situé entre les segments S5 et S6 et par la boucle p comprise entre les segments S5 et S6. Le filtre de sélectivité des canaux calciques VDCC est formé par l'association de 4 glutamates présents dans les boucles p (I à IV) pour les canaux HVA et de 2 glutamates dans les boucles p I et II avec 2 aspartates dans les boucles p III et IV pour les canaux LVA (Catterall, 2000). Les extrémités N et C-terminales sont situées dans le cytoplasme et 3 boucles intracellulaires relient les domaines entre eux. Le segment S4 de chaque domaine contient des acides aminés chargés positivement, ce qui lui confère un rôle de « voltage senseur ».

Afin de faciliter la dénomination des canaux calcique voltage-dépendants, un système de nomenclature a fait son apparition (Ertel et al., 2000). Les canaux sont nommés sous la forme $Ca_vX.Y$ où Ca_v signifie canaux calciques voltage-dépendants, X un nombre désignant la sous-famille et Y un nombre désignant un membre de cette sous-famille.

c. Les canaux calciques voltage-dépendants HVA

- les canaux de type L

Les canaux de type L jouent un rôle important dans le couplage excitation/contraction dans l'activité pacemaker des cellules cardiaques et dans la transmission synaptique des signaux (Tuckwell, 2012). La famille des canaux de type L regroupe 4 membres, $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ et $Ca_v1.4$, correspondant respectivement à α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} et α_{1F} .

Le premier et le mieux décrit, $Ca_v1.1$ a été cloné dans le muscle squelettique et correspond à la sous-unité α_{1S} , sous-unité pore. Dans le muscle squelettique, cette sous-unité $Ca_v1.1$ peut s'associer avec des protéines auxiliaires β_1 , $\alpha_2\delta_1$ et γ_1 pour former un canal de type L, le récepteur DHPR (Curtis and Catterall, 1984). Ces différentes sous-unités auxiliaires existent sous différentes isoformes et permettent de moduler la conductance et les propriétés dynamiques du canal (Dolphin, 2006) (Davies et al., 2010) (voir la partie III Protéines, partenaires). La cinétique d'activation des canaux L est voltage-dépendante, l'inactivation est à la fois dépendante du voltage et de la concentration du calcium intracellulaire (Budde et al., 2002). De plus, il a été montré dernièrement que la calmoduline peut se lier au canal. En effet, des auteurs ont montré qu'en fixant le calcium, la calmoduline induit une variation de configuration et l'inactivation du canal (Pang et al., 2010).

La distribution des différents canaux de type L n'est pas ubiquitaire et l'expression des canaux est différente selon les tissus. Le canal $Ca_v1.1$ est surtout exprimé au niveau des cellules du muscle squelettique tandis que $Ca_v1.4$ est exprimée par les cellules de la rétine où il a été découvert et les lymphocytes T (Kotturi and Jefferies, 2005). Le canal $Ca_v1.2$ est essentiellement exprimé dans le cœur mais aussi dans le cerveau tout comme $Ca_v1.3$ (Ertel et al., 2000). Ces deux derniers contribuent également à la génération du potentiel d'action et à la sécrétion d'hormones dans les cellules neuroendocrines (Marcantoni et al., 2007). De plus, des études par immunofluorescence ont permis de localiser $Ca_v1.2$ et $Ca_v1.3$ dans les régions proximales des neurones, au niveau des dendrites et de mettre en évidence leur rôle dans le potentiel d'action (Holmgaard et al., 2009). Par ailleurs, il a été démontré que les courants calciques des canaux de type L (et R) sont impliqués dans l'activation des canaux potassiques SK permettant l'arrêt de la transmission synaptique dans les cellules pyramidales du cortex préfrontal (Faber, 2010).

En outre, les influx calciques *via* les canaux L induisent le déclenchement des différentes voies de signalisation dont l'activation du facteur de transcription CREB qui permet l'expression de gènes essentiels dans la plasticité synaptique et autres processus cellulaires.

De plus, le canal $Ca_v1.2$ a la particularité d'avoir un clivage de sa partie C-terminale, générant un fragment peptidique appelé CCAT qui représente un élément essentiel entre le canal et la transcription génique. En effet, deux études ont montré que CCAT peut être localisé dans le noyau et régule la transcription de plusieurs gènes (Gomez-Ospina et al., 2006). De plus, CCAT contribue à l'homéostasie calcique en régulant sa propre expression, le canal $Ca_v1.2$ (Schroder et al., 2009).

- les canaux de type N, P/Q et R

Les canaux de type N, P/Q et R peuvent être regroupés dans une même famille, les canaux calciques voltage-dépendants de type neuronal ou $Ca_v2.X$. Ces canaux sont fortement exprimés au niveau présynaptique où ils participent à la neurotransmission. Les canaux de type p/Q ou $Ca_v2.1$ sont exprimés dans le cerveau et dans les tissus périphériques (Lacinova, 2005). Les canaux de type N, ou $Ca_v2.2$, sont exprimés essentiellement au niveau synaptique où ils sont impliqués dans la libération de neurotransmetteurs et dans la migration neuronale. Enfin, les canaux de type R, $Ca_v2.3$, sont les canaux HVA les moins bien caractérisés. Ces canaux induisent un courant de type R même si la cinétique diffère des autres HVA et se rapproche plus des LVA. Ces canaux sont exprimés dans les neurones granulaires du cervelet (Lacinova, 2005).

d. Les canaux calciques voltage-dépendants LVA

Les grandes caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques des canaux T sont :

- une activation pour des potentiels négatifs proches du potentiel de repos des cellules,
- des courants transitoires, le canal possédant une inactivation rapide et voltage-dépendante,
- une désactivation lente par rapport aux canaux HVA (10 à 100 fois), ces canaux générant un courant de queue après dépolarisation,
- une conductance trois fois plus faible (5-9 pS) que celle des canaux HVA,
- une plus faible sensibilité aux bloqueurs tels que les DHP,
- une plus grande sensibilité au Nickel (Ni^{2+}) que les canaux HVA. Les canaux T sont bloqués pour de faibles concentrations extracellulaires de Ni^{2+} . L'affinité pour le Ni^{2+} est beaucoup plus importante pour le canal $Ca_v3.2$ (IC_{50} environ 5 μM) que pour $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.3$ (IC_{50} environ 150 μM) (Lee et al., 1999b).
- contrairement aux canaux HVA, les canaux T ne nécessitent pas d'association avec les sous-unités auxiliaires pour fonctionner. Cependant, les études de surexpression ont mis en évidence que leur activité et leur adressage pouvaient être régulés par des sous-unités (voir partie III).

Par ailleurs, les canaux T possèdent une dépendance au potentiel de membrane distincte dans l'activation et l'inactivation occasionnant un profil particulier de réponse à des dépolarisations de plus en plus importantes (Randall and Tsien, 1997). De ce fait, les tracés de courant T après enregistrement se croisent, ceci correspond au « criss-crossing » (Figure 18). De plus, les canaux Ca_v3 ont la particularité d'être responsables d'un « courant de fenêtre », c'est-à-dire qu'il existe une gamme de potentiel correspondant au potentiel de repos pour laquelle les canaux présentent une probabilité d'ouverture suffisante afin d'engendrer une entrée de calcium basale (Figure 18). Ces courants permettent donc une entrée de calcium pour des potentiels proches du potentiel de repos membranaire. Dans les cellules prostatiques LNCaP, ce potentiel se situe autour de -40 mV (Mariot et al., 2002).

Les canaux T sont exprimés dans de nombreux organes (cerveau, cœur, rein, muscle...) et sont impliqués dans divers processus physiologiques (activité pacemaker, neurotransmission, sécrétion, contraction...). Cette expression ubiquitaire peut s'expliquer en partie par l'existence de trois types de canaux T codés par des gènes distincts. Ces gènes CACNA1G, CACNA1H et CACNA1I, respectivement localisés sur les chromosomes 17q22 (Perez-Reyes, 1998), 16p13 (Cribbs et al., 1998) et 22q13 (Mittman et al., 1999), codent respectivement pour les canaux α_{1G} ($Ca_v3.1$), α_{1H} ($Ca_v3.2$) et α_{1I} ($Ca_v3.3$).

Au niveau structural, les analyses d'hydrophobicité révèlent que la structure des $Ca_v3.Y$ est semblable à celle d' α_1 des canaux HVA.

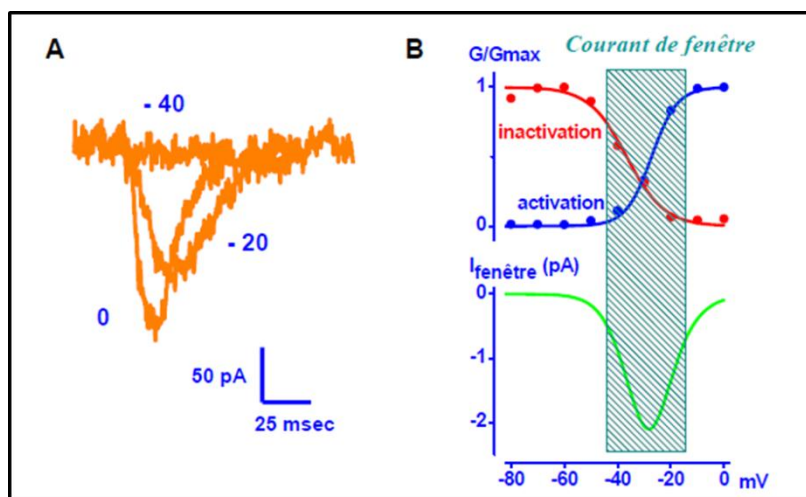


Figure 18 : Caractéristiques des courants calciques de type T (d'après Mariot et al., 2002). (A) Profil de « criss-crossing » obtenu lors de l'enregistrement des Ca_v3 . (B) Schématisation du courant de fenêtre.

Depuis quelques années, la communauté scientifique recherche des molécules permettant de bloquer ces canaux T, de par son intervention dans différents processus physiologiques. Les

recherches ont porté sur des anesthésiques (propofol, etomidate), des antipsychotiques (flunarizine, pimozide, haloperidol), des antiépileptiques (ethosuximide), des agents cardiovasculaires (nifedipine, verapamil) et des toxines (kurtoxine) (Lacinova, 2005). Cependant, les nombreuses molécules identifiées comme pouvant bloquer ces canaux, bloquent également d'autres canaux calciques voltage-dépendants. Au début des années 90, le mibefradil (ou Posicor®) a été synthétisé et utilisé d'abord comme antihypertenseur. Il bloque les canaux T et montre une sélectivité 10 à 30 fois plus importante pour les canaux T que pour les canaux L (Mishra and Hermsmeyer, 1994). Il s'agit d'une des premières molécules affectant les canaux T à des concentrations inférieures à 1 μ M. Malheureusement, il a été montré par la suite que le mibefradil interagissait avec des canaux sodiques (Eller et al., 2000), potassiques (Gomora et al., 1999) et chlorures (Nilius et al., 1997).

En outre, de nombreuses études ont validé l'idée selon laquelle les canaux T pouvaient être modulés par différents ligands endogènes et seconds messagers. En effet, plusieurs récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) sont de potentiels modulateurs des canaux T dans une grande variété de types cellulaires. Il a été montré que l'activation du récepteur muscarinique M1 peut conduire à l'inhibition du canal Ca_v3.3 à travers la voie G α q/ α 11 (Hildebrand et al., 2007). De même, l'activation du récepteur à la corticotropine (CRFR1) inhibe l'activité du canal Ca_v3.2 *via* la voie G β γ . Cette inhibition survient suite à l'interaction directe des protéines G β γ et la boucle intracellulaire du canal entre les domaines II et III (Wolfe et al., 2003) (DePuy et al., 2006). Par ailleurs, plusieurs kinases, comme CaMKII, PKA, PKC et RhoK sont capables de moduler l'activité des canaux Ca_v3.Y (Huc et al., 2009). Enfin, une récente étude montre l'existence d'une interaction entre le canal Ca_v3.2 et la calcineurine (Huang et al., 2013). Cette association se fait avec la partie C-terminale du canal et inhibe l'activité calcineurine-NFAT. De plus, Huang et collaborateurs montrent que la dissociation de ce complexe augmente la densité du courant calcique.

La distribution de ces canaux dans les tissus périphériques et dans le cerveau a été étudiée par Northern-blot et hybridation *in situ*. Chez l'homme, Ca_v3.1 a été identifié dans le cerveau et dans le cœur (Perez-Reyes, 1998), Ca_v3.2 de manière plus ubiquitaire, dans le foie, le rein mais aussi dans le cerveau, le poumon, le muscle squelettique et le pancréas (Cribbs et al., 1998) (Williams et al., 1999). Enfin, Ca_v3.3 est majoritairement retrouvé dans le cerveau (Lee et al., 1999a). L'expression des canaux T dans divers types cellulaires suggère leur rôle dans différentes fonctions physiologiques comme la contraction, la neurotransmission, la sécrétion, la nociception, la fertilisation et l'expression génique. De plus, ces canaux interviennent dans les mécanismes de développement cellulaire et de prolifération, et par conséquent dans la

croissance tumorale. L'étude de ce canal présente donc un intérêt particulier pour son implication dans les pathologies comme notamment dans la cancérogenèse.

C. Canaux calciques voltage-dépendants et cancer

Les cellules cancéreuses utilisent les mêmes canaux calciques, les mêmes pompes et échangeurs que les cellules saines. Cependant, une ou plusieurs altérations de ces éléments sont observées dans les cellules cancéreuses. En effet, ces altérations peuvent être de plusieurs ordres : l'apparition de nouveaux canaux dans les cellules cancéreuses qui ne s'expriment pas dans les tissus sains, un changement dans leur niveau d'expression, dans la localisation subcellulaire, ou encore une modification post-traductionnelle, ou la mutation de gènes. Ces canaux peuvent alors intervenir dans différents processus cancéreux. Hanahan et Weinberg caractérisent les cellules cancéreuses grâce à six phénotypes essentiels : 1- une autosuffisance vis-à-vis des signaux de croissance (autonomie), 2- une insensibilité aux signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire, 3- une résistance à la mort cellulaire programmée, 4- un potentiel répliatif illimité (« immortalité »), 5- une angiogenèse accrue et soutenue et 6- une capacité invasive et métastatique (Hanahan and Weinberg, 2000). Les canaux ioniques pourraient être impliqués dans l'apparition de ces phénotypes dans les cellules cancéreuses.

1. Expression des canaux T dans les cancers

Les canaux calciques voltages-dépendants sont exprimés dans différents types de tumeurs et lignées cellulaires cancéreuses. Les canaux T sont exprimés dans les tumeurs du sein, du cerveau, du colon, de l'estomac, de la prostate, de la rétine, de la moelle osseuse, et dans les lignées cellulaires (Panner and Wurster, 2006). En effet, les cellules MCF7, lignée cellulaire cancéreuse mammaire, expriment les canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ et ces canaux sont fonctionnels (Taylor et al., 2008a). L'expression des canaux T est augmentée dans le tissu cancéreux ovarien comparé au tissu normal (Li et al., 2011). De plus, les trois canaux de type T sont exprimés par les cellules cancéreuses de la peau, mais seul $Ca_v3.1$ est exprimé faiblement par les mélanocytes normaux (Das et al., 2012). Les auteurs montrent que le taux d'expression de ces canaux est également lié au grade du cancer. En effet, l'expression des canaux T peut être dépendante du stade de la tumeur. Par exemple, le canal $Ca_v3.2$ voit son expression augmentée dans les cellules prostatiques neuroendocrines, cellules que l'on retrouve dans les tumeurs agressives (Mariot et al., 2002). Il a été montré que ces cellules prolifèrent moins vite que les cellules non neuroendocrines et que les canaux $Ca_v3.2$ intervenaient dans la sécrétion

de PAP (Gackiere et al., 2008). Ces canaux pourraient alors participer à la sécrétion de facteurs mitotiques, permettant ainsi la prolifération des cellules avoisinantes. Par ailleurs, dans les rétinoblastomes, la diminution de la prolifération due à une différenciation est accompagnée d'une diminution de l'expression des canaux et des courants de type T (Hirooka et al., 2002). Cependant, le gène du canal $Ca_v3.1$, CACNA1G, est la cible de méthylation dans les cancers colorectaux et pulmonaires (Castro et al., 2010) (Toyota et al., 1999). Cette modification épigénétique réprime la transcription du gène, suggérant CACNA1G comme gène suppresseur de tumeur.

2. Canaux calciques voltage-dépendants et prolifération

Les cellules normales nécessitent des signaux de croissance pour passer d'un état quiescent à un état de prolifération. Cependant, la prolifération des cellules tumorales ne dépend pas seulement de signaux de croissance externes car ces cellules ont acquis une autonomie en matière de croissance cellulaire. Trois paramètres peuvent expliquer cette autonomie :

- la capacité pour certaines cellules cancéreuses d'une population hétérogène de produire et sécréter des facteurs de croissances. Ces facteurs peuvent alors avoir une action autocrine ou paracrine sur la croissance cellulaire;
- une altération de l'expression des récepteurs et/ou des canaux ioniques qui reçoivent et relaient les signaux extracellulaire;
- une dérégulation des voies de signalisation intracellulaires qui ciblent l'expression génique.

Les canaux voltage-dépendants, en particuliers les canaux T, jouent un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire de nombreux tissus. En effet, les canaux T participent à la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, des fibroblastes, des myocytes ventriculaires et des myoblastes (Panner and Wurster, 2006). En effet, Rodman et collaborateurs démontrent que l'utilisation de siARN dirigés contre le canal $Ca_v3.1$ diminue la prolifération des myocytes des artères pulmonaires (Rodman et al., 2005). Panner et collaborateurs montrent en 2005 que la surexpression de $Ca_v3.2$ augmente la prolifération des cellules U87-MG et N1E-115 (des lignées cellulaires de gliome et de neuroblastome respectivement) tandis que la suppression de $Ca_v3.1$ par siARN la diminue de 70% (Panner et al., 2005). Cette étude montre également que le mibéfradil inhibe la prolifération de ces 2 lignées cellulaires. D'autres travaux suggèrent que les canaux T participent à la prolifération des cellules cancéreuses œsophagiennes (Lu et al., 2008). Les cellules MCF7, lignée cancéreuse mammaire, expriment à la fois le canal $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ (Taylor et al., 2008b). Cette étude montre que l'inhibition des canaux T par des siARN diminue la prolifération des

cellules MCF7. Cependant, une étude récente menée par Ohkubo et Yamazaki démontre que la surexpression de $Ca_v3.1$ induit une diminution de la prolifération et favorise l'apoptose de ces cellules, $Ca_v3.2$ n'ayant aucun rôle (Ohkubo and Yamazaki, 2012). Cette étude appuie donc l'hypothèse selon laquelle le gène CACNA1G puisse être un gène suppresseur de tumeur. De plus, Diaz-Lezama et collaborateurs ont montré que la ghréline augmente l'expression du canal $Ca_v3.1$ et son amplitude de courant dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes PC3, et diminue la prolifération de ces cellules (Diaz-Lezama et al., 2010). Toutefois, l'inhibition des canaux $Ca_v3.1$ et $Ca_v3.2$ dans les cellules cancéreuses ovariennes diminue la prolifération et augmente le nombre de cellules dans la phase G0/G1 du cycle cellulaire (Li et al., 2011). Enfin, la surexpression du canal $Ca_v3.2$ dans les cellules HEK, cellules embryonnaires de rein, provoque une augmentation du nombre de cellules dans la phase S, passant de 35% pour les contrôles à 44% pour les HEK- $Ca_v3.2$, et une diminution du nombre de cellules en phase G1, passant de 53% à 46%. De plus, ceci est accompagné d'une augmentation de l'expression protéique de CDK2, cycline A et cycline E, des protéines favorisant l'avancé dans le cycle cellulaire (Wang et al., 2002b). Une étude similaire sur $Ca_v3.1$ montre les mêmes résultats (Wang et al., 2002a). L'ensemble de ces travaux montre que les canaux T peuvent jouer des rôles différents selon le type cellulaire. Ceci suggère l'interaction de ce canal avec d'autres protéines différemment exprimées dans les types cellulaires.

a. Canaux T et cycle cellulaire

Le cycle cellulaire, divisé en plusieurs phases, G0, G1, S, G2 et M, possède différents points de contrôle. Afin de franchir ces transitions, la cellule va utiliser des influx calciques. En effet, les transitions G1/S et G2/M sont dépendantes de la voie CaMKII (Kahl and Means, 2003).

Par ailleurs, l'expression des canaux calciques voltage-dépendants varie durant la progression dans le cycle cellulaire. Il a été démontré que les cellules musculaires aortiques en phase de prolifération (G2/M) expriment plus fréquemment les canaux de type T tandis que les cellules non prolifératives (G0/G1) expriment davantage les canaux de type L (Akaike et al., 1989) (Richard et al., 1992). De plus, dans les cellules musculaires aortiques de rat, les canaux T sont présents pendant les phases G1 et S et leur expression est diminuée voire absente dans les autres phases du cycle (Kuga et al., 1996) (Guo et al., 1998). En outre, dans les myocytes des artères pulmonaires, l'utilisation de siARN dirigé contre le canal $Ca_v3.1$ inhibe la prolifération ce qui aboutit à une augmentation du nombre de cellules en phase de quiescence (G0/G1)

(Rodman et al., 2005). Ces études suggèrent donc que les canaux voltage-dépendants jouent un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération et du cycle cellulaire.

b. Effets des bloquants des canaux T sur la croissance cellulaire

De nombreuses études se sont penchées sur les effets des inhibiteurs des canaux T sur la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, les antipsychotiques inhibiteurs des canaux T, pimozide et thioridazine, diminuent la prolifération des cellules cancéreuses du sein (Strobl et al., 1990) tout comme le mibéfradil, un inhibiteur des canaux T (Bertolesi et al., 2002). En effet, une étude *in vivo* a permis de mettre en évidence les effets du mibéfradil sur la croissance tumorale mammaire. Des cellules MCF-7 ont été implantées sur des souris nude, et des injections de mibéfradil ou de solution saline ont été réalisées en intratumoral deux fois par semaine pendant 30 jours. Les coupes histologiques des tumeurs développées chez ces animaux montrent que le mibéfradil provoque une dégénérescence et la nécrose des cellules de la tumeur (Bertolesi et al., 2002). Par ailleurs, l'effet du mibéfradil sur le glioblastome fait l'objet de plusieurs études. Ainsi, le mibéfradil est capable de synchroniser ces cellules en phase G1 (Sheehan et al., 2013). D'autres études démontrent que le mibéfradil induit l'apoptose de ces cellules de manière dose-dépendante en inhibant les canaux T, Ca_v3.1 ou Ca_v3.2 (Valerie et al., 2013). Ces auteurs ont montré que l'apoptose provoquée impliquait la voie mTOR/Akt. Cependant, Keir et collaborateurs montrent, sur le glioblastome, que le mibéfradil ralentit le cycle cellulaire en inhibant l'entrée de calcium induite par les canaux T nécessaire pour l'entrée dans le cycle cellulaire et ceci sans provoquer de mort cellulaire (Keir et al., 2013). Par ailleurs, une étude récente menée par Rim et collaborateurs montre que KYS05047, un inhibiteur des canaux T, diminue la croissance des cellules A549, lignée cancéreuse pulmonaire et réduit la croissance des tumeurs issues de xénogreffes (Rim et al., 2012).

3. Canaux T et implication dans la migration et invasion

Ces canaux T peuvent également être impliqués dans des processus cancéreux autres que la prolifération tels que la migration, l'invasion ou l'angiogenèse.

La migration est un processus cyclique qui peut impliquer le calcium. En effet, les canaux calciques voltage-dépendants peuvent être responsables de signaux calciques oscillants et transitoires, oscillations visibles aussi bien dans les cellules normales que tumorales (Entschladen and Zanker, 2000). En effet, plusieurs études montrent que le mibéfradil inhibe l'adhésion des leucocytes et leur locomotion (Blaheta et al., 1998) (Nebe et al., 2002). Une étude menée par Huang et collaborateurs, et réalisée sur les cellules HT1080 de fibrosarcome

confirme que le mibéfradil inhibe les oscillations calciques mais également la migration et l'invasion de ces cellules (Huang et al., 2004). Enfin, les cellules U87, lignée cellulaire de glioblastome, expriment les 3 types de canaux T, à savoir $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$. Zhang et collaborateurs ont étudié les effets de l'endostatine, un antitumoral, sur ces cellules et ils montrent que l'endostatine inhibe les courants calciques de type T, la prolifération et la migration des cellules U87 (Zhang et al., 2012). Bien que basées sur des utilisations des agents pharmacologiques, ces données suggèrent que les canaux T peuvent non seulement moduler la croissance des cellules tumorales, mais aussi moduler la migration et l'invasion de ces dernières.

III. Protéines partenaires des canaux T

Les canaux calciques de type T contribuent au phénotype néoplasique probablement grâce à des interactions avec d'autres protéines. En effet, il est montré dans différents systèmes que les canaux T peuvent être associés à diverses protéines et former ainsi un complexe fonctionnel.

A. Les canaux potassiques

Comme nous l'avons montré préalablement, les canaux T sont à l'origine de phénomènes rythmiques et participent notamment à l'activité pacemaker neuronale. Ils engendrent ainsi des vagues calciques intracellulaires responsables de nombreux processus cellulaires tels que la libération de neurotransmetteurs ou la prolifération. Afin de produire ces vagues calciques, les canaux T peuvent s'associer aux canaux potassiques. En effet, les canaux T sont activés suite à des variations de potentiel de membrane contrôlés notamment par les canaux potassiques.

Les canaux potassiques participent à de nombreuses fonctions biologiques et sont notamment responsables du maintien du potentiel de membrane et de la transmission du potentiel d'action. Dans les conditions physiologiques, les concentrations de potassium à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule sont respectivement de 150 mM et environ 4 mM. Ainsi, le flux potassique est presque systématiquement dirigé vers l'extérieur et maintient le potentiel de membrane (E_{membrane} environ -65mV) à une valeur proche de celle du potentiel d'équilibre de l'ion K^+ ($E_{K^+} = -80\text{mV}$).

1. Diversité des canaux potassiques

Les canaux potassiques forment la classe de canaux ioniques dont la diversité structurale et fonctionnelle est la plus grande. Cette diversité repose sur une grande variété génique. Chez l'Homme, il existe ainsi plus de 70 gènes codants pour des canaux potassiques. Ces différents canaux ont été classés en fonction de leur structure, de leur activation et de leurs propriétés pharmacologiques. En effet, les sous-unités pores, appelées α , des canaux potassiques sont composées d'un nombre variable de domaines transmembranaires allant de 2 à 6 et de boucle P (hélice α située entre 2 domaines transmembranaires S5 et S6) participant au filtre de sélectivité pour les ions K^+ . Cette boucle P, qui forme le filtre de sélectivité du canal, a été conservée au cours de l'évolution, de la bactérie à l'homme, et constitue une signature permettant notamment d'identifier de nouveaux canaux K^+ (Coetzee et al., 1999).

On distingue alors 3 grandes classes de sous-unités pores des canaux potassiques sur la base de leur homologie structurale :

- Les canaux potassiques à 6 domaines transmembranaires (S1 à S6) et une boucle P générant des courants potassiques dépendants du potentiel (Kv) et des courants sensibles à la concentration de calcium intracellulaire (Kca) (Gutman et al., 2005). Le canal fonctionnel est un tétramère constitué de 4 sous-unités α , dont le pore est délimité par les segments S5 et S6 et la boucle P. Le segment S4 des canaux Kv est responsable de la sensibilité du canal au potentiel grâce à la présence d'acides aminés chargés tel que la lysine et l'arginine.
- Les canaux potassiques à 2 domaines transmembranaires (M1 et M2) et 1 boucle P à l'origine des canaux potassiques à rectification entrante (Kubo et al., 2005), dont les canaux inhibés par l'ATP, les K_{ATP} font partie. Ces canaux sont classés dans la famille des Kir.
- Les canaux potassiques à 4 domaines transmembranaires et 2 boucles P. Parmi ces canaux, sont exprimés les canaux potassiques faiblement rectifiant entrant TWIK, TREK et TRAAK connus pour être sensibles aux stimuli chimiques et physiques, au pH, aux acides gras, au stress mécanique, aux protéines G et aux anesthésiques (Goldstein et al., 2005).

De par leur mode d'activation, les canaux potassiques voltage-dépendants et calcium-dépendants semblent être des partenaires privilégiés des canaux calciques voltage-dépendants et c'est donc pour cette raison qu'ils ont particulièrement suscité notre intérêt.

a. Les canaux potassiques voltage-dépendants : Kv

Les canaux Kv constituent une famille de protéines structurellement et fonctionnellement très diverses. En effet, la famille des canaux Kv se compose d'une grande variété de canaux due au nombre important de gènes (22 pour les Kv), à l'épissage alternatif et à l'hétéromérisation

des canaux (Yellen, 2002). La famille des Kv s'étend de Kv1 à Kv11. Les « canaux » Kv5 à Kv9 ont une forte homologie avec les canaux Kv2 mais ne possèdent pas de sous-unité pore fonctionnelle. Ces canaux peuvent s'associer aux autres canaux Kv et moduler leur fonctionnement.

Les canaux Kv sont constitués de 6 domaines transmembranaires avec les extrémités C-terminale et N-terminale cytoplasmiques. Les canaux sont formés par l'interaction de 4 sous-unités α identiques, on parle alors d'homotétramère, ou provenant de Kv différents, donc de structure hétérotétramérique. La boucle P située en S5 et S6 de chaque sous-unité α possède le filtre de sélectivité au potassium, le segment S4 constitue le domaine de sensibilité au voltage, le voltage-senseur. De plus, ces canaux sont capables de s'associer avec des sous-unités accessoires de type Kv β qui modifient leur expression à la membrane et leurs propriétés fonctionnelles. Ces sous-unités interagissent avec l'extrémité N-terminale des sous-unités α des canaux Kv1 à Kv4 (Yellen, 2002).

Dans les cellules excitables, les canaux Kv sont impliqués dans la régulation du potentiel de membrane et dans la génération et propagation du potentiel d'action. Mais ces canaux sont également exprimés dans les cellules non excitables où la sensibilité et la sélectivité potassique contribuent à la régulation du taux de calcium intracellulaire, au volume cellulaire et affectent la prolifération et l'apoptose.

b. Les canaux potassiques calcium dépendants : K_{Ca}

Il existe trois grandes familles de canaux potassiques calcium-dépendants séparées d'un point de vue biophysique et pharmacologique. Ces canaux ont été appelés BK, SK et IK (Vergara et al., 1998). L'union internationale de pharmacologie a placé tous les canaux K⁺ activés par le calcium dans une même famille, les canaux K_{Ca}. Au sein de cette famille, on distingue K_{Ca}1.1 correspondant aux canaux BK, K_{Ca}2.1 K_{Ca}2.2 et K_{Ca}2.3 correspondant respectivement à SK1, SK2 et SK3 et enfin K_{Ca}3.1 qui fait référence à IK (Gutman et al., 2005). Les canaux K_{Ca} sont exprimés dans les neurones mais aussi au niveau des cellules non excitables comme les cellules épithéliales ou musculaires (Hu and Zhang, 2012) où ils régulent le potentiel de membrane en relation avec le taux de calcium intracellulaire. Activés par le calcium, les canaux K_{Ca} font sortir le potassium et permettent de repolariser ou d'hyperpolariser la membrane. Ce changement de potentiel de membrane va provoquer la désactivation des canaux Ca_v par exemple, et donc limiter l'influx calcique (Vandael et al., 2010).

- Les canaux BK

Les canaux BK, aussi appelés canaux à large conductance (B pour **B**ig conductance) ou canaux MaxiK, ont été les premiers canaux K_{Ca} à être identifiés.

Ces canaux ont une forte sélectivité au potassium et une conductance importante de l'ordre de 100 à 250 pS. D'une manière générale, ces canaux exigent à la fois du calcium et une dépolarisation afin d'être activés (McManus, 1991). La sensibilité au calcium de ces canaux est fortement dépendante du potentiel de membrane. En effet, le K_d pour le calcium est de l'ordre du micromolaire au potentiel de repos (-60mV) et passe au nanomolaire à des potentiels dépolarisés (20-40 mV) (Latorre et al., 1989). Ces canaux sont bloqués par de faibles taux de tétraéthylammonium (TEA) et inhibés spécifiquement par l'iberiotoxine, la sloxine et la paxilline.

Le canal BK, codé par le gène *slo1* ou slowpoke, est un tétramère formé de 4 sous-unités α . Contrairement aux canaux Kv et autres canaux K_{Ca} , les canaux BK possèdent 7 domaines transmembranaires (S0 à S6) avec par conséquent les extrémités N-terminale extracellulaire et C-terminale cytoplasmique (Figure 19). La longue extrémité C-terminale contient 4 domaines hydrophobes qui permettent au canal d'être fonctionnel, 2 domaines régulant la conductance potassique (RCK) et un segment de résidus chargés négativement connus sous le nom de « Ca^{2+} bowl » liant le calcium (Figure 19) (Berkefeld et al., 2010). Cependant, une mutation de cette région ne perturbe pas l'activation par le calcium des canaux BK, ce qui indique que le calcium se fixe dans une autre région. En effet, en plus du « Ca^{2+} bowl », il existe 2 autres sites de liaison calcique à l'intérieur du domaine RCK1 (Zeng et al., 2005). Comme tout canal voltage-dépendant, BK possède un segment S4 voltage-senseur avec 3 résidus arginine.

La diversité fonctionnelle du canal BK s'explique par l'épissage de son ARNm et par la régulation *via* ses sous-unités accessoires β . Ces sous-unités existent sous 4 formes (β 1-4), dont l'expression varie en fonction des tissus. Ainsi β 4 est exprimée uniquement dans le cerveau, β 2 et β 3 dans les neurones et β 1 dans les cellules musculaires lisses (Orio et al., 2002). Par ailleurs, dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP, le canal BK est associé à la protéine LRRC26 (Leucin Rich Repeat-Containing protein) qui provoque un décalage de la courbe d'activation vers les potentiels négatifs, permettant l'activation du canal BK proche du potentiel de repos (Yan and Aldrich, 2010). LRRC26 est structurellement et fonctionnellement distincte des sous-unités β et représente donc une autre forme de sous-unité accessoire.

Les canaux BK sont exprimés dans de nombreux tissus et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la vasodilatation, la libération de neurotransmetteurs, la sécrétion d'hormones... (Ghatta et al., 2006).

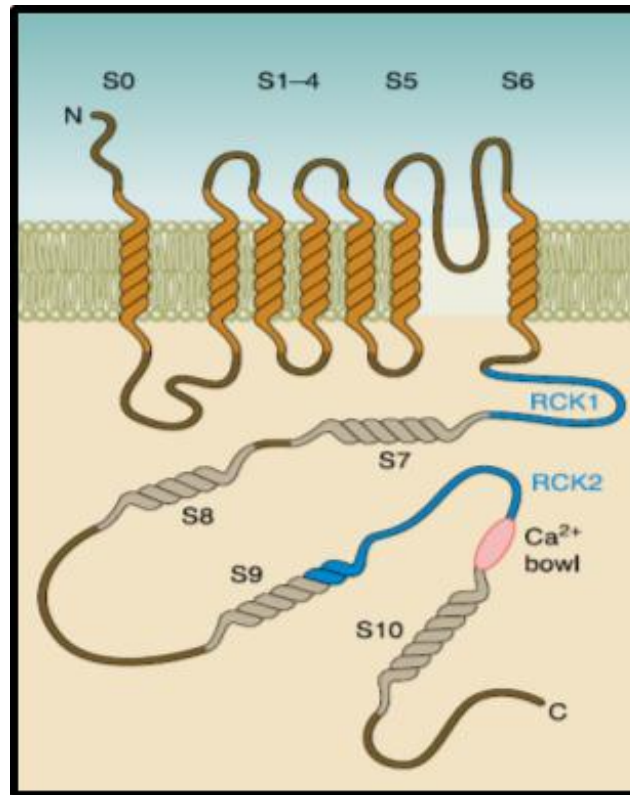


Figure 19 : Représentation schématique du canal potassique BK (d'après Berkefeld et al., 2010)

- Les canaux SK

Trois types de canaux SK ont été clonés : SK1, SK2 et SK3 (Kohler et al., 1996). SK1 et SK2 sont trouvés préférentiellement dans le système nerveux central (SNC) (SK2 également dans les cellules sensorielles, les myocytes cardiaques, la microglie et la vessie), tandis que SK3 est exprimé par les neurones, les cellules gliales, endothéliales et musculaires lisses (Stocker, 2004).

Les canaux SK possèdent une faible conductance (Small conductance K channels) qui va de 2 à 20 Ps. Contrairement aux canaux BK, les canaux SK sont insensibles au potentiel. Leur sensibilité au calcium est de l'ordre du micromolaire (K_D d'environ $0,5\mu M$) (Adelman et al., 2012).

Les 3 types de canaux SK sont bloqués par l'apamine mais avec une affinité différente. En effet, SK2 est le plus sensible ($EC_{50} = 40$ pM), SK1 le moins sensible ($EC_{50} = 10$ nM), et SK3 présente une affinité intermédiaire ($EC_{50} = 1$ nM). Une étude récente montre que l'apamine se lie aux canaux avec une forte affinité, plus forte que certains bloquants potentiels

(D-tubocurarine UCL1684) à l'extérieur du pore (Lamy et al., 2010). D'autres composés, moins sélectifs tels que la bicuculline, la D-tubocurarine et la scyllatoxine bloquent également les canaux SK. Cependant, tous ces inhibiteurs, y compris l'apamine ne sont pas spécifiques d'une sous-famille de SK.

Les canaux SK fonctionnels sont assemblés en homotétramères. Cependant, des études menées sur des modèles de surexpression ont montré la formation d'hétérotétramères fonctionnels des canaux SK. Ces canaux ne possèdent pas de domaine de liaison au calcium. En, effet, ces derniers sont liés à la calmoduline *via* des domaines de liaison spécifiques (CaMBD : CaM Binding Domain), et la liaison au calcium *via* cette protéine conduit au changement conformationnel du canal provoquant ainsi son ouverture. Au contraire des canaux BK, chaque sous-unité du tétramère possède 6 segments transmembranaires et lie la calmoduline sous le segment transmembranaire S6 dans l'extrémité N-terminale au niveau du domaine CaMBD (Adelman et al., 2012).

- Les canaux IK

La première description du courant potassique calcium-dépendant à conductance intermédiaire a été effectuée par Gardos et collaborateurs en 1958 sur des érythrocytes humains (Gardos, 1958). Le canal IK est connu dans la littérature sous différents noms : KCNN4, SK4, KCa4, IK_{Ca1} ou IK1. Les canaux IK sont donc des canaux à conductance intermédiaire allant de 20 pS à 100 pS. Ces canaux sont structurellement et fonctionnellement similaires aux canaux SK mais sont absents du SNC. Ces canaux sont exprimés dans les cellules musculaires, divers épithéliums et dans les cellules sanguines (Stocker, 2004). Au niveau de leur structure, ces canaux sont des homotétramères. Ils sont également insensibles au potentiel mais sensibles au calcium selon le même mécanisme que les canaux SK. Du point de vue pharmacologique, IK peut être inhibé par différents agents pharmacologiques tels que le TRAM-34 (1[(2-Chlorophenyl)diphenylmethyl]-1H-pyrazole) et le clotrimazole mais il est insensible à l'apamine et à l'iberiotoxine. De plus, le 1-EBIO (1-Ethyl-2-benzimidazolinone) est un activateur du canal IK.

2. Couplage entre les canaux potassiques K_v , K_{Ca} et les canaux calciques voltage-dépendants

Dans les cellules excitables, les canaux potassiques K_v et K_{Ca} vont avoir une importance dans la modulation du potentiel de membrane, dans le potentiel d'action et plus particulièrement dans les phases de repolarisation et d'hyperpolarisation (Faber and Sah, 2003). De plus, ces canaux peuvent également intervenir dans le potentiel de repos des cellules épithéliales.

Les canaux Kv peuvent également être sensibles au calcium et par conséquent couplés aux canaux calciques voltage-dépendants. Ainsi, les études menées par Anderson montrent la formation d'un complexe protéique entre Kv4.2 et Ca_v3.2 ou Ca_v3.3 dans les neurones, qui régule l'inactivation du canal potassique (Anderson et al., 2010). De plus, le mibefradil, un inhibiteur des canaux calciques voltage-dépendants de type T, produit un décalage de la courbe d'inactivation du canal Kv sans affecter son activation (Anderson et al., 2010).

Les canaux potassiques BK ont une fonction clé dans la repolarisation et l'hyperpolarisation de la membrane suite à un potentiel d'action dans les cellules excitables. Dans les neurones, l'influx calcique nécessaire pour activer ces canaux est notamment dû aux canaux Ca_v (Edgerton and Reinhart, 2003) (Goldberg and Wilson, 2005) (Prakriya et al., 1996).

Dans les conditions physiologiques, l'activation des canaux BK dans les neurones nécessite un taux de calcium local de l'ordre de 10µM (Berkefeld et al., 2006). Ceci suggère donc que ces canaux soient situés à proximité les uns des autres. La première évidence montrant un lien biochimique entre le canal BK et Ca_v est obtenue par Grunnet et Kaufmann démontrant la coprécipitation de BK et Ca_v1.2 et Ca_v1.3 dans le cerveau des rongeurs (Grunnet and Kaufmann, 2004). Par la suite, il a été montré que BK pouvait également s'associer au canal Ca_v2.2 (Berkefeld et al., 2006). Ainsi, dans les cellules de Purkinje, BK est associé au canal Ca_v2.1 (Edgerton and Reinhart, 2003) (Womack et al., 2004), tandis que dans les cellules chromaffines sécrétant de nombreuses hormones, il est associé aux canaux Ca_v1.2 et Ca_v2.1 (Prakriya et al., 1996).

Les complexes BK/Ca_v reconstitués chez l'ovocyte de xénope montrent un courant sortant biphasique suite à l'activation des canaux calciques voltage-dépendants. Un courant entrant de calcium est donc suivi d'une sortie de potassium. Ce couplage fonctionnel est insensible à l'EGTA même à haute concentration (de l'ordre du millimolaire) mais peut être perturbé par le BAPTA, un chélateur calcique avec une cinétique de liaison 100 fois plus rapide (Naraghi and Neher, 1997). Une autre caractéristique du couplage BK/Ca_v est le contrôle de la cinétique d'activation des canaux BK exercée par les canaux Ca_v. Ainsi, un courant potassique sortant voit ses caractéristiques d'activation modifiées selon le type de Ca_v auquel il est associé. Plus explicitement, le canal BK est activé plus rapidement et à des voltages plus négatifs quand il est associé avec le canal Ca_v2.1 plutôt qu'avec le canal Ca_v1.2 ce qui reflète la différence de caractéristique d'activation entre les 2 types de Ca_v (Berkefeld et al., 2010). Enfin, une récente étude menée par Rehak et collaborateurs montre l'association moléculaire et le couplage fonctionnel des canaux Ca_v3.2 et BK dans les neurones (Rehak et al., 2013).

Le couplage BK/Ca_v va permettre de modifier certains aspects physiologiques cellulaires. En effet, l'activation des canaux BK devient alors indépendante de l'environnement calcique cellulaire global mais repose sur une augmentation locale de la concentration de calcium (Marrion and Tavalin, 1998) (Muller et al., 2007). Cette localisation spatio-temporelle permet de minimiser la consommation d'énergie et les effets néfastes de l'augmentation calcique cytoplasmique généralisée dans une cellule (Muller et al., 2007). Enfin, le couplage sélectif peut être un mécanisme important pour assurer la spécificité de la signalisation calcique afin de diriger les cellules vers un phénotype bien déterminé.

Les canaux SK et IK ont une affinité élevée pour le calcium *via* leur interaction avec la calmoduline, ce qui suggère une relation étroite entre ces canaux K⁺ et une source de Ca²⁺.

Ainsi, une distance entre 10 et 150 nM a été décrite entre SK2 avec le canal calcique voltage-dépendant de type L dans les cellules pyramidales (Marrion and Tavalin, 1998) et avec le récepteur NMDA dans les neurones de l'hippocampe (Ngo-Anh et al., 2005). De plus, les canaux SK sont activés par un canal de type R dans les dendrites des cellules pyramidales de l'amygdale latérale (Bloodgood and Sabatini, 2007) (Faber et al., 2005), et par des canaux de type T dans les neurones thalamiques (Cueni et al., 2008). Cependant, les mécanismes permettant de comprendre ces spécificités d'activation restent encore flous. Malgré ces données, aucune association directe des canaux SK ou IK avec canal calcique voltage-dépendant n'a été démontrée biochimiquement jusqu'à présent.

3. Canaux Kv, KCa dans les cellules épithéliales

Une grande variété de canaux potassiques est également exprimée dans les cellules épithéliales. Les canaux potassiques des cellules épithéliales jouent un rôle essentiel dans le transport de nutriments et d'électrolytes, dans la régulation du volume et du pH cellulaire, dans la sécrétion et enfin dans la progression du cycle cellulaire, dans la différenciation et l'apoptose (O'Grady and Lee, 2005).

La migration des cellules épithéliales joue un rôle précoce dans les phénomènes de cicatrisation. Ainsi, dans l'intestin, la formation d'un nouvel épithélium exige un mouvement des cellules épithéliales différenciées dans la zone endommagée. Il a été montré que la différenciation de ces cellules induisait une augmentation de l'expression et de l'activité des canaux Kv1.1 et Kv1.5 (Rao et al., 2002). De plus, l'inhibition de l'activité des canaux Kv par une déplétion de polyamines inhibe la migration, montrant l'implication de ces canaux dans ce phénomène. Enfin une étude menée sur les fibrocytes, cellules présentes dans le sang et

participant au remodelage tissulaire, montre que les canaux potassiques calcium-dépendants de type IK participent à la migration de ces cellules (Cruse et al., 2011).

Une des caractéristiques de l'apoptose est une diminution du volume cellulaire et une réduction de la concentration de potassium cytoplasmique (Lang et al., 2004) (Wang, 2004). Cette diminution du potassium intracellulaire favorise les phases précoces de mort cellulaire comme le clivage protéolytique de la pro-caspase 3 ou l'augmentation de l'activité de l'endonucléase. De plus, le changement de volume cellulaire et de concentration de K^+ ont été attribués à une augmentation de l'efflux potassique *via* les canaux K^+ de la membrane plasmique. En effet, l'élévation du taux de potassium intracellulaire ou un traitement au TEA bloque l'apoptose des différents types cellulaires (Ekhterae et al., 2001) (Renaudo et al., 2004) (Wei et al., 2003).

Les canaux potassiques sont impliqués dans le processus prolifératif de nombreux types cellulaires. Parmi, les canaux Kv impliqués dans ce processus, on peut citer les canaux EAG (ether à go-go, ou Kv10.1) et HERG (Human EAG-related K^+ Channel). L'activité de ces canaux est modulée au cours du cycle cellulaire chez l'embryon de Xénope (Day et al., 2001). Ces canaux sont inhibés lors de la transition G2/M, ce qui provoque la dépolarisation de la membrane (Bruggemann et al., 1997). En revanche, l'activité de ces canaux est plus élevée lors de la transition M/G1. Comme ces canaux, les canaux K_{Ca} peuvent être impliqués dans la croissance cellulaire. Ainsi, une étude menée par Khanna et collaborateurs a montré que le canal IK régule la prolifération des lymphocytes (Khanna et al., 1999). En effet, des inhibiteurs des canaux IK favorisent l'arrêt de la prolifération des lymphocytes T. De plus, son expression augmente durant l'activation des lymphocytes T passant de 8 à 300-800 canaux/cellule (Ghanshani et al., 2000).

4. Canaux potassiques et cancer

Les canaux Kv sont également largement distribués dans les cellules tumorales issues de cellules épithéliales. Dans la lignée MCF-7 et les tumeurs du sein, l'expression de Kv1.1 et Kv1.3 ainsi que leur implication dans la prolifération cellulaire ont été démontrées (Ouadid-Ahidouch et al., 2000) (Abdul et al., 2003). En effet, l'incubation des cellules MCF-7 avec 1 ou 10 nM de dendrotoxine inhibe la prolifération, avec une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée de 20% et 30% respectivement (Ouadid-Ahidouch et al., 2000). De plus, des études d'immunohistochimie sur des tumeurs mammaires humaines montrent que presque 90% des tissus cancéreux expriment Kv1.3 qui n'est pas détectable dans le tissu sain (Abdul et al., 2003). Des résultats similaires sont retrouvés dans le cancer du côlon, montrant une

corrélation entre l'expression de Kv1.3 et la tumorigenèse (Abdul and Hoosein, 2002). De plus, le canal hERG voit son expression varier en fonction des différentes phases du cycle cellulaire dans les cellules tumorales (Crociani et al., 2003). En effet, l'inhibition de ce canal induit une inhibition de la prolifération des cellules leucémiques, favorisant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Pillozzi et al., 2002). Cependant, le rôle de ce canal reste controversé. Une étude récente montre au contraire que l'activation de hERG dans l'adénocarcinome mammaire mène à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 en activant la sénescence (Lansu and Gentile, 2013). De plus, Pardo et collaborateurs ont mis en évidence le rôle oncogénique *in vivo* du canal EAG grâce à une approche par xénogreffes sur des souris *nude* (Pardo et al., 1999). L'inhibition du canal EAG réduit la prolifération cellulaire alors qu'une surexpression favorise le développement tumoral mammaire.

Les canaux KCa sont présents dans de nombreux types cellulaires cancéreux, tel que le sein ou la prostate (Kunzelmann, 2005) (Fiske et al., 2006). En effet, les canaux BK peuvent être activés par les œstrogènes qui jouent un rôle essentiel dans les cancers du sein et de la prostate (Coiret et al., 2007) (Valverde et al., 1999). Une étude, menée en 2012, montre que BK est surexprimé dans certains cancers du sein, des cancers avec un stade avancé et un pronostic défavorable. De plus, ces mêmes auteurs montrent que l'œstradiol induit la prolifération des cellules cancéreuses mammaires *via* l'activation du canal BK (Oeggerli et al., 2012). Par ailleurs, Bloch et collaborateurs présentent le gène du canal BK comme une cible du cancer de la prostate. En effet, une amplification génique du gène codant pour le canal BK est retrouvée dans 16% des cancers prostatiques (Bloch et al., 2007). De plus, la suppression de BK par siARN ou son inhibition par iberiotoxine diminue la prolifération des cellules PC3, cellules qui expriment largement le canal BK. Cette étude suggère un rôle spécifique de ce canal vers l'hormono-indépendance du cancer de la prostate. De même, une étude du laboratoire montre que le canal IK est exprimé préférentiellement dans le tissu cancéreux prostatique comparé aux tissus issus des HBP. Le canal IK forme un complexe avec le canal TRPV6, complexe fonctionnel permettant l'entrée calcique et la prolifération des cellules LNCaP et PC3 (Lallet-Daher et al., 2009).

B. Les sous-unités régulatrices des canaux VDCC

La diversité fonctionnelle des canaux calciques voltage-dépendants est due à l'existence d'une grande variété de sous-unités pores, α_1 , mais aussi probablement à l'association du canal avec des sous-unités accessoires. En effet, la caractérisation moléculaire des canaux calciques

voltage-dépendants a débuté avec la purification et le clonage du canal de type L du muscle squelettique. Le complexe protéique purifié est composé de 5 sous-unités, α_1 la sous-unité « pore » et les sous-unités régulatrices, α_2 , δ , β et γ (Tanabe et al., 1987). Les sous-unités α_2 et δ sont reliées par des ponts disulfures et ne forment qu'une protéine appelée $\alpha_2\delta$. Actuellement, il est fermement établi que les canaux calciques voltage-dépendants de type L, N et P/Q sont composés de ces différentes sous-unités dans différents tissus (Figure 20). En ce qui concerne les canaux T, aucune corrélation structurale et fonctionnelle n'est démontrée pour l'instant entre les sous-unités pores (que ce soit $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.3$) et des sous-unités régulatrices de manière endogène.

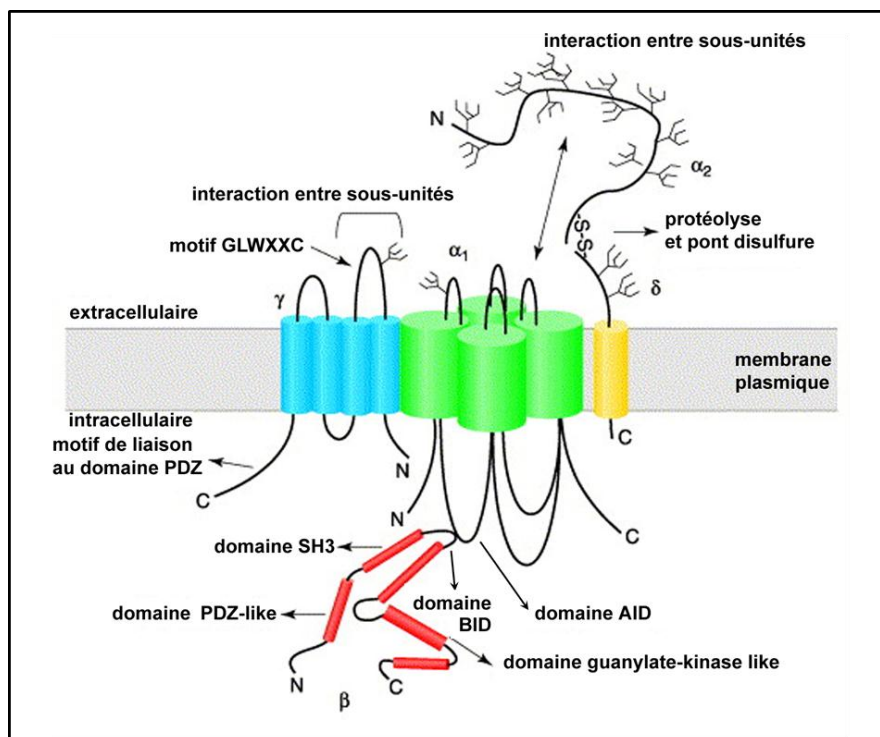


Figure 20 : Organisation moléculaire des différentes sous-unités des canaux calciques voltage-dépendants HVA (d'après Arikath and Campbell, 2003)

1. Les sous-unités β

Il existe 4 formes différentes de sous-unités β , dénommées β_1 , β_2 , β_3 et β_4 codées par 4 gènes différents, $CACNB1$ à $CACNB4$. Le clonage de la première sous-unité β , la sous-unité β_1 , fut réalisé par Ruth et collaborateurs dans le muscle squelettique (Ruth et al., 1989).

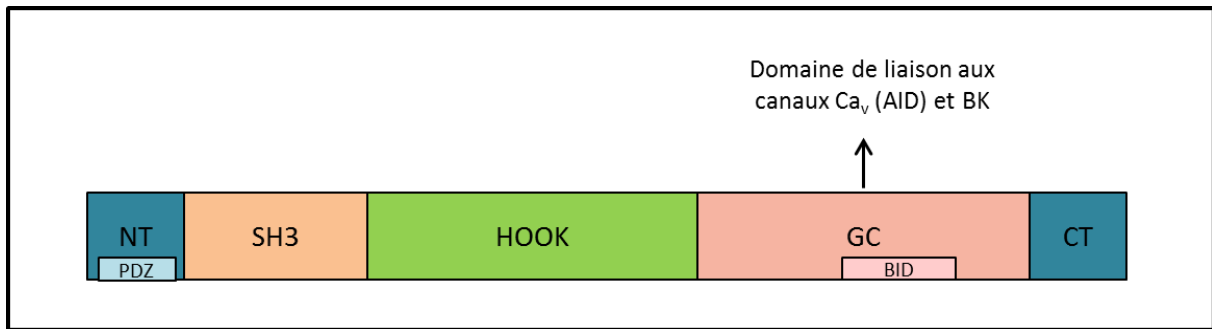


Figure 21 : Représentation schématique des différents domaines de la sous-unité β

La protéine β est une protéine cytoplasmique d'environ 55 kDa. En présence des canaux calciques de type Ca_v , les sous-unités β sont localisées et associées aux canaux à la membrane plasmique. Les sous-unités β contiennent plusieurs régions bien distinctes (Figure 21) (Buraei and Yang, 2010). Deux régions sont bien conservées, il s'agit du domaine SH3 (Src Homology domain) et du domaine GK (Guanylate Kinase domain) qui interviennent dans les interactions protéiques. Ces deux domaines sont reliés entre eux par une région appelée HOOK. L'association de ces 3 domaines, SH3-HOOK-GK place la protéine β dans une famille de protéines appelées MAGUKs (pour Membrane Associated Guanylate Kinase), intervenant dans l'organisation d'un complexe multiprotéique avec des fonctions et une localisation spécifiques. De plus, les protéines β contiennent des domaines PDZ dans leur région N-Terminale qui servent également aux interactions protéiques et aux fonctions d'oligomérisation et de « clustering » (concentration des protéines dans des régions bien déterminées). Pragnell et collaborateurs ont identifié la région d'interaction entre la sous-unité β et de la sous-unité pore α_1 du canal $Ca_v1.1$ (Pragnell et al., 1994). Ainsi, cette région nommée AID (α -interaction domain) sur la sous-unité α est composée de 18 résidus, très conservés, situés sur la boucle intracellulaire entre le domaine I et II, des canaux Ca_v1 et Ca_v2 capables de lier les différentes sous-unités β (Figure 22). La séquence AID des canaux Ca_v3 est moins conservée et permet une interaction de faible affinité avec les sous-unités β (Bae et al., 2010). De Waard et collaborateurs montrent qu'une séquence de 31 acides-aminés des sous-unités β , domaine BID (β -interacting domain) est capable de reconnaître le site AID (De Waard et al., 1994). En effet, des études sur la structure des protéines β montrent que BID appartient à la région GK (Buraei and Yang, 2010). Enfin, une partie du domaine GK est capable d'interagir avec d'autres protéines, comme cela a été montré pour β_1 et le canal BK (Zou et al., 2008).

a. Distribution tissulaire

Les sous-unités β sont fortement exprimées par les tissus excitables, tels que le cerveau, le cœur et les muscles (Buraei and Yang, 2010). La sous-unité $\beta 1$, partenaire exclusif du canal $Ca_v1.1$ est nécessaire dans le couplage excitation/contraction. Cette sous-unité est également exprimée dans la rate et les lymphocytes T. Concernant la sous-unité $\beta 2$, son expression est constante durant le développement. Elle est exprimée par les lymphocytes, les ostéoclastes, et le poumon (Buraei and Yang, 2010). Comme $\beta 2$, $\beta 3$ est exprimée par le poumon, mais aussi par la rate, les lymphocytes, et la trachée. La sous-unité $\beta 3$ est également la seule à être exprimée par le foie. Elle est la sous-unité privilégiée du canal $Ca_v2.2$ dans le cerveau. Enfin, la sous-unité $\beta 4$ est exprimée par les reins, les ovaires, les testicules alors que son expression est absente au niveau du cœur, des poumons, de la rate et du thymus (Buraei and Yang, 2010). Cette sous-unité est souvent associée au canal $Ca_v2.1$.

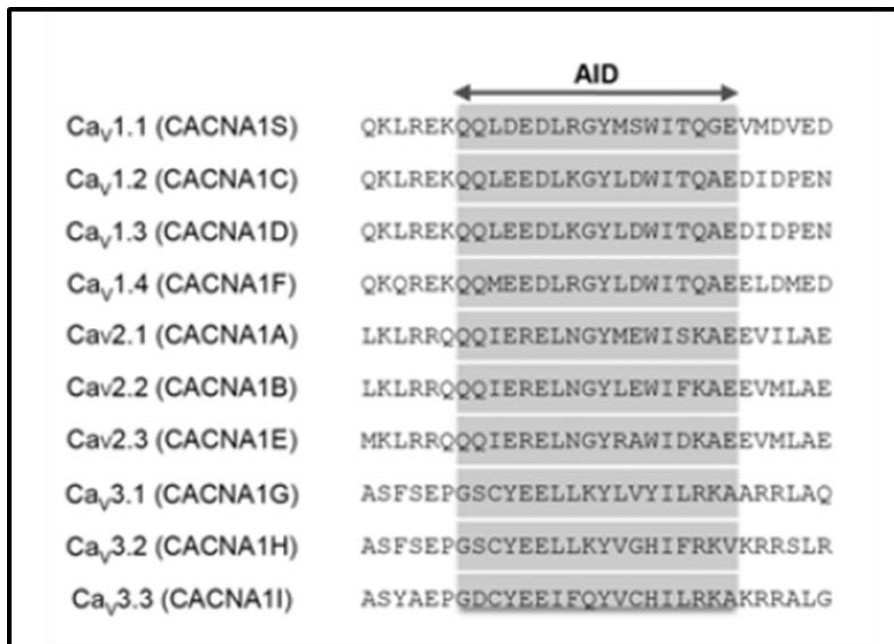


Figure 22: Alignement des séquences AID des canaux calciques voltage-dépendants. Les séquences AID (α interaction domain) sont bien conservées pour les canaux $Ca_v1.X$ et $Ca_v2.X$ (d'après Bae et al., 2010).

b. Rôles physiologiques des sous-unités β

La sous-unité β joue un rôle crucial dans l'adressage du canal auquel elle est associée vers la membrane plasmique et par conséquent sur son expression membranaire. Il a été montré que la sous-unité β pouvait être considérée comme une protéine chaperone en augmentant l'expression membranaire des canaux Ca_v1 et Ca_v2 (Buraei and Yang, 2010).

Les modèles d'expression tels que les ovocytes de *Xénope* ou la lignée cellulaire HEK-293 expriment de manière endogène la sous-unité $\beta 3$ (Tareilus et al., 1997), expression suffisante pour observer un courant calcique voltage-dépendant endogène. La dépendance de l'expression de certains canaux VDCC vis-à-vis des sous-unités régulatrices β est montrée par Canti et collaborateurs (Canti et al., 2001). Ces auteurs ont mis en évidence que la suppression de la sous-unité $\beta 3$ conduit à la suppression du canal $Ca_v2.2$ et l'expression de celle-ci conduit à une augmentation de l'expression du canal dans les ovocytes. De plus, β peut également augmenter l'expression du canal calcique *in vivo*. Ainsi, les souris KO $\beta 1$ et $\beta 2$ présentent des courants calciques réduits dans les muscles et le cœur respectivement (Gregg et al., 1996) (Weissgerber et al., 2006). Il a été établi que les sous-unités β participent à l'adressage du canal à la membrane plasmique en masquant le signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique, situé sur la boucle intracellulaire entre le domaine I et II de la sous-unité α (Bichet et al., 2000) (Cornet et al., 2002). Ainsi, le canal $Ca_v2.2$ muté dans sa région AID voit sa durée de vie diminuée et une dégradation plus rapide probablement par l'absence de liaison à la sous-unité β conduisant à sa rétention au niveau réticulaire (Waithe et al., 2011). Par ailleurs, une étude a montré récemment que la sous-unité $\beta 1$ augmente l'expression des canaux de type L, $Ca_v1.2$ à la membrane plasmique en empêchant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Altier et al., 2011).

Les sous-unités β sont aussi des cibles de seconds messagers à travers leur phosphorylation par la PKA, CaMKII ou PI3K-Akt. Par exemple, la phosphorylation de la sous-unité $\beta 2$ par la voie PI3K-Akt augmente l'expression membranaire des canaux $Ca_v2.2$ et $Ca_v1.2$ dans les neurones et dans les cellules Cos-7 (Viard et al., 2004).

En plus de son rôle sur l'expression des canaux calciques, β peut avoir un rôle sur les propriétés propres du canal, à savoir son activation, son inactivation et sa probabilité d'ouverture (Buraei and Yang, 2010). En effet, toutes les sous-unités β sont capables de décaler l'activation des canaux vers des potentiels hyperpolarisés. Ainsi, Jangsongthong et collaborateurs montrent l'effet des sous-unités $\beta 1$ et $\beta 2$ sur le canal $Ca_v1.2$ dans les cellules HEK293. En présence des sous-unités β , le courant calcique est multiplié par 4 environ, passant de 15 pA/pF à 50/60 pA/pF, la courbe d'activation est décalée de 10 à 20 mV vers les potentiels hyperpolarisés, avec un shift plus important avec la sous-unité $\beta 1$. De même, $\beta 1$ ou $\beta 2$ décale la courbe d'inactivation du canal $Ca_v1.2$ vers les voltages plus négatifs et accélère l'inactivation du canal $Ca_v1.2$ (Jangsongthong et al., 2011).

Les courants calciques $Ca_v2.X$ peuvent être inhibés par l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). En effet, leur inhibition voltage-dépendante est induite par une liaison

directe des protéines G $\beta\gamma$ sur le canal. On a longtemps pensé que l'effet des protéines G était contrebalancé par la sous-unité β . En effet, dans les neurones, la suppression des sous-unités β augmente l'inhibition du courant calcique induite par les protéines G (Campbell et al., 1995). De plus, la coexpression des deux partenaires dans les ovocytes diminue cette inhibition (Bourinet et al., 1996). Cependant, une étude a montré plus tard que l'inhibition induite par les protéines G sur le courant calcique de type N est augmentée par la sous-unité β (Meir et al., 2000). De même, un mutant de Ca $_v$ 2.2 sur le domaine AID, incapable de se fixer à la sous-unité β , ne présente plus d'inhibition due aux protéines G (Leroy et al., 2005). Ceci indique donc que la sous-unité β joue un rôle très important dans l'inhibition des canaux calciques voltage-dépendants par les protéines G.

Enfin, plusieurs études suggèrent que les sous-unités β sont des régulateurs de la transcription génique (Zhang et al., 2010) (Tadmouri et al., 2012). Ainsi, Zhang et collaborateurs montrent que la sous-unité β_3 est capable d'interagir directement avec Pax6, un facteur de transcription impliqué dans le développement des yeux et du cerveau (Zhang et al., 2010). De même, dans la différenciation neuronale, β_4 interagit avec B56 δ , une sous-unité régulatrice nucléaire de la phosphatase 2A (Tadmouri et al., 2012). Dans le noyau, ce complexe s'associe aux nucléosomes et régule la déphosphorylation des histones, un mécanisme clé dans la régulation de la transcription.

2. Les sous-unités γ

La première sous-unité γ découverte dans le muscle squelettique est γ_1 . Depuis, très peu de recherches se sont portées sur les sous-unités γ , contrairement aux autres sous-unités accessoires. Il existe 8 gènes différents, allant de CACNG1 à CACNG8, codants pour les sous-unités γ , γ_1 à γ_8 . Ces protéines d'environ 30-35kDa sont caractérisées par 4 hélices transmembranaires avec les extrémités C-terminale et N-terminale intracellulaires (Figure 23). Elle contient une boucle extracellulaire avec un motif précis, GLWXXC, un site de N-glycosylation et un pont disulfure. Basé sur leur homologie de séquences et de distribution tissulaire, les sous-unités γ sont divisées en 2 groupes (Chu et al., 2001) : les sous-unités γ squelettiques (γ_1 et γ_6) et les sous-unités γ neuronales (γ_2 à γ_5 , γ_7 et γ_8). γ_1 et γ_6 sont donc préférentiellement exprimées dans le muscle squelettique et possèdent une courte extrémité C-terminale. Les autres isoformes sont exprimées par les neurones, ont une longue extrémité C-terminale et sont divisées en 2 sous-groupes. En effet, γ_2 à γ_4 et γ_8 possèdent un domaine PDZ similaire (RR/KTTPV) au niveau de l'extrémité C-terminale, tandis que celui-ci diffère sur γ_5 et γ_7 (Chu et al., 2001). De plus, il a été proposé que γ pouvait appartenir à la famille

des claudines, protéines d'adhésion intervenant dans les jonctions serrées (Tomita et al., 2001). Les claudines sont similaires aux sous-unités γ neuronales avec leur 4 domaines transmembranaires, un domaine PDZ, un motif GLWXXC en extracellulaire, et un pont disulfure. Une étude montre que $\gamma 2$ favorisait l'adhésion des fibroblastes comme la claudine 1 mais de manière Ca^{2+} dépendante (Price et al., 2005).

Plusieurs études ont montré l'association de la sous-unité γ avec les canaux calciques voltage-dépendants. En effet, après l'association de $\gamma 1$ avec le canal de type L du muscle squelettique, il a été montré que $\gamma 2$ et $\gamma 3$ pouvaient s'associer avec $\text{Ca}_v2.1$ et $\text{Ca}_v2.2$ dans les neurones (Kang et al., 2001). Cependant, aucune étude ne met en évidence une interaction entre γ et les canaux calciques voltage-dépendants de type T.

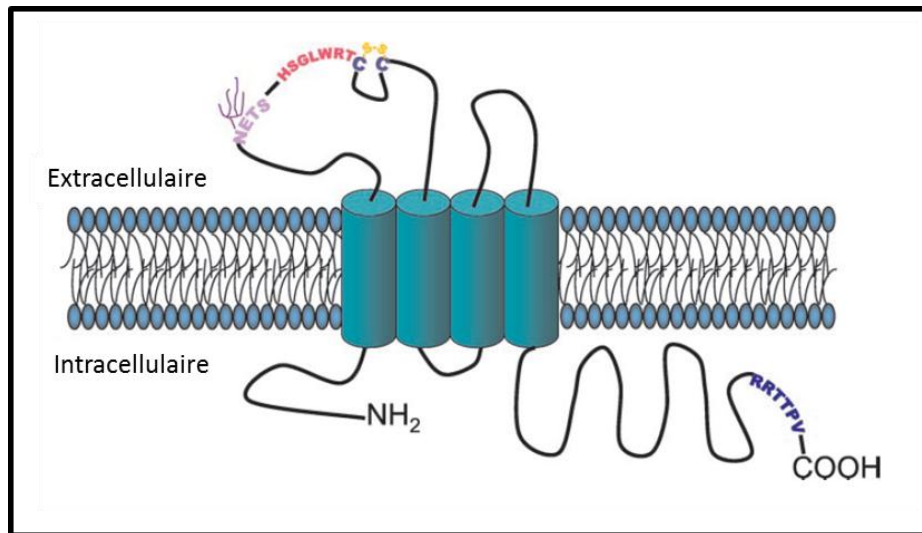


Figure 23 : Structure potentielle des sous-unités γ , (d'après Kang and Campbell, 2003)

a. Distribution tissulaire

Les sous-unités $\gamma 1$ et $\gamma 6$, comme cité précédemment, sont essentiellement exprimées par le muscle squelettique. Les γ neuronales sont principalement exprimées dans le cerveau. Cependant, contrairement aux protéines $\gamma 3$ et $\gamma 5$, les autres sous-unités neuronales sont exprimées dans d'autres tissus. En effet, $\gamma 2$ et $\gamma 8$ sont retrouvées dans les testicules tandis que $\gamma 4$ est exprimée dans les poumons et la prostate (Kang and Campbell, 2003).

b. Rôles physiologiques des sous-unités γ

Il a été montré que les sous-unités $\gamma 1$ à $\gamma 4$ sont associées aux canaux VDCC avec différents effets sur leur activité. L'effet principal de la sous-unité γ est une réduction du courant calcique causée principalement par un décalage des courbes d'activation et d'inactivation du

canal (Yang et al., 2011) (Kang et al., 2001). En effet, Kang et collaborateurs montrent que la coexpression de $\gamma 2$ avec les sous-unités α_{1A} ($Ca_v2.1$), $\beta 3$, $\alpha 2\delta$ du canal de type P/Q ou α_{1B} ($Ca_v2.2$), $\beta 3$, $\alpha 2\delta$ du canal de type N dans les ovocytes de xénope diminue l'amplitude du courant de 39.7% et 36.8 % respectivement. De plus, $\gamma 2$ est responsable d'un décalage des courbes d'activation et d'inactivation du canal $Ca_v2.1$ vers les potentiels positifs (Kang et al., 2001). De la même manière, la sous-unité $\gamma 6$ montre un effet inhibiteur sur la canal $Ca_v3.1$ (Lin et al., 2008). Cependant, la fonction de $\gamma 5$ reste inconnue. De plus, Hansen et collaborateurs montrent dans les cellules HEK, que la sous-unité $\gamma 6$ diminue de 49% la densité du courant calcique due au canal $Ca_v3.1$ sans modifier sa courbe d'activation, d'inactivation ou la cinétique du courant généré (Hansen et al., 2004). De plus, γ n'a aucun effet sur l'expression du canal $Ca_v3.1$, que ce soit au niveau des ARNm qu'au niveau de l'adressage à la membrane plasmique. Néanmoins, $\gamma 7$ est impliquée dans le renouvellement de l'ARNm de $Ca_v2.2$ (Ferron et al., 2008).

D'autre part, les sous-unités γ ont d'autres fonctions biologiques. En effet, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$ et $\gamma 8$ régulent l'adressage, la localisation et les propriétés biophysiques des récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid). Il a été montré que ces sous-unités appelées protéines TARPs (Transmembrane AMPA receptor Regulatory Protein) pouvaient interagir avec le récepteur AMPA *via* leur domaine PDZ (Diaz, 2010). De plus, $\gamma 2$ favorise l'expression et la stabilité du récepteur à la membrane mais module également son activité en augmentant l'affinité du ligand pour le récepteur.

3. Les sous-unités $\alpha 2\delta$

Quatre gènes codant pour des sous-unités $\alpha 2\delta$ ont été clonés : CACNA2D1, CACNA2D2, CACNA2D3 et CACNA2D4 codant respectivement pour $\alpha 2\delta 1$, $\alpha 2\delta 2$, $\alpha 2\delta 3$ et $\alpha 2\delta 4$.

La sous-unité $\alpha 2$ est liée à la petite sous-unité δ par des ponts disulfures (Figure 24). Suite au clonage initial d'ADNc d' $\alpha 2\delta 1$ exprimé dans le muscle squelettique et le séquençage de la partie N-terminale de δ , il a été montré que les protéines $\alpha 2$ et δ étaient exprimées par le même gène qui code la pré-protéine $\alpha 2\delta$ (De Jongh et al., 1990). Cette pré-protéine est ensuite clivée post-traductionnellement en 2 protéines, $\alpha 2$ et δ (Jay et al., 1991). La protéase impliquée et la localisation de ce clivage ne sont pas connues à l'heure actuelle. La formation du pont disulfure et des N-glycosylations, à la fois sur $\alpha 2$ et δ (Jay et al., 1991), surviennent dans le réticulum endoplasmique et dans l'appareil de Golgi avant le clivage protéolytique (Davies et al., 2010), laissant donc les protéines $\alpha 2$ et δ associées (Figure 24). En tenant en compte des glycosylations et des ponts disulfures, la protéine $\alpha 2\delta$ présente un poids

moléculaire d'environ 175 kDa. Seules et dépourvues de glycosylations, les protéines α_2 et δ font respectivement 150 et entre 17 et 25 kDa (Jay et al., 1991).

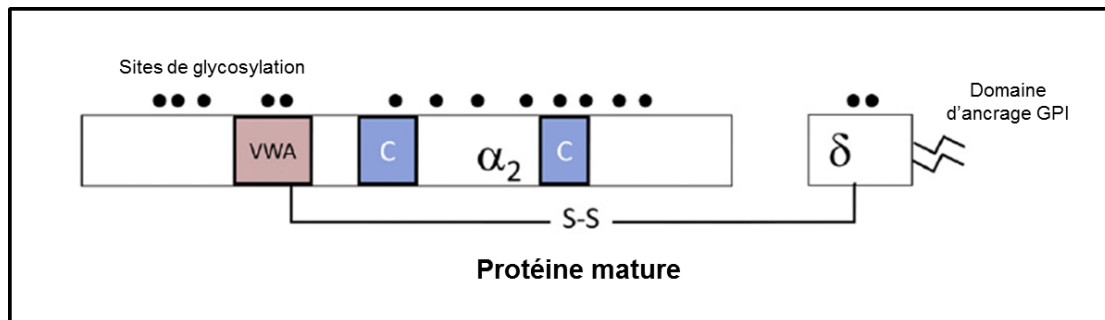


Figure 24 : Représentation schématique des différents domaines de la protéine $\alpha_2\delta_2$ (d'après Dolphin, 2013)

Les résidus impliqués dans cette association ont été identifiés sur la protéine $\alpha_2\delta_1$ (Calderon-Rivera et al., 2012). Ainsi, les résidus cystéine 404 et 1047, situés respectivement dans le domaine VWA d' α_2 et dans la partie extracellulaire de δ_1 , forment un pont disulfure intervenant dans les fonctions de la sous-unité $\alpha_2\delta_1$.

La partie N-terminale de la protéine est extracellulaire et correspond à α_2 tandis que le côté C-terminal est hydrophobe. Cette partie hydrophobe comprend quelques acides-aminés (entre 10 et 20), se situe dans la membrane plasmique et correspond à δ .

La protéine δ , longtemps présumée comme étant transmembranaire, a récemment été montrée comme étant attachée à la membrane *via* un groupement GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Davies et al., 2010). La sous-unité δ maintient la sous-unité α_2 à la membrane, α_2 étant totalement extracellulaire.

Toutes les sous-unités $\alpha_2\delta$ contiennent des domaines protéiques particuliers, tel que le domaine VWA (pour Von Willebrand factor A domain) (Dolphin, 2013). En général, ces domaines sont impliqués dans les interactions protéines/protéines, en particulier entre les protéines de la matrice extracellulaire et les protéines d'adhésion cellulaire, à travers le motif MIDAS (Metal ion-dependent adhesion site motif) constitué de 5 acides-aminés (Asp 300, Ser 302, Ser 304, Thr 372 et Asp 404) (Whittaker and Hynes, 2002). Les sous-unités $\alpha_2\delta$ possèdent aussi deux domaines « cache » (ou bacterial chemosensory-like) situés en aval du domaine VWA (Figure 24) (Dolphin, 2013). Ces domaines ont été identifiés par homologie avec le récepteur de chimiotaxie bactérien.

Des études de purification et de « binding » ont permis d'identifier deux ligands pour cette famille de sous-unités accessoires, la gabapentine et la prégabaline, capables de fixer $\alpha_2\delta_1$

(Gee et al., 1996) et $\alpha 2\delta 2$ (Gong et al., 2001) notamment. Ces deux molécules sont des antiépileptiques utilisés en thérapie. Il a été montré que leur liaison sur les protéines $\alpha 2\delta$ s'effectue *via* 3 motifs arginine situés dans la partie N-terminale proche du domaine VWA (Davies et al., 2006) (Field et al., 2006).

a. Distribution tissulaire

Les sous-unités $\alpha 2\delta 1$, $\alpha 2\delta 2$ et $\alpha 2\delta 3$ sont fortement exprimées dans le SNC et périphérique (Cole et al., 2005). $\alpha 2\delta 1$ est également fortement exprimée dans le muscle squelettique mais elle est aussi présente dans de nombreux autres tissus (Gong et al., 2001), mais surtout dans les cellules excitables. $\alpha 2\delta 1$ est présente dans les muscles cardiaque et lisse où elle est associée au canal $Ca_v1.2$ (Marais et al., 2001). Contrairement à $\alpha 2\delta 1$, l'expression d' $\alpha 2\delta 2$ est plus restreinte, notamment dans les neurones GABAergiques dont les neurones de Purkinje. De plus, $\alpha 2\delta 2$ est retrouvée dans le tissu pulmonaire humain (Gong et al., 2001). La protéine $\alpha 2\delta 3$ est exprimée dans une grande partie du cerveau de rat, dont l'hippocampe et le cortex cérébral. Chez l'homme, cette protéine est également retrouvée dans les muscles squelettique et cardiaque (Gong et al., 2001). A l'inverse, $\alpha 2\delta 4$ est retrouvée spécifiquement dans le tissu endocrine et dans la rétine (Qin et al., 2002). Cependant, une étude plus récente a montré une distribution plus ubiquitaire de cette protéine mais avec une faible expression notamment dans le muscle et dans le cerveau (Wycisk et al., 2006).

Toutes les sous-unités $\alpha 2\delta$ sont souvent localisées dans des rafts lipidiques, domaines riches en cholestérol et résistants au détergent (Davies et al., 2010) (Davies et al., 2006).

b. Rôles physiologiques d' $\alpha 2\delta$

Les sous-unités $\alpha 2\delta$ sont capables de modifier les propriétés biophysiques de canaux voltage-dépendants ainsi que leur expression à la membrane plasmique.

Leur rôle principal est d'augmenter les courants calciques voltage-dépendants (Davies et al., 2006) (Gao et al., 2000) en favorisant l'adressage du canal à la membrane plasmique et/ou en retardant son recyclage (Bernstein and Jones, 2007) (Canti et al., 2005) (Gurnett et al., 1997) (Sandoval et al., 2004). Ainsi, dans les ovocytes de *xénope*, la co-expression du canal $Ca_v2.1$ et d' $\alpha 2\delta 1$ augmente à la fois l'expression du canal (Shistik et al., 1995) et l'amplitude du courant calcique P/Q de trois fois (Felix et al., 1997), tandis qu' $\alpha 2\delta 2$ l'augmente de deux fois (Gao et al., 2000). De plus, la co-expression d' $\alpha 2\delta 2$ avec les sous-unités $\beta 4$ et $\alpha 1_A$ augmente l'amplitude de ce courant calcique (Barclay et al., 2001) (Brodbeck et al., 2002). Cependant, $\alpha 2\delta 2$ n'a pas d'effet sur la conductance du canal ou sur ses propriétés électrophysiologiques,

indiquant que l'augmentation du courant observé en configuration cellule entière du patch clamp résulte d'une augmentation du nombre de canaux à la membrane plasmique.

Les canaux de type T ne nécessitent pas de sous-unités accessoires pour être exprimés de manière fonctionnelle. Cependant, il a été montré que $\alpha 2\delta 1$ et $\alpha 2\delta 2$ augmentent l'amplitude des courants générés par $Ca_v 3.1$ de plus de deux fois (Dolphin et al., 1999) (Gao et al., 2000), suggérant une association possible entre les canaux $Ca_v 3.1$ et les sous-unités accessoires. Une étude sur les ostéocytes, montre une association des protéines $Ca_v 3.2$ et $\alpha 2\delta 1$ de manière endogène (Thompson et al., 2011). De plus, $\alpha 2\delta 1$ augmente l'expression membranaire de $Ca_v 3.2$ dans ces cellules.

Il a été montré que le motif MIDAS du domaine VWA d' $\alpha 2\delta 1$ et d' $\alpha 2\delta 2$ est essentiel au mécanisme impliqué dans l'augmentation du courant voltage-dépendant (Hoppa et al., 2012) (Canti et al., 2005). En effet, une mutation de ce motif abolit la capacité des sous-unités à augmenter le courant. La mutation d' $\alpha 2\delta 2$ (motif MIDAS) provoque une rétention du canal α_{1C} ($Ca_v 1.2$) ou α_{1B} ($Ca_v 2.2$) dans les compartiments intracellulaires (Canti et al., 2005). Le domaine VWA pourrait alors jouer un rôle dans l'adressage de la sous-unité α_1 ou du complexe protéique $\alpha_1/\alpha 2\delta$ à la membrane plasmique.

De plus, la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ permet d'augmenter le courant calcique d'un facteur 4 dans les cellules HEK lorsqu'on le co-exprime avec $Ca_v 2.2$ et $\beta 3$. Cependant, la mutation des cystéines intervenant dans la formation du pont disulfure provoque une diminution du courant (Calderon-Rivera et al., 2012), ce qui implique que la formation du pont disulfure entre $\alpha 2$ et δ est essentielle à la fonction de cette sous-unité.

Une récente étude a révélé qu'une application chronique de gabapentine diminue la localisation à la surface cellulaire des sous-unités α_1 des canaux $Ca_v 2.1$ et $Ca_v 2.2$ et des sous-unités $\alpha 2\delta 1$ et $\alpha 2\delta 2$, menant à une réduction des courants calciques voltage-dépendants (Hendrich et al., 2008). De plus, la gabapentine perturbe le trafic post-golgien et l'adressage à la membrane plasmique mais n'a pas d'action sur l'internalisation de la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ (Tran-Van-Minh and Dolphin, 2010).

Plus récemment, il a été montré qu' $\alpha 2\delta$ fonctionnait comme le récepteur à la thrombospondine pour réguler la fonction excitatrice des synapses, indépendamment de la régulation de canal (Eroglu et al., 2009) (Kurshan et al., 2009). De plus, la gabapentine peut inhiber l'interaction entre $\alpha 2\delta 1$ et la thrombospondine *in vitro* et perturber ainsi la synaptogenèse (Eroglu et al., 2009).

4. Les sous-unités régulatrices et cancer

La question du rôle des sous-unités régulatrices des canaux calciques voltage-dépendants dans les cancers commence seulement à être abordée par la communauté scientifique. En effet, peu d'études concernent l'implication des sous-unités β et γ dans le cancer. Cependant, une étude montre que lors de la différenciation des cellules humaines de neuroblastome IMR32, le canal $Ca_v2.2$ ainsi que sa sous-unité accessoire $\beta1$ voient leur expression augmentée (McEnery et al., 1997). Par ailleurs, le gène *CACNB3*, codant la sous-unité $\beta3$, est surexprimé dans les cancers pulmonaires NSCL récurrents, et cela quelque soit la population concernée, le grade du cancer et l'état histologique de la tumeur (Mitra et al., 2011). Concernant la sous-unité γ , le gène *CACNG4* est associé à une résistance au erlotinib, un agent antiproliférant du glioblastome (Halatsch et al., 2009).

Par ailleurs, l'importance des sous-unités dans le processus cancéreux a été montrée pour le gène *CACNA2D2*, situé sur le locus 3p21.3, région délétée dans les cancers du sein et du poumon (Lermann Minna 2000) (Wei et al., 1996). La délétion de la région 3p est détectée dans 100% des cancers du poumon, du rein, et dans 80% des cancers du sein (Senchenko et al., 2004). Chez l'homme, le chromosome 3 contient donc un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, spécifiques ou communs aux différents types de cancer. Ainsi, ces données encouragent les auteurs à supposer que les gènes *CACNA2D2* et *CACNA2D3* puissent être de potentiels gènes suppresseurs de tumeur. En effet, Carboni et collaborateurs ont montré qu' $\alpha2\delta2$ est exprimée dans le tissu pulmonaire normal et absent dans le tissu cancéreux. De plus, sa présence est liée à une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires NSCLC (non-small cell lung cancer) (Carboni et al., 2003).

Depuis peu, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle d' $\alpha2\delta3$ dans les cancers. En effet, la suppression du locus 3p21.1, locus dont fait partie le gène *CACNA2D3*, est observée dans certains cancers dont les cancers œsophagiens (Qin et al., 2008) et rénaux (Hanke et al., 2001). Wanajo et collaborateurs ont montré d'autre part que l'inhibition du gène *CACNA2D3* par hyperméthylation du promoteur est associée à un mauvais pronostic du cancer gastrique (Wanajo et al., 2008), tout comme dans le cancer du sein (Palmieri et al., 2012). Une diminution de l'expression d' $\alpha2\delta3$, de l'ordre de 80 fois, est observée dans la lignée métastatique d'ostéosarcome, MG63-A1, comparée aux cellules normales (Xiong et al., 2009). De plus, une récente étude menée par Wong et collaborateurs, sur les cancers du nasopharynx, montre une diminution d'expression du transcrit du gène *CACNA2D3* dans le tissu cancéreux comparé au tissu sain adjacent (Wong et al., 2013). Cette diminution serait

due à une méthylation du gène et/ou à une déacétylation des histones. De plus, la surexpression d' $\alpha 2\delta 3$ diminue la prolifération cellulaire, la croissance tumorale *in vivo* et atténue l'invasion cellulaire ainsi que la formation de métastases (Wong et al., 2013). Enfin, cette étude montre également qu' $\alpha 2\delta 3$ augmente l'apoptose des cellules tumorales nasopharyngiennes.

Cependant, une récente étude menée par Zhao et collaborateurs remet en question le pouvoir suppresseur de tumeur de ces sous-unités régulatrices et démontre que la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ est impliquée dans l'initiation tumorale des cancers du foie (Zhao et al., 2013). Il identifie la sous-unité $\alpha 2\delta 1$ comme le nouveau marqueur des cellules souches cancéreuses des hépatocarcinomes (Zhao et al., 2013) (Sainz and Heeschen, 2013).

De plus, la suppression d' $\alpha 2\delta 1$ réduit la formation de tumeur et induit l'apoptose tandis que sa surexpression induit la formation « d'hépatosphères » régulée par le calcium (Wang et al., 2013).

L'ensemble de ces données suggère que les sous-unités régulatrices des canaux calciques voltage-dépendants, surtout $\alpha 2\delta$, jouent un rôle important non seulement dans la physiologie normale des cellules en modulant l'expression ou l'adressage des canaux VDCC, mais également elles peuvent être impliquées dans la cancérogenèse. Il serait donc intéressant d'étudier l'implication de ces protéines accessoires (régulatrices) dans la physiopathologie prostatique.

PROBLEMATIQUE
ET
OBJECTIFS

La progression du cancer de la prostate est associée à une augmentation du nombre de cellules neuroendocrines (Abrahamsson, 1999). Ainsi, leur présence est corrélée à un pronostic clinique défavorable du cancer de la prostate. Cependant, leur rôle au sein du cancer de la prostate fait l'objet de nombreuses recherches. Des travaux du laboratoire ont montré qu'une absence de stéroïdes entraîne la différenciation neuroendocrine de la lignée cancéreuse androgéno-dépendante, LNCaP. Cette différenciation s'accompagne de la surexpression des canaux calciques voltage-dépendants de type T, $Ca_v3.2$ (Mariot et al., 2002). Ce canal intervient dans la sécrétion de phosphatase acide prostatique, marqueur bien connu du cancer de la prostate (Gackiere et al., 2008). De plus, l'expression du canal $Ca_v3.2$ est plus importante dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus hyperplasiques. Afin de déterminer l'importance de ce canal et de comprendre son fonctionnement et sa régulation dans la cancérogenèse prostatique, **l'objectif de cette thèse était de déterminer les protéines partenaires de ce canal ainsi que leur(s) rôle(s) physiopathologique(s).**

Il est bien connu que les canaux calciques voltage-dépendants peuvent interagir avec différents canaux potassiques régulant ainsi leur activité (Berkefeld et al., 2010). C'est pourquoi, dans un premier temps, nous nous sommes demandés si le canal calcique $Ca_v3.2$ était associé avec un canal potassique et lequel ? Si oui, ces deux canaux sont-ils couplés fonctionnellement, et quel serait le rôle de ce couplage dans la cancérogenèse prostatique ?

Par ailleurs, la structure multimérique des canaux calciques voltage-dépendants de type T reste peu connue à l'heure actuelle. En revanche, il a été montré que les canaux calciques voltage-dépendants de type L sont associés à des sous-unités régulatrices de type β , γ et $\alpha 2\delta$ (Tanabe et al., 1987). Ces sous-unités peuvent moduler l'expression et l'activité du canal calcique voltage-dépendant (Buraei and Yang, 2010). Nous nous sommes alors demandés si des sous-unités régulatrices des canaux calciques voltage-dépendants étaient exprimées dans le tissu cancéreux prostatique et si ces sous-unités pouvaient s'associer de manière fonctionnelle avec le canal calcique $Ca_v3.2$.

Mon travail de thèse s'est ensuite orienté vers l'étude du rôle de ces sous-unités dans la cancérogenèse prostatique, avec un intérêt particulier pour la protéine $\alpha 2\delta 2$ que nous avons identifiée pendant la thèse comme étant exprimée dans les cellules prostatiques. En effet, selon une hypothèse récente, le gène CACNA2D2, codant pour la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ pourrait être un gène suppresseur de tumeur. Il a ainsi été montré que la délétion du locus 3p21, locus de ce gène, était retrouvée dans les cancers du poumon et du sein (Lerman and Minna, 2000) (Wei et al., 1996).

Dès lors, nous nous sommes demandés si ces sous-unités participaient, comme le canal Ca_v3.2, à la prolifération cellulaire et à la sécrétion. Leur expression est-elle corrélée avec la progression androgéno-indépendante du cancer de la prostate ?

Enfin, le dernier point important de ma thèse était de déterminer l'implication du canal Ca_v3.2 dans la différenciation neuroendocrine. Les travaux du laboratoire montrent que ce canal est surexprimé au cours de la différenciation neuroendocrine (Mariot et al., 2002). Ce canal participe-t-il à l'induction de la différenciation neuroendocrine ou sa surexpression est-elle une conséquence du processus de différenciation ? Afin de répondre à cette question, nous avons notamment étudié la corrélation d'expression entre le canal et les marqueurs de différenciation neuroendocrine.

L'étude de ces différents points a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe protéique impliqué dans les phénomènes de sécrétion et de croissance cellulaire. Nous avons identifié une nouvelle protéine impliquée dans la cancérogenèse prostatique, $\alpha 2\delta 2$, qui par son expression et son rôle indépendant du canal, pourrait constituer un marqueur utilisable en diagnostic et une cible potentielle dans les traitements des cancers prostatiques.

En résumé, les études que j'ai menées contribuent à une meilleure compréhension du rôle du canal Ca_v3.2 et de ses protéines associées dans la physiopathologie prostatique humaine.

L'ensemble de ces travaux a permis la publication d'un article (publié dans BiologyOpen) et d'un chapitre de livre (sous presse), la soumission d'un brevet auprès de la SATT-Nord (Société d'Accélération de Transfert de Technologie) et la préparation de 2 autres articles dont la soumission est pour l'instant retardée car en rapport direct avec le brevet en cours de rédaction par la SATT.

La présentation des résultats obtenus au cours de mes 3 années de thèse se fera donc sous la forme de 3 articles (publiés ou soumis à la publication) et d'une revue qui constitue un chapitre de livre.

MATERIELS
ET
METHODES

I. Culture cellulaire

A. Lignées cellulaires prostatiques humaines

Pour la réalisation de ces travaux, 3 lignées cellulaires épithéliales prostatiques provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection) sont utilisées:

- la lignée androgéno-dépendante *LNCaP* (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*). Il s'agit d'une lignée établie à partir d'une biopsie d'un ganglion lymphatique supraclaviculaire métastasé prélevé sur un homme de 50 ans atteint d'un carcinome prostatique. Ces cellules expriment le récepteur aux androgènes et des marqueurs de cellules prostatiques tels que le PSA et la PAP.

J'ai également mis en place des clones de cellules LNCaP transfectés de façon stable par le gène codant les sous-unités $\alpha 1H$ (LNCaP- $\alpha 1H$), $\alpha 2\delta 2$ (LNCaP- $\alpha 2\delta 2$), ainsi qu'un clone surexprimant la sous-unité pore et la sous-unité accessoire (LNCaP- $\alpha 1H$ - $\alpha 2\delta 2$).

- les lignées androgéno-indépendantes *PC-3* et *DUI45*. La première a été établie à partir d'une métastase osseuse et la seconde à partir d'une métastase cérébrale, respectivement chez des patients âgés de 62 et 69 ans atteints d'un cancer prostatique. Les cellules PC-3 expriment le récepteur aux androgènes mais celui-ci n'est pas fonctionnel tandis que les DU-145 ne l'expriment pas et ont la capacité de proliférer dans un milieu dépourvu d'androgènes. Enfin, ces cellules n'expriment pas le PSA.

B. Conditions de culture

Les lignées LNCaP, PC-3 et DU 145 sont cultivées dans le milieu RPMI-1640 (Gibco, Life Technologies, France) supplémenté en L-glutamine (2 mM, Sigma, L'Isle d'Abeau, France) et en sérum de veau foetal décomplémenté (10%, Seromed, Strasbourg) (milieu complet). La culture en routine de ces cellules s'effectue dans des flacons en plastique de 75cm² (Nunc), placés 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 une brève trypsinisation (trypsine-EDTA, 0.25%, ICN, USA) dont l'effet est inhibé par l'ajout de milieu de culture complet. Les cellules sont alors dissociées par une succession d'aspirations/rejets et placées dans de nouveaux supports en fonction de l'expérience envisagée. Ceci correspond à un passage. Le milieu de culture est ensuite renouvelé tous les 2/3 jours. Afin d'éviter la

dérive génétique, les cellules subissent au maximum une quinzaine de passages successifs avant de décongeler une nouvelle ampoule de cellules.

L'induction de la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP (LNCaP-NE) est réalisée par un traitement augmentant le taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) dans la cellule. Ce traitement associe un analogue perméant de l'AMPC, le dibutyryl-AMPC (db-AMPC, 1 mM) et l'isobutylméthylxanthine (IBMX, 100 μ M), un inhibiteur des phosphodiésterases. Cette différenciation cellulaire s'accompagne de l'apparition de prolongements cellulaires neuritiques, de la multiplication des granules de sécrétion à cœur dense, de la surexpression de la NSE mais aussi de la surexpression du canal Ca_v3.2 (Sun et al., 2009) (Mariot et al., 2002).

C. 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 transférées 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'isopropanol permet au milieu cellulaire de se refroidir d'environ 1°C par minute, provoquant un lent refroidissement. La conservation à -80°C est utilisée pour les ampoules de cellules décongelées régulièrement. 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 contenant du milieu complet.

II. Transfection

La transfection est un processus permettant l'introduction d'une molécule d'ADN ou d'ARN dans les cellules. En effet, l'étude d'une protéine d'intérêt peut se faire de deux manières différentes, soit en la surexprimant ou au contraire en réprimant son expression.

Dans le cas d'une surexpression, un plasmide contenant la séquence codante de cette protéine sera alors transféré dans la cellule. Il est estimé que seule une cellule sur 10⁵ ou 10⁶ incorpore l'ADN de façon stable au niveau de ses chromosomes alors que les autres cellules peuvent ou non l'incorporer de façon transitoire.

Dans le cas d'une suppression ou diminution d'expression d'une protéine d'intérêt, le mécanisme d'ARN interférent (siARN) est utilisé. Ces siARN vont cibler les ARN messager d'intérêt afin de les dégrader ou inhiber leur traduction et par conséquent diminuer, voire supprimer l'expression protéique de ces cibles.

A. Lipofection des siARN

Les transfections des siARN par lipofection sont réalisées grâce au HiPerfect (HiPerFect Transfection Reagent, Qiagen). Selon la procédure conseillée par le fournisseur et pour un volume final de 1 mL dans la boîte de pétri : les siARN (50 nM final) (Tableau 1) sont d'abord mélangés au milieu de culture sans sérum (qsp 100 μ l) puis, la solution d'HiPerfect (6 μ l) est ajoutée à cette solution. Ce mélange est ensuite vortexé vigoureusement puis laissé 10 minutes à température ambiante permettant la formation du complexe de transfection. Finalement, le mélange est déposé goutte à goutte sur les cellules baignant dans 900 μ l de milieu complet. Les cellules peuvent ensuite être utilisées quelques jours après la transfection en fonction de la cinétique d'efficacité du siARN. Cette efficacité est vérifiée par RT-PCR, par immunofluorescence ou par western-blot, permettant de mettre en évidence la variation d'expression au niveau ARNm et au niveau protéique du marqueur ciblé.

siARN	Séquences
siCTL (luciférase)	CUUACGCUGAGUACUUCGA
si α 2 δ 2	GACCAACGUUCUGAUCUGC
siCa _v 3.2 1	ACGUGAGCAUGCUGGUAUU
siCa _v 3.2 2	AGAUGGCCGUGGCGUCUAU
siIK	CAAGCACCGGTTCGAAATGT
siBK	GAGTCCTGGTTGTCTTAGT

Tableau 1 : Récapitulatif des séquences des différents siARN

B. Obtention d'une lignée stable

Afin d'obtenir des clones surexprimant de façon stable les sous-unités α_{1H} et $\alpha_{2\delta 2}$, les cellules LNCaP sont lipofectées avec le plasmide (pcDNA3 ou pcDNA4 respectivement) contenant le gène d'intérêt.

Les transfections des plasmides sont réalisées grâce au lipofectant X-HP (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, Roche). Les cellules sont incubées en présence d'un mélange de 150 μ l contenant du milieu de culture sans sérum, le plasmide et le lipofectant X-HP ajoutés dans cet ordre. Pour 1 μ g de plasmide, 2 μ l de lipofectant est ajouté au milieu sans sérum. La

solution ainsi obtenue est vortexée et laissée 10 minutes à température ambiante avant d'être déposée goutte à goutte sur les cellules. Les clones surexprimant $\text{Ca}_v3.2$ (LNCaP- $\text{Ca}_v3.2$) et $\alpha2\delta2$ (LNCaP- $\alpha2\delta2$) ont été réalisés grâce à la transfection de plasmides codant pour ces protéines (PCDNA3- $\text{Ca}_v3.2$ et PCDNA4- $\alpha2\delta2$ respectivement), la sélection des clones ayant intégré stablement ces plasmides a été réalisée grâce à l'antibiotique de sélection approprié (généticine pour PCDNA3- $\text{Ca}_v3.2$ et zéocine pour PCDNA4- $\alpha2\delta2$). Enfin, un clone stable contrôle, LNCaP-Neo, a été réalisé par transfection d'un plasmide vide PCDNA3.

Une semaine après la transfection, les cellules sont incubées avec l'antibiotique de sélection (généticine ou zéocine à 700 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant quelques jours. Seules les cellules ayant incorporé le plasmide continuent à croître et des clones de « cellules positives » vont se former. Ces clones sont par la suite validés par qPCR et par la technique de western-blot comme le montre la figure 25.

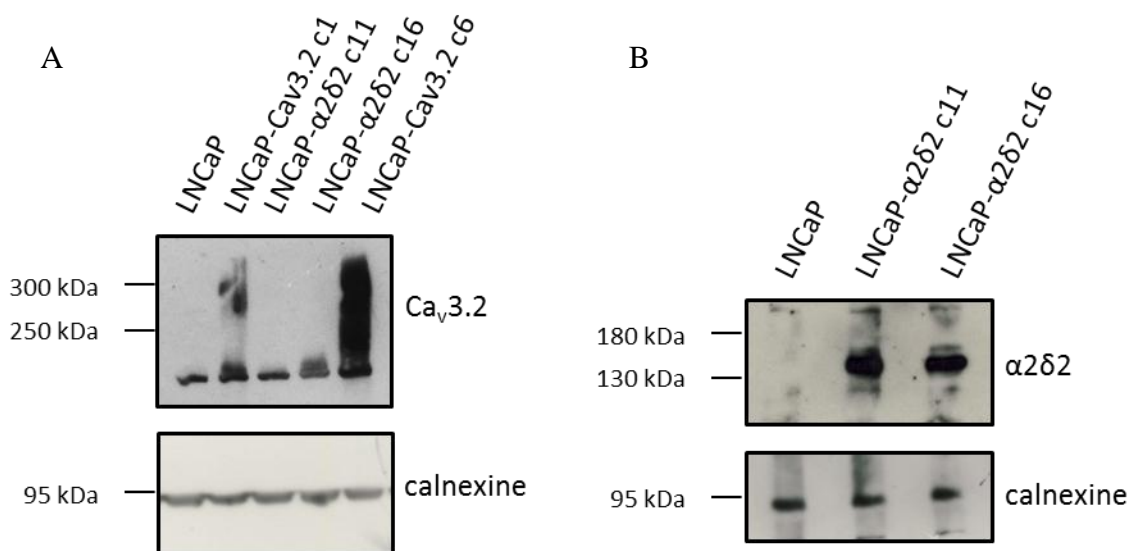


Figure 25 : Validation de l'expression protéique de $\text{Ca}_v3.2$ (A) et d' $\alpha2\delta2$ (B) dans les clones de surexpression. Les clones LNCaP- $\text{Ca}_v3.2$ C1 et C6 ainsi que les clones LNCaP- $\alpha2\delta2$ C11 et C16 ont été sélectionnés afin de réaliser nos expériences.

III. Expérimentation animale

Les modèles animaux sont essentiels pour l'étude des tumeurs cancéreuses car ils conservent certaines caractéristiques physiologiques importantes pour le développement et la croissance tumorale comme la structure tridimensionnelle, les interactions avec d'autres cellules de l'organisme et l'angiogenèse. Ainsi, pour cette étude *in vivo*, nous avons réalisé des xénogreffes tumorales sous-cutanées sur des souris non consanguines swiss *nude* mâles âgées

de 6 semaines (Laboratoire Charles River, France). Sur chaque flanc, 6 millions de cellules sont injectées, les cellules LNCaP ou des cellules LNCaP-Neo d'un côté et le clone LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ de l'autre. Les cellules sont préparées dans un mélange composé de 50% de PBS et 50% de BD-Matrigel®. Pour chaque expérience, nous avons 10 animaux par condition en début de protocole. Les tumeurs sont mesurées selon les 3 axes (Longueur, hauteur, largeur) au pied à coulisse 2 fois par semaine et les volumes tumoraux (mm^3) ont été estimés grâce à la formule suivante : $4/3 \cdot 3.14 \cdot (1/2 \cdot L/2 \cdot h/2)$. L'animal est sacrifié lorsque la tumeur atteint au maximum 10% de son poids. Une fois le sacrifice réalisé, les tumeurs sont récupérées, pesées et divisées pour des études d'immunohistochimie, de western-blot et de RT-PCR. Pour les études d'immunohistochimie, les tumeurs sont immédiatement fixées dans du formaldéhyde 3.7% pendant 24h, puis rincées au PBS et conservées dans ce même tampon jusqu'au paraffinage (voir IV). Pour les études par western-blot, les tumeurs sont rincées dans du PBS, séchées et conservées dans l'azote jusqu'à l'extraction protéique (voir IV). Enfin, pour les RT-PCR, les tumeurs sont incubées pendant 24h dans du RNAlater® afin d'éviter la dégradation des ARNm. Les tumeurs sont ensuite rincées au PBS et placées dans l'azote liquide jusqu'à l'extraction d'ARNm (voir V).

Les protocoles utilisés pour les expérimentations animales ont été effectués en accord avec la réglementation européenne et avec l'agrément du comité d'éthique local (n° protocole CEEA 202012).

IV. Mesure de la viabilité cellulaire et de la prolifération

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 de 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. Pour des cellules cultivées dans une plaque de 96 puits, il convient d'ajouter 40 μl du réactif préparé (4,75 ml de MTS à 2 mg/ml et 250 μl de PMS à 0,92 mg/ml) dans 200 μl de milieu par puits.

La réaction s'effectue à l'obscurité dans l'étuve et l'absorbance est mesurée toute les 30 min par un lecteur de plaque (Dinex Technologie MR*422, Thermolabsystems, France).

Lorsque l'apoptose et l'activité métabolique sont stables entre les différentes conditions, ce kit permet d'estimer la prolifération cellulaire.

B. Cycle cellulaire

Il est également possible de mesurer la prolifération ou l'apoptose en étudiant la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire.

La cytométrie de flux permet de mesurer différents paramètres cellulaires tels que la taille, la granulosité suite au passage des cellules devant un faisceau laser. L'étude du cycle cellulaire est possible grâce à l'incorporation de fluorochromes au niveau de l'ADN.

Les cellules sont cultivées dans des boîtes 60 mm, à raison de trois boîtes par condition, trypsinisées puis centrifugées 5 min à 1000xg. Elles sont ensuite rincées trois fois au PBS. Afin de fixer les cellules, la suspension cellulaire reprise dans du PBS est mise goutte à goutte dans 5 ml d'éthanol à 70% glacé puis incubé à -20°C pendant 2h minimum. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont incubées en présence de 25 µg/ml d'iodure de propidium (IP, fluorochrome qui s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN) et de 2 µg/ml de RNase. La distribution des cellules dans le cycle cellulaire (entre les différentes phases, sub-G1 correspondant à l'apoptose, G0/G1, S et G2/M) est mesurée à 520 nm après excitation à 488 nm par un cytomètre de flux couplé à un logiciel d'acquisition.

C. Mesure de l'activité NFAT

Les cellulesensemencées dans une boîte de diamètre 60 mm sont transfectées pendant 24h avec le plasmide NFAT-luciférase, ou luciférase seule (1 µg de plasmide par boîte avec les cellules à 70-80% de confluence). Les cellules sont ensuite rincées au PBS. A l'aide du kit Luciferase Assay System (Promega), les cellules sont lysées, les protéines extraites puis l'activité NFAT-luciférase est mesurée selon les instructions du fournisseur. L'activité NFAT est mesurée sur un luminomètre via la mesure de l'activité luciférase. L'activité NFAT est rapportée à la mesure MTS/PMS qui quantifie le nombre de cellules viables.

V. Mesure de la sécrétion

A. Sécrétion de VEGF

Pour déterminer si l'une de nos conditions de culture des cellules entraînait une modulation de la sécrétion du facteur de croissance VEGF, nous avons utilisé la technique de dosage par ELISA (Figure 26). Nous avons pour cela employé un kit ELISA (VEGF Human ELISA Kit, Abcam) de type sandwich : un anticorps de « capture » dirigé contre notre protéine d'intérêt est fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits, il suffit alors d'appliquer 100 μ l de surnageant de nos conditions de culture (le surnageant ayant été centrifugé au préalable pendant 5 min à 200xg) dans ces puits et de laisser incubé 3 heures à température ambiante. 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 (l'anticorps anti-VEGF est 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. Après une heure d'incubation et une étape de rinçage, les puits sont incubés pendant 45 min avec une solution contenant un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps de détection. Cet anticorps est conjugué à un complexe streptavidine/péroxydase (HRP, pour Horseradish Peroxydase). Après un dernier rinçage, le substrat chromogène est ajouté aux puits. Ce substrat qui est oxydé par la peroxydase forme un produit coloré bleu. La réaction est bloquée, une fois la coloration optimale atteinte (30 minutes environ), avec une solution d'arrêt qui fait virer la coloration au jaune. On mesure ainsi l'absorbance à 450 nm qui est directement proportionnelle à la quantité de VEGF présent dans nos surnageants.

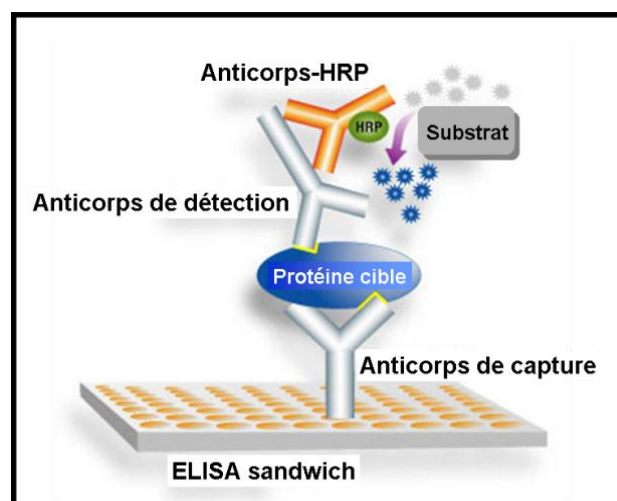


Figure 26 : Schéma d'un test ELISA de type sandwich

B. Sécrétion de phosphatase acide prostatique

Pour le dosage de la PAP (*Phosphatase Acide Prostatique*), sécrétée par les cellules épithéliales prostatiques, j'ai utilisé une méthode basée sur la transformation du pNPP (4-*para-nitrophénylphosphate*) en para-nitrophénol par les phosphatases à pH acide (tampon citrate pH=4,8). La réaction est réalisée dans le tampon citrate pour mesurer l'activité totale des phosphatases acides et dans un tampon tartrate qui inhibe spécifiquement l'activité prostatique, permettant ainsi de la différencier des autres activités phosphatases acides. L'ajout de la soude permet d'arrêter cette réaction et la formation de para-nitrophénolate dont le dosage colorimétrique à 405 nm est proportionnel à la quantité d'enzyme sécrétée (Unité Sigma/ml).

L'activité phosphatase acide prostatique spécifique correspond donc à la différence entre l'activité totale obtenue en tampon citrate moins celle obtenue en tampon tartrate. Ces expériences sont réalisées en plaques 24 puits à raison de 6 puits par condition après 24 ou 48h de culture.

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

A. Extraction des ARNm

L'extraction des acides ribonucléiques (ARN) est effectuée à l'aide du réactif Trizol®, qui est une solution de phénol et de guanidium isothiocyanate, basée sur la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi en 1987 (Chomczynski and Sacchi, 1987). Dans un premier temps, les cellules sont lysées dans ce réactif, puis par addition de chloroforme, les ARN totaux sont séparés des autres constituants cellulaires (lipides, protéines et ADN). Ensuite, ces ARN sont précipités grâce à l'ajout d'isopropanol puis lavés par de l'éthanol 75% pendant 30 min. Après l'élimination de l'éthanol à l'air libre, les ARN sont repris dans de l'eau. La concentration et la qualité des ARN sont déterminées par dosage au spectrophotomètre. Les acides nucléiques étant détectés à 260 nm et les protéines à 280 nm, la qualité de l'extraction est jugée satisfaisante si le rapport $260/280 \geq 1,8$. La qualité des ARN extraits est contrôlée sur gel d'agarose de 1%.

B. Traitement à la Désoxyribonucléase 1 (DNase I) et rétro-transcription

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 Mg²⁺), MgCl₂ (2,5 mM), dNTP (2,5 mM/dNTP), MULV (ADN polymérase ARN dépendante, 50 unités/μl) et RNase inhibiteur (20 unités/μl). La reverse transcription est réalisée pendant 10 minutes à température ambiante (hybridation) puis les tubes sont incubés à 42°C pendant 30 minutes (élongation). Les ADN complémentaires (ADNc) sont ensuite incubés à 70°C pendant 10 minutes afin de stopper la réaction, puis placés dans la glace pendant au moins 5 minutes et conservés à -20°C pour les études ultérieures par PCR.

Protéine	Gène	Séquence 5'-3'	Séquence 3'-5'	taille (pb)	Numéro d'accion
Ca _v 3.2	CACNA1H	GTGCTCTTCAACCTGCTGGT	AGGCTTCTGGTCTCCCAGT	349	AF 051946
α2δ1	CACNA2D1	TGCAAGAAGACCTTGTCACA	ACACAATTGTTGAGCCCTCA	400	GI 179761
α2δ2	CACNA2D2	GATGCGGAGCTAGAGGATGA	GCTGTACGTGTTGAGATGCT	505	BC 152438
α2δ3	CACNA2D3	CCATGGAGGTGAAGAAGACA	TTGTCACCAGCTTTCAGGAA	500 439	NM_018398
γ1	CACNG1	TGGAGCACCACAACACTACC	TGTCCTCACTGTCAATCATGC	396	NM_000727
γ2	CACNG2	TCTACTCCAGAGGGGTTTGC	TTTTTGGAGTCGCTCTTGG	412	NM_006078
γ3	CACNG3	ACCACTGTAGGAGCCTTTGC	TATGATGCCAATGATGTTGC	426	NM_006539
γ4	CACNG4	CGACCTCACCCACTCTGG	GCCACAATGAAAGACAGAGC	408	NM_014405
γ5	CACNG5	CACCGACTACTGGCTGTACC	CCGTTAAAAGGAAGGAGATGG	482	AF361351
γ6	CACNG6	GGGTGGAGCTCAACACCTAC	GCCCAGGGACCAGGAGTA	481 307 232	AF361352
γ7	CACNG7	CGGTCAGCACTGACTACTGG	ATGACCTCGTCGTTGATGC	403	NM_031896
γ8	CACNG8	ATGACCATCGCCATCAGC	CGCCAGAATGATGTTCC	386	AF361354
IK	KCa3.1	TCCAGCAGCCATCAGCAAGCCA	GCTGGAGTTTAAACAAGGCAGA	578	NM_002250
BK	KCa1.1	CAGACACTGACTGGCAGAGT	TGACGTCATCCCGTCCCTTGCA	794	NM_001014797.1
β-actine		CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGAT	220	NM_001101
GAPDH		TTCACCACCATGGAGAAGGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	234	NM_002046.3

Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées pour les études par RT-PCR de l'expression des différents gènes d'intérêt. La taille attendue de l'amplicon est indiquée en paires de bases (bp). Pour certaines paires d'amorces, plusieurs tailles peuvent être obtenues correspondant à l'amplification d'isoformes différentes.

C. Polymerase Chain Reaction (PCR) classique

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) (Tableau 2), des dNTPs (2.5 mM/dNTP), 2.5 μl de tampon de réaction 10X (concentration finale 1X : (NH₄)₂SO₄ 16 mM ; Tris-HCl 50 mM), MgCl₂ 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 le thermocycleur (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 sec à 95°C)-hybridation (30 sec à 55°C-60°C)-élongation (1 min/1kb à 72°C). Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium (0.5 µg/ml). Après cette analyse électrophorétique, les produits de PCR sont visualisés sous UV (254-310nm) et photographiés.

D. La PCR en temps réel (qPCR)

A la différence de la PCR classique, la PCR en temps réelle est quantitative. On parle de la quantification relative, car on rapporte l'expression du gène cible à l'expression d'un gène de référence (hPRT ou 18S). Cette PCR fait intervenir un fluorophore, le SYBR® Green I, qui s'intègre dans les doubles brins d'ADN, et permet de quantifier les produits PCR après chaque cycle. Ainsi, à la fin de la phase d'élongation, on pourra visualiser en temps réel l'augmentation exponentielle de la quantité d'amplicons générés. Pour chaque courbe, il est alors déterminé une valeur Cp (Crossing point) qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau de fluorescence situé hors du bruit de fond et dans la phase exponentielle de la cinétique de PCR (Figure 27). Par analyse informatique, nous déterminons la valeur de ces Cp pour chaque échantillon, ce qui nous permet de les comparer entre eux.

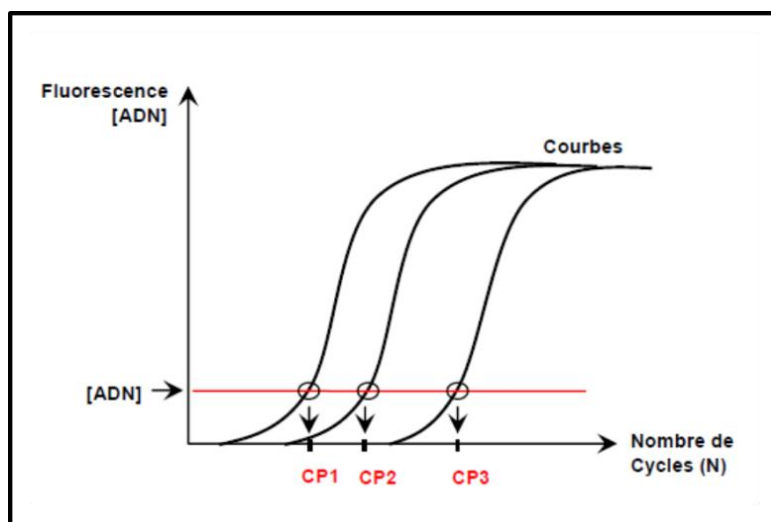


Figure 27 : Principe de quantification par PCR quantitative

Avant toute expérience de qPCR, l'efficacité des amorces, comprise entre 95 % et 110 %, est testée sur une gamme de dilution d'ADNc. La réaction de PCR est ensuite réalisée dans un

volume de 15 µl comprenant 7,5 µl de SYBR® 2X, 0,45µl de chaque amorces des gènes cibles (10 µM ; concentration finale 300 nM) (tableau 3), 1,6 µl d'eau et 5 µl d'ADNc dilué 1/10° (soit 25 à 50 ng par puits). Ce mélange est déposé dans les puits d'une plaque 96 puits adaptée au thermocycleur (Biorad CFX 96) afin de suivre le protocole d'amplification suivant : 95°C pendant 30 secondes (dénaturation), 95°C pendant 5 secondes, 60°C pendant 15 secondes, ces deux dernières phases se réalisent pendant 40 cycles et correspondent à l'hybridation et amplification. La réaction est terminée par une rampe allant de 65°C à 95°C afin d'obtenir une courbe de fusion des amplicons et vérifier ainsi la présence d'un unique amplicon. La quantification est réalisée avec le logiciel BioRad Manager, les résultats sont alors exprimés en ratio de concentration gène cible/gène de référence.

Protéine	Séquence 5'-3'	Séquence 3'-5'	taille (pb)
Ca _v 3.2	ACACGGACGA GGACAAGACG	GGGAACACATCTTCAGCTCT	90
α2δ2	ATGCGGAGCTAGAGGATGAG	GTCATCCTCTAGCTCCGCAT	91
VEGF	GAATCATCACGAAGTGGTGAA	TGGTGATGTTGGACTCCTCA	186
PSA	GACCACCTGCTACGCCTCA	AACTTGCGCACACACGTCATTGGAA	90
Rc A	GGTGAGCAGAGTGCCCTATC	GGCAGTCTCCAAACGCATGTC	85
NSE	AGCTGCCCTGCCTTAC	GAGACAAACAGCGTTACTTAG	201
CgA	GCGGTGGAAGAGCCATCAT	TCTGTGGCTTCACCACTTTTCTC	60
18s	CAGCTTCCGGGAAACCAAAGTC	GAGTGGAGCCTGCGGCTTAATT	90

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour les études par qPCR de l'expression des différents gènes d'intérêt

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 concentration du gel de polyacrylamide est déterminée selon la taille des protéines à séparer. La migration électrophorétique s'effectue à 15-30 mA/minigel à un voltage 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 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% (15 mM 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 à la dilution voulue dans du TNT-lait 1.5% (Tableau 4) pendant la nuit à 4°C. Après 3 lavages au TNT, les membranes sont incubées en présence de l'anticorps secondaire dilué au 1/50.000^{ème} (anti-IgG de lapin ou de souris, laboratoire Zymed Inc, San Francisco CA) pendant 1 heure à température ambiante. 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 membranes sont finalement exposées sur des films Biomax Light (Kodak, Rochester, NY). La quantification relative est réalisée par densitométrie : la valeur de l'intensité de la protéine d'intérêt est divisée par la valeur de l'intensité d'un rapporteur : la β -actine ou la calnexine.

C. Immunohistochimie

Au cours de cette thèse, nous avons étudié l'expression de plusieurs protéines sur des coupes de tissus prostatiques humains et au niveau des lignées cellulaires cancéreuses.

Les tissus fixés dans le formaldéhyde 3.7 % sont ensuite inclus en paraffine après avoir subi plusieurs bains successifs d'alcool (1h dans l'éthanol 30%, 1h dans l'éthanol 70%, ½ journée dans l'éthanol 96%, 1 nuit dans l'éthanol 100%, puis 2h à nouveau dans l'éthanol 100% et butanol pour la nuit) afin de déshydrater le tissu. Le tissu est ensuite baigné dans 4 bains de paraffine successifs d'1h chacun, puis inclus sous forme de bloc. Grâce au microtome, des coupes de tissu de 5 μ m d'épaisseur sont réalisées et déposées sur lame. Puis, ces lames subissent un déparaffinage : 3 bains successifs de 10 minutes dans un solvant (ClàRal) suivis de bains d'alcool de titres décroissants, Ethanol 100%, 96%, 70% et 30%, de 10 minutes chacun (un bain de méthanol contenant 0,3% H₂O₂ peut être ajouté pour supprimer l'activité

peroxydase endogène si nécessaire). Ces coupes 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 au micro-onde (4x4 min et 1x5min). Une fois refroidies, les lames de tissus sont rincées dans le PBS et soumises au même protocole que les lamelles de cellules.

Anticorps primaire	Société	Dilution	Espèce	Poids moléculaire (kDa)
Bactine	Sigma	1/4000 (WB)	souris	43
Calnexine	Sigma	1/2000 (WB)	souris	95
BK	Alomone	1/500 (WB) 1/50 (IF)	lapin	110
Ca _v 3.2	Santa cruz	1/200 (WB) 1/50 (IH)	lapin	~250
α2δ2	Santa cruz	1/200 (WB) 1/50 (IH)	lapin	170
α2δ2	Abnova	1/50 (IF)	souris	130
β4	Abcam	1/200 (WB) 1/50 (IF) (IH)	souris	58
γ4	Abcam	1/200 (WB) 1/50 (IF) (IH)	lapin	36
NSE	Dako	1/250 (WB) 1/100 (IF)	souris	45
CgA	Dako	1/200 (WB)	souris	48
Ki67	Abcam	1/100 (IF)	lapin	/
VEGF	Abcam	1/200 (WB) 1/50 (IH)	lapin	53
CD31	Abcam	1/200 (WB) 1/50 (IH)	lapin	130
PCNA	Santa cruz	1/200 (WB)	lapin	36
PAP	Sigma	1/200 (WB)	lapin	50
PSA	Santa cruz	1/200 (WB)	souris	33
RA	Santa cruz	1/500 (WB)	lapin	110

Tableau 4: Liste des anticorps primaires utilisés pour réaliser les études d'expression protéique

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 avec cellules ou tissus sont délimitées avec un stylo hydrophobe, incubées dans une solution de saturation contenant de la BSA (0.2%), du triton X-100 (0.1%) et du sérum d'âne (2-5%) pendant 30 minutes à température ambiante. S'ensuit une incubation d'une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire d'intérêt. Les cellules et tissus sont ensuite rincés 3 fois avec la solution de saturation, puis incubés pendant 1 h à température ambiante à l'obscurité si nécessaire (en cas d'anticorps fluorescents) avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 Alexa 546 dilué au 1/2000^{ème} pour l'immunofluorescence, ou avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué au 1/200^{ème} (anti-IgG de lapin ou de souris, laboratoire Zymed Inc, San Francisco CA).

Pour l'immunofluorescence, les cellules et les tissus sont rincés une première fois avec du PBS puis incubés avec du DAPI pendant 10 min à température ambiante et à l'obscurité (dilué dans du PBS à 50 ng/ml) afin de marquer le noyau. Les échantillons sont à nouveau rincés deux fois dans le PBS et les lamelles sont montées dans du Mowiol. Elles sont finalement observées en microscopie à épifluorescence (AxioImager, Zeiss) et les images sont obtenues en microscopie confocale.

Pour l'immunohistochimie par révélation enzymatique, les tissus sont rincés 3 fois avec du PBS. La révélation est réalisée grâce au DAB (3.3 Diaminobenzidine 4HCl, sigma France) préalablement dilué dans le PBS avec 30% d'H₂O₂, jusqu'à visualisation du signal (de 5 à 30 min). Pour arrêter la réaction, la lame est lavée dans un bain de PBS. La coloration de fond du tissu se fait par un bain de bleu azur dilué au 1/30.000^e pendant 8 min. Les lames sont montées à l'aide du milieu de montage aqueux (MM France) puis observées grâce au microscope à lumière transmise (Leica DMIRE 2).

VIII. Imagerie de fluorescence quantitative du calcium cytoplasmique libre

L'imagerie calcique par fluorescence permet de mesurer simultanément des variations de la concentration en calcium intracellulaire de plusieurs cellules dans un champ déterminé. Cette technique repose sur l'utilisation de sondes calciques fluorescentes.

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 se lie au calcium 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, le spectre d'excitation présente un pic pour une longueur d'onde de 380 nm alors que lorsqu'elle est liée au calcium, le pic du spectre d'excitation est obtenu à 340 nm. La longueur d'onde d'émission de fluorescence est de 510 nm dans les deux cas. C'est donc le rapport des intensités de fluorescence émises après excitation à 340 et 380 nm (F340/F380) qui permet d'estimer les variations de calcium intracellulaire. Ainsi, l'augmentation de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules se traduit par une diminution de fluorescence lors d'une excitation à 380 nm alors que la fluorescence augmente suite à l'excitation à 340 nm.

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 xénon (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).

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 cheminent *via* une fibre optique et traversent les miroirs dichroïques : les signaux à 380 et 340 nm provenant du monochromateur sont orientés spécifiquement vers la préparation cellulaire, tandis que le signal de fluorescence à 510 nm, provenant de la préparation cellulaire, est orienté spécifiquement vers la caméra digitale. 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). La fréquence d'acquisition moyenne utilisée est d'une image toutes les 5 secondes.

C. 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.

D. Charge des cellules en Fura-2

Les cellules sont chargées pendant 45 minutes, à température ambiante 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 ou du ratio F340/F380 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 (en courant imposé) ou les courants ioniques transmembranaires (voltage 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 résistances comprises entre 3 et 5 MΩ et de diamètre interne de 1 µm, 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 (Figure 28) :

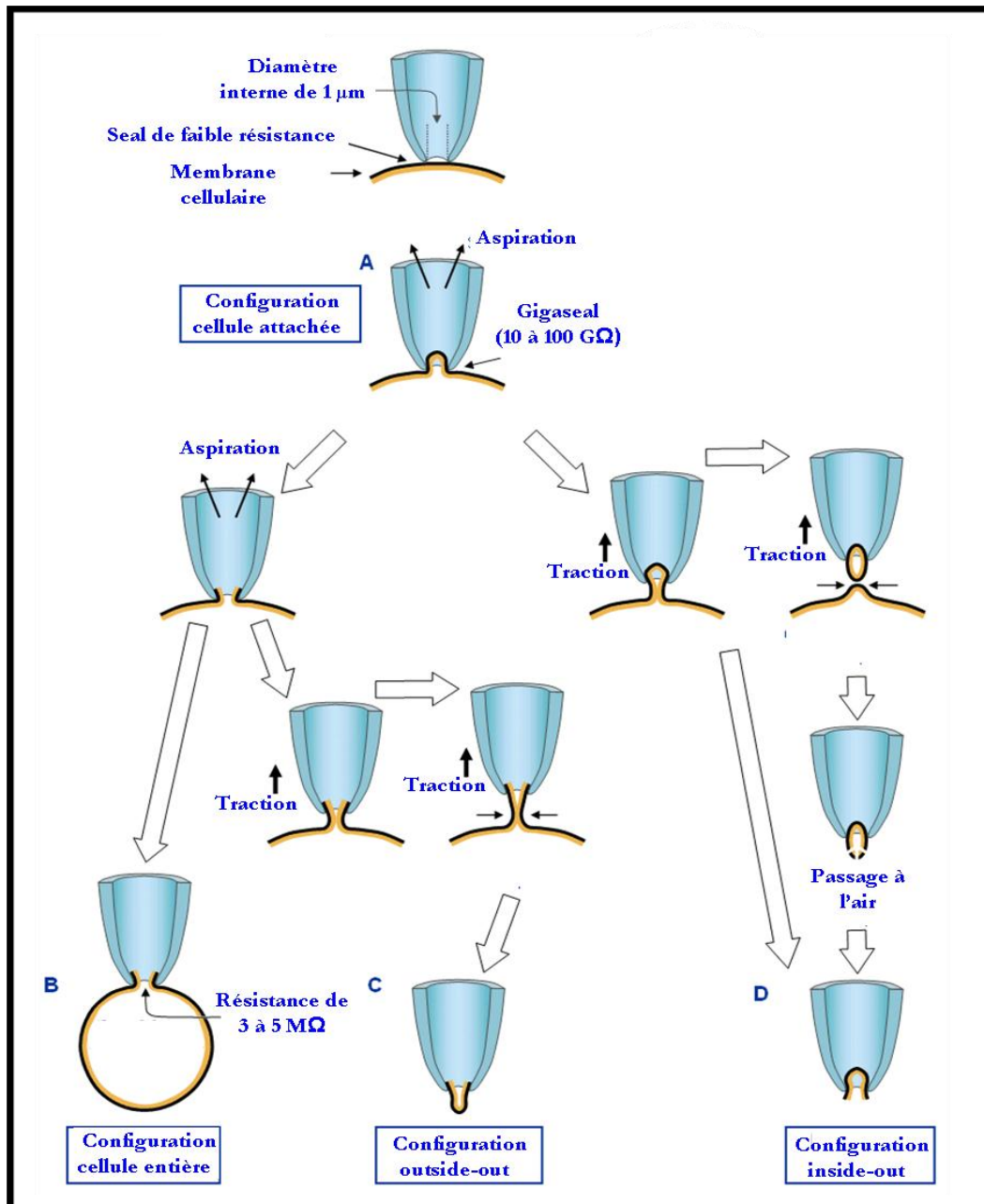


Figure 28 : Les différentes configurations de la technique électrophysiologique de patch-clamp (d'après Hamill et al., 1981)

- Dans la configuration « **cellule-attachée** », on réalise une faible aspiration après avoir posé la pipette sur la membrane plasmique de la cellule afin de réaliser une jonction pipette-membrane de haute-résistance appelée « gigaseal » ($10\ \text{à}\ 100\ \text{G}\Omega$) qui augmente le rapport signal/bruit. Ceci permet d'enregistrer l'activité électrique d'un canal ionique présent dans le fragment de membrane délimité par les bords de la pipette.
- Dans les configurations de « patch-excisé », on arrache un fragment de membrane avec la pipette ce qui permet l'enregistrement d'un petit nombre de canaux ioniques. Selon le mode

opérateur 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 diffusent dans le milieu intrapipette entraînant ainsi une perturbation de la régulation du canal étudié. Les configurations « cellule-attachée » et « patch-excisé » permettent de mesurer des activités de canaux unitaires alors que la configuration cellule-entière s'intéresse à des courants globaux résultant de l'activité d'un grand nombre de canaux ioniques.

Les études électrophysiologiques présentées dans cette thèse ont été réalisées par les Dr. Pascal Mariot et Florian Gackière. Ces études fonctionnelles ont été réalisées par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière (« Whole-cell »), cellule-attachée ou en configuration outside-out selon l'étude. Les milieux d'enregistrement sont détaillés dans chaque article. L'osmolarité et le pH sont ajustés respectivement à 290 mOsm.l⁻¹ et à 7,2.

RESULTATS

Article 1

"Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth"

Florian Gackière*, Marine Warnier*, Maria Katsogiannou, Sandra Derouiche, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Christian Slomianny, Sandrine Humez, Natalia Prevarskaya, Morad Roudbaraki and Pascal Mariot

Biology Open 2013 2:941-951; Advance Online Article August 2, 2013, doi:10.1242/bio.20135215

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

De nombreuses études ont montré l'implication des canaux potassiques dans le développement tumoral (Oeggerli et al., 2012) (Lansu and Gentile, 2013). Il a été montré que les cellules androgéno-dépendantes cancéreuses prostatiques LNCaP expriment des canaux potassiques, dont l'inhibition par le tétraéthylammonium (TEA) réduit la croissance cellulaire (Skryma et al., 1997). Cependant, la nature moléculaire de ces canaux et les mécanismes à travers lesquels ils régulent la croissance cellulaire restent inconnus à l'heure actuelle. Une récente étude menée au laboratoire montre que le canal potassique à conductance intermédiaire, IK, est fonctionnel et régule la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Lallet-Daher et al., 2009).

Plusieurs études ont montré que les canaux potassiques pouvaient interagir avec les canaux calciques (Berkefeld et al., 2010). **Ainsi, le but de cette étude était d'identifier les canaux potassiques exprimés dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP et de mettre en évidence l'existence d'un couplage potentiel avec les canaux calciques Ca_v3.2.**

Par ce travail, nous montrons que le courant potassique observé dans les cellules LNCaP est dû au canal BK à grande conductance calcium et voltage dépendant. De plus, nous avons mis en évidence un couplage entre le canal BK et le canal calcique voltage-dépendant, Ca_v3.2. Ainsi, l'activation du canal BK est décalée vers les potentiels négatifs en présence du canal calcique Ca_v3.2. Nous montrons par des études d'immunohistochimie et d'immunoprécipitation que ces deux canaux sont colocalisés et associés, suggérant leur

appartenance à un même complexe protéique. Enfin, nous démontrons que l'inhibition de ces deux canaux *via* l'utilisation de siARN ou d'agents pharmacologiques diminue dans la croissance des cellules LNCaP.

Ces travaux ont donc permis de mettre en évidence le couplage fonctionnel entre un canal potassique BK et un canal calcique voltage-dépendant $Ca_v3.2$ dans les cellules cancéreuses prostatiques, LNCaP . De plus, ce travail montre l'implication des canaux $Ca_v3.2$ et confirme celle des canaux BK, déjà montrée dans les cellules androgéno-indépendantes PC3 (Bloch et al., 2007), dans la prolifération des cellules LNCaP.

Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth

Florian Gackière*, Marine Warnier*, Maria Katsogiannou, Sandra Derouiche, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Christian Slomianny, Sandrine Humez, Natalia Prevarskaya, Morad Roudbaraki and Pascal Mariot[‡]

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

*These authors contributed equally to this work

[‡]Author for correspondence (Pascal.Mariot@univ-lille1.fr)

Biology Open 000, 1–11
doi: 10.1242/bio.20135215
Received 22nd April 2013
Accepted 26th June 2013

Summary

It is strongly suspected that potassium (K^+) channels are involved in various aspects of prostate cancer development, such as cell growth. However, the molecular nature of those K^+ channels implicated in prostate cancer cell proliferation and the mechanisms through which they control proliferation are still unknown. This study uses pharmacological, biophysical and molecular approaches to show that the main voltage-dependent K^+ current in prostate cancer LNCaP cells is carried by large-conductance BK channels. Indeed, most of the voltage-dependent current was inhibited by inhibitors of BK channels (paxillin and iberiotoxin) and by siRNA targeting BK channels. In addition, we reveal that BK channels constitute the main K^+ channel family involved in setting the resting membrane potential in LNCaP cells at around -40 mV. This consequently promotes a constitutive calcium entry through T-type Cav3.2 calcium channels. We demonstrate, using

single-channel recording, confocal imaging and co-immunoprecipitation approaches, that both channels form macromolecular complexes. Finally, using flow cytometry cell cycle measurements, cell survival assays and Ki67 immunofluorescent staining, we show that both BK and Cav3.2 channels participate in the proliferation of prostate cancer cells.

© 2013. Published by The Company of Biologists Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Key words: BK channels, KCa1.1, Cav3.2, CACNA1H, T-type calcium channels, Proliferation, Prostate, Cancer cell growth

1 Introduction

Ion channels have been shown to be implicated in several aspects of cancer development in various organs including the prostate (Fiske et al., 2006; Kunzelmann, 2005). These include sodium channels in cell invasion and migration (Bennett et al., 2004), voltage-dependent calcium (Ca^{2+}) channels in neuroendocrine differentiation (Mariot et al., 2002), non voltage-dependent TRP and ORAI Ca^{2+} channels in migration or proliferation (for a review, see Prevarskaya et al., 2011) or potassium (K^+) channels in cell proliferation (Skryma et al., 1999; Spitzner et al., 2007). The largest family of membrane ion channels, namely K^+ channels, has been shown to be involved in cell proliferation. Some of these are Ca^{2+} -dependent K^+ channels (Lallet-Daher et al., 2009), others are KATP channels (Huang et al., 2009), KNCQ channels (Morokuma et al., 2008), or EAG channels (Pardo et al., 1999). Indeed, EAG channels have been proposed as tumoral markers (Farias et al., 2004) and clinical targets (Pardo and Sühmer, 2008). In androgen-sensitive prostate cancer LNCaP cells, it has been shown that blocking K^+ channel activity with inhibitors such as tetraethyl ammonium (TEA) reduced cell

growth (Skryma et al., 1997). However, the mechanisms through which K^+ channels regulate cell growth have scarcely been described. Several hypotheses have been put forward, involving either decreases in cytosolic K^+ concentration, membrane hyperpolarization, cytosolic Ca^{2+} increases, or pH variations (Lang et al., 2005; Spitzner et al., 2007). Regarding prostate cancer LNCaP cells, recent studies conducted in our laboratory have demonstrated that intermediate IK potassium channels (also called IKCa1, IK1 or KCa3.1) are functional and regulate cell proliferation (Lallet-Daher et al., 2009). In addition, it has been shown by others that Ca^{2+} - and voltage-dependent BK potassium channels (also called BK_{Ca} or KCa1.1) are responsible for large K^+ currents in LNCaP cells (Yan and Aldrich, 2010).

In the present study, we wished to assess the mechanisms through which voltage-dependent K^+ channels could regulate LNCaP cell growth. Since voltage-dependent Ca^{2+} channels have also been shown to be expressed in LNCaP cells, we hypothesized that both voltage-dependent K^+ and Ca^{2+} channels in close association, could co-regulate cell proliferation. Our experiments using pharmacological and molecular evidences, confirm previous

works (Yan and Aldrich, 2010), namely that most of the voltage-dependent K^+ current in LNCaP cells is carried by BK channels. We show that BK channels in LNCaP cells may open at resting membrane potential, even in conditions of low cytosolic Ca^{2+} concentrations. However, they are still sensitive to Ca^{2+} , since their open probability may be increased by raising cytosolic Ca^{2+} either with an intracellular perfusion of high concentrations of Ca^{2+} , or by activating Ca^{2+} entry. We show that membrane depolarizations increased BK channel activity in LNCaP cells expressing Cav3.2 T-type Ca^{2+} channels. Furthermore, a transient Ca^{2+} entry through Cav3.2 channels is able to induce a persistent BK channel activation. We demonstrate using single-channel recording, confocal imaging and co-immunoprecipitation approaches, that T-type channels and BK channels are located in the same patches of membranes, probably forming functional complexes. Finally, using specific inhibitors and siRNA, we show that BK and Cav3.2 channels set the resting membrane potential in prostate cancer cells and thereby participate in cell proliferation. These results highlight that there is a functional coupling in LNCaP cells between BK channels and Cav3.2 channels and that this coupling may participate in prostate cancer cell growth.

Results

LNCaP cells display large voltage-dependent K^+ currents, which are activated at around -10 mV when Ca^{2+} is buffered with 1–10 mM EGTA in the patch-pipette (Fig. 1). As shown in Fig. 1, TEA (10 mM) almost totally inhibited voltage-dependent K^+ currents ($n=20$). The activity of known BK channel inhibitors (paxillin, iberiotoxin (Ghatta et al., 2006; Sanchez and McManus, 1996)), IK channel inhibitors (TRAM-34, clotrimazole) and SK channel inhibitors (apamin, d-tubocurarine) was thus assessed on

these currents. Paxillin totally inhibited voltage-dependent K^+ currents (Pax, 1 μ M, $n=19$), whereas iberiotoxin only reduced them (Iberio, 1 μ M, $n=10$). In contrast, neither TRAM-34 (TRAM, 1–10 μ M, $n=25$), clotrimazole (Clo, 1–10 μ M, $n=25$), d-tubocurarine (dTC, 100 μ M, $n=8$) nor apamin (Apa, 500 nM, $n=8$) reduced voltage-dependent K^+ currents. In addition, whole-cell voltage-dependent K^+ currents were strongly inhibited by siRNA targeted against BK channels (si-hBK), but not by siRNA against IK channels (si-hIK1) (Fig. 1C). Si-RNA targeted against BK or IK channels were validated by RT-PCR as shown in Fig. 1 (G and H, respectively).

Single-channel experiments carried out in the outside-out patch-clamp configuration allowed us to measure the single channel activity (Fig. 2) corresponding to this voltage-dependent K^+ current. In symmetrical K^+ condition (150 mM K^+ on each side of the patch), channel activity displayed a linear current-voltage ($i-v$) relationship with a reversal potential of 0 mV and an average conductance of 186 ± 2.7 pS (Fig. 2A). In asymmetrical K^+ condition (5 mM K^+ on the outer side of the patch vs 150 mM on the inner side of the patch), the $i-v$ relationship was no longer linear and displayed a slight outward rectification. The average conductance, which was measured in the linear part of the $i-v$ curve (between -10 mV and 60 mV), was 155 ± 3.9 pS in LNCaP cells ($n=15$) and 146 ± 4.7 pS ($n=5$) in LNCaP cells treated with si-Ctl (Fig. 2B). The reversal potential shifted to values close to -80 mV, thus confirming that these are indeed K^+ channels. Such properties, including a large conductance, are characteristic features of BK channels. Whereas a treatment with si-Ctl did not significantly change the percentage of cell patches displaying a BK channel activity (5 out of 19 for si-Ctl cells vs 9 out of 17 for Ctl cells, non

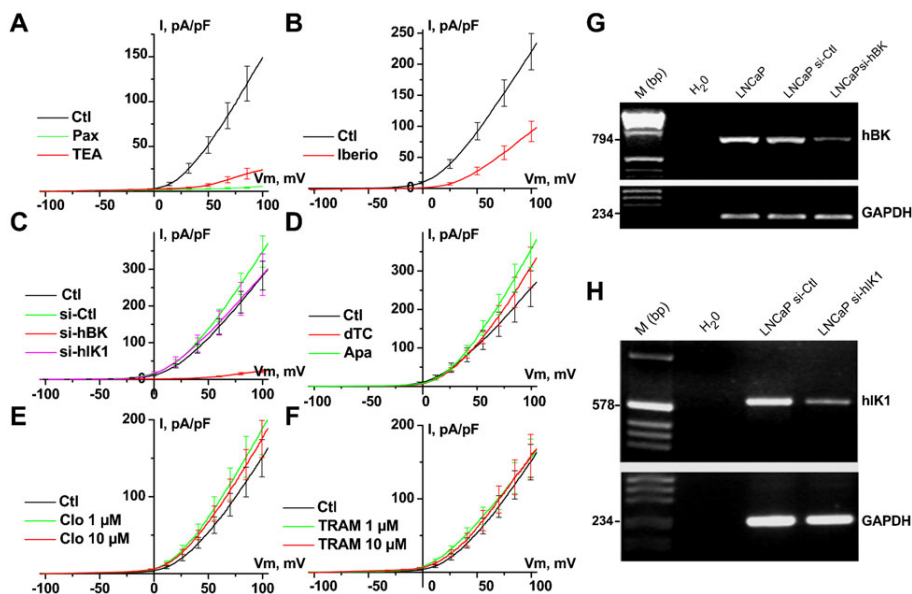


Fig. 1. Blocking BK channels inhibits voltage-dependent K^+ current in LNCaP-CTL cells. (A–F) Current–voltage ($i-v$) relationships in the presence of different K^+ channel inhibitors. Concentrations used were: 4 mM TEA, 1 μ M paxillin (Pax), 1 μ M iberiotoxin (Iberio), 500 nM apamin (Apa), 100 μ M d-tubocurarine (dTC), 1 or 10 μ M clotrimazole (Clo), 1 or 10 μ M TRAM-34 (TRAM). Treatments with different siRNAs (si-hBK, si-Ctl, si-hIK1, 20 nM) were carried out for 3–4 days. (G) RT-PCR showing a decrease in the expression of the BK channel amplicon following 3 days of treatment with si-hBK (20 nM). Lanes correspond to: H₂O = negative control, LNCaP = sample from LNCaP-CTL cells, LNCaP si-Ctl = sample from LNCaP-CTL cells treated with 20 nM si-Ctl, LNCaP si-hBK = sample from LNCaP-CTL treated with 20 nM si-hBK. Expression of hBK was compared to that of GAPDH. (H) RT-PCR showing a decrease in the expression of the hIK1 channel amplicon following 3 days of treatment with si-hIK1 (20 nM). Lanes correspond to: H₂O = negative control, LNCaP si-Ctl = sample from LNCaP-CTL cells treated with 20 nM si-Ctl, LNCaP si-hIK1 = sample from LNCaP-CTL treated with 20 nM si-hIK1. Expression of hIK1 was compared to that of GAPDH.

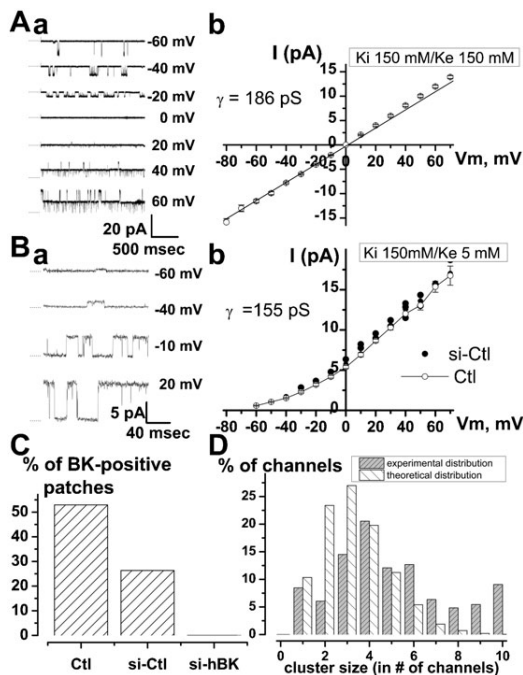


Fig. 2. Single-channel characterization of voltage-dependent K^+ channels in LNCaP-CTL cells. (A) (a) Outside-out patch-clamp recording of BK channels openings at different membrane potentials in symmetrical K^+ concentration (150 mM). (A) (b) Corresponding $i-v$ curve in symmetrical K^+ concentration (150 mM). (B) (a) Outside-out patch-clamp recording of BK channels openings at different membrane potentials in asymmetrical K^+ concentration (150 mM in the pipette, 5 mM in the bath). (B) (b) Corresponding $i-v$ curve in asymmetrical K^+ concentration. (C) Proportion of outside-out patches displaying BK channel activity in the absence of siRNAs, after 3 days of treatment in the presence of ctrl siRNA (si-Ctl, 20 nM) or in the presence of si-hBK (20 nM). (D) Proportion of BK channels ($n=331$) expressed in the plasma membrane is shown as a function of cluster size (for example, 20% of all BK channels were observed in patches containing 4 levels of opening – i.e. in cluster size 4). 31% of the patches were devoid of any channel activity. Theoretical stochastic binomial distribution is also shown. Formula used to compute binomial distribution is:

$$P(k) = \frac{n!}{k!(n-k)!} \times \left(\frac{x}{y}\right)^k \times \left(1 - \frac{x}{y}\right)^{n-k}$$

where $P(k)$ is the probability for one channel of belonging to a cluster of k channels in a membrane patch of $2 \mu m^2$ surface, n = total number of BK channels on the plasma membrane (estimation = 6500), x = patch area (estimated to $2 \mu m^2$ from the patch-pipette size), y = plasma membrane area (estimation = $6500 \mu m^2$). Here, the binomial distribution represents $P(k)*k$ as a function of k (in percentage).

significant, Fisher's test), si-hBK completely inhibited (21 out of 21), the occurrence of this channel activity (Fig. 2C). The number of BK channels in a patch was estimated from the number of openings observed at a membrane potential for which the maximal open probability was observed (usually +20 mV). BK channel density did not vary ($P>0.05$) between different LNCaP cell lines (2 ± 0.3 BK channels per patch for LNCaP-CTL cells ($n=55$), 2.6 ± 0.3 for LNCaP-NE cells ($n=32$), 2.8 ± 0.5 for LNCaP- α_{1H} cells ($n=50$)). Altogether, we observed that 31% of the patches were devoid of any BK channels and 21% of the patches displayed only one opening level. As shown in Fig. 2D, which represents the proportion of the recorded BK channels in this study ($n=137$ patches, 311 channels) as a function of the cluster size (number of channels in a patch), most of the BK channels were present in clusters on the plasma

membrane. A theoretical stochastic distribution of BK channels (following a binomial distribution) on the plasma membrane should lead to a different distribution as shown in Fig. 2D. As an example, 38.3% of all the BK channels are located in clusters of 6 channels or more, whereas a binomial distribution would give a figure of 8.3% (significantly different, $P<0.005$). With an average figure of 2.3 ± 0.3 BK channels per patch ($n=137$ patches, 311 channels), we estimated that the density of BK channels on the plasma membrane was around 1 per μm^2 , which means about 6500 channels for an average LNCaP cell (mean capacitance 65 ± 3 pF). As shown on Fig. 3A, although such BK channels may be activated in the absence of Ca^{2+} in the patch-pipette (10 mM EGTA), perfusing high concentrations of Ca^{2+} into the cells (400 nM) shifted the $i-v$ curve towards negative membrane potentials (Fig. 3A). Ionomycin (1 μM), a Ca^{2+} ionophore, similarly induced a potentiation of BK currents (Fig. 3A), further inhibited by paxillin and si-hBK.

Since BK channels are activated by cytosolic Ca^{2+} , we investigated whether the activation of Ca^{2+} channels in LNCaP cells could lead to the activation of BK channels. As previously shown, T-type Ca^{2+} currents are expressed in about 30% of LNCaP-CTL cells and 80% of LNCaP-NE cells (Mariot et al., 2002). In LNCaP cells overexpressing Cav3.2 channels (LNCaP-NE cells or LNCaP- α_{1H} cells), paxillin ($n=34$) and si-hBK ($n=54$) almost totally inhibited whole-cell BK currents, as was the case in LNCaP-CTL cells. When T-type Ca^{2+} currents were undetectable, depolarization protocols led to outward currents at membrane potentials positive to -10 mV (Fig. 3B). When T-type Ca^{2+} currents were detectable, depolarization protocols led to inward Ca^{2+} currents followed by outward currents at membrane potentials positive to -50 mV (LNCaP- α_{1H} cells, in 100% of the cells, $n=363$, Fig. 3D) and -40 mV (LNCaP-NE cells, in 84% of the cells, $n=224$; LNCaP-CTL cells, in 32% of the cells, $n=81$, Fig. 3C) in the presence of 0.1 mM EGTA in the patch-pipette. These T-type-activated BK currents had low inactivating kinetics ($\tau=167 \pm 35$ msec in LNCaP-NE cells and 5090 ± 900 msec in LNCaP- α_{1H} cells), which were not altered by treatments with ruthenium red (10–100 μM , $n=10-19$), heparine (5 mg/ml, $n=19$) and Xestospongine C (5 μM , $n=11$) in the patch-pipette, or by ryanodine (10–100 μM , $n=17$) in the external medium. This would show that they probably do not involve a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release (not shown). Using tail-current protocols, we noted that these T-type-activated BK currents reversed at -81 ± 2 mV in LNCaP-CTL, LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H} cells (not shown). T-type-activated BK currents were inhibited by concentrations of 10 mM EGTA a few minutes after breaking into whole-cell configuration, in both LNCaP-NE ($n=12$) and LNCaP- α_{1H} cells ($n=10$) (Fig. 3E–G).

In addition, a conditioning pre-pulse at -40 mV, which induces full inactivation of T-type Ca^{2+} channels, completely inhibited T-type-activated BK currents (Fig. 4). This shows that Ca^{2+} entry through T-type Ca^{2+} channels can activate BK currents. The subtraction of K^+ currents obtained at a holding potential (HP) of -40 mV from the total K^+ currents obtained at an HP of -80 mV, gave bell shaped $i-v$ curves, similar to those of T-type Ca^{2+} currents (Fig. 4Ac,Bc). Furthermore, inhibitors of T-type Ca^{2+} channels such as $NiCl_2$ (10–100 μM , $n=16-14$, Fig. 5), mibefradil (5 μM), flunarizine (5 μM) or kurtoxin (100 nM) inhibited both inward T-type currents and T-type-activated BK currents in LNCaP-CTL, LNCaP- α_{1H} and LNCaP-NE cells. However, the purely voltage-dependent component of the BK current was not altered by these inhibitors.

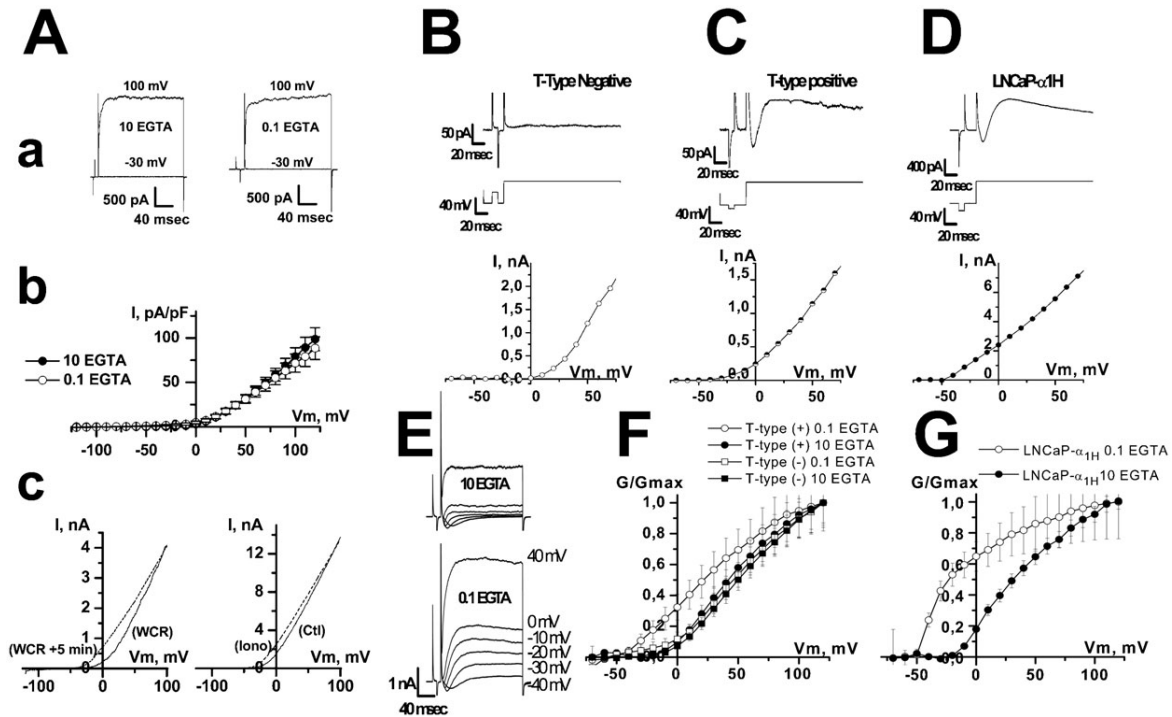


Fig. 3. Comparison of voltage-dependent K^+ current in LNCaP cells with T-type Ca^{2+} current different expression levels (A) Ca^{2+} -dependency of voltage-dependent K^+ current in LNCaP-CTL cells. (A) (a) Typical membrane currents at -30 and $+100$ mV in the presence of either 10 or 0.1 mM EGTA in the patch-pipette. (A) (b) Average $i-v$ curves obtained in the presence of either 10 or 0.1 mM EGTA in the patch-pipette. (A) (c) Typical $i-v$ curves obtained using ramp protocols show that increasing intracellular Ca^{2+} concentration shifts the $i-v$ curve towards negative potentials. Left panel: intracellular perfusion of 400 nM Ca^{2+} . Perfusing high concentration of Ca^{2+} into the cells was carried out using an EGTA-buffered solution in the patch-pipette (10 mM EGTA, 6.5 mM $CaCl_2$ and 1 mM $MgCl_2$). After breaking into whole-cell configuration, this solution shifted the $i-v$ curve towards negative membrane potentials (WCR: current recorded just after breaking into whole-cell recording configuration, WCR+5 min: current recorded 5 minutes later). Right panel: bath perfusion with ionomycin (Iono, 1 μ M), results in an increased K^+ current and its shift to more negative membrane potentials. (B) In LNCaP-CTL cells that do not display any T-type Ca^{2+} current, no K^+ current was observed for membrane potentials lower than 0 mV. Top panel: membrane current. Middle panel: pulse protocol. Bottom panel: I/V curve. (C) In LNCaP cells that express T-type Ca^{2+} current, here a LNCaP-NE cell, this transient Ca^{2+} current was followed by potassium current that could be observed for membrane potential ranging from -40 to 0 mV. (D) Similar results were observed for LNCaP cells stably overexpressing Cav3.2 channels (LNCaP- α_{1H}). (E) In LNCaP- α_{1H} cells, the K^+ current was larger when EGTA was reduced in the patch-pipette (0.1 vs 10 mM EGTA). (F) Representation of relative membrane conductance (G/G_{max}) in LNCaP cells displaying (T-type (+)) or not (T-type (-)) T-type Ca^{2+} current with 0.1 and 10 mM EGTA in the patch-pipette. (G) Representation of the relative membrane conductance (G/G_{max}) in LNCaP- α_{1H} cells with 0.1 and 10 mM EGTA in the patch-pipette.

T-type-activated BK currents were 50% inhibited for a concentration of about 1–2 mM TEA ($IC_{50} = 1.9 \pm 0.7$ mM and 1.14 ± 0.2 mM, for LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H} cells,

respectively). In addition, they were inhibited in both LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H} cells (Fig. 5) by paxillin (1 μ M) or iberiotoxin (1 μ M), but not by apamin (500 nM, $n=4$), d-tubocurarine

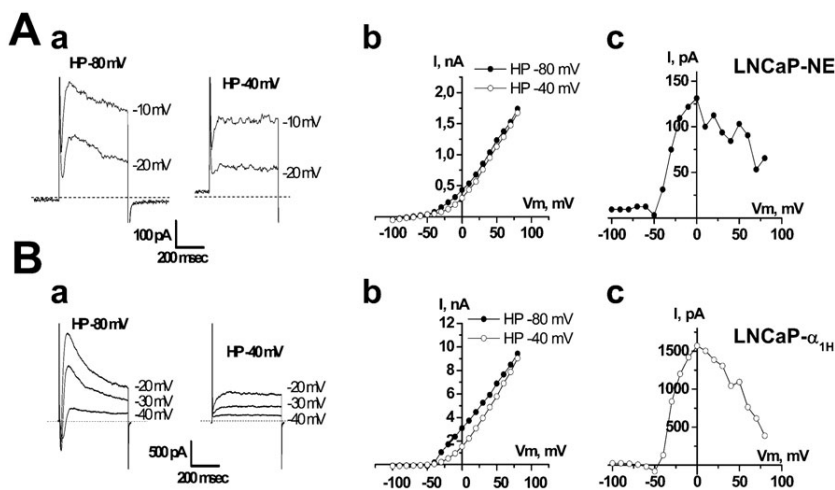


Fig. 4. The transient component of voltage-dependent K^+ current is inhibited by depolarizing the holding potential (HP) from -80 to -40 mV in (A) LNCaP-NE and (B) LNCaP- α_{1H} cells. (A) (a) Examples of membrane currents triggered by voltage steps to various membrane potentials from two different HP (-80 and -40 mV). (A) (b) $i-v$ curves obtained from HP of -80 and -40 mV. (A) (c) $i-v$ curves displaying the difference between the current measured at HP -80 mV and that measured at HP -40 mV.

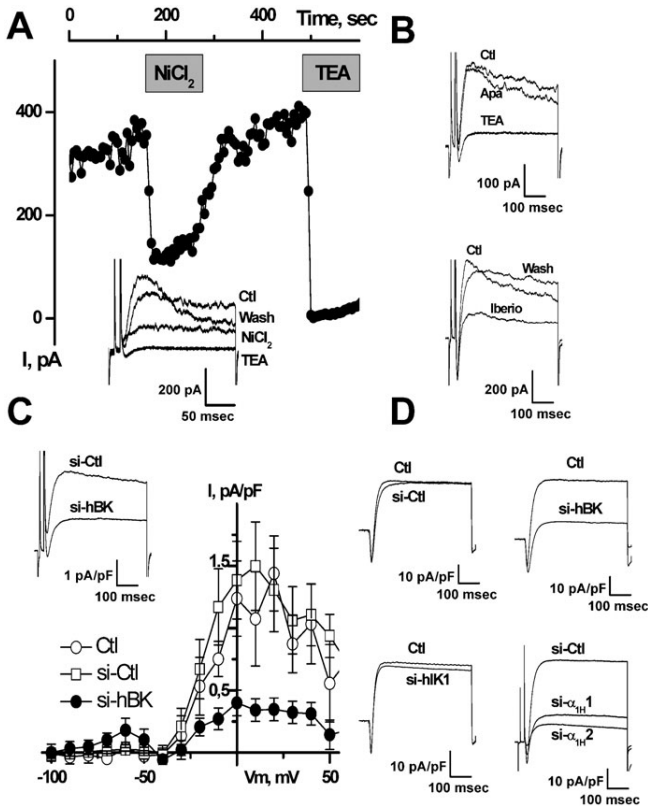


Fig. 5. Pharmacological study of the transient voltage-dependent K⁺ current in LNCaP-NE cells (A,B,C) and LNCaP- α_{1H} cells (D). (A) On-line recording of transient voltage-dependent K⁺ currents inhibition by NiCl₂ (10 μ M) and TEA-Cl (20 mM). Inset: representative membrane currents measured at -20 mV from HP -80 mV. (B) Inhibition of membrane currents (measured at -20 mV from HP -80 mV) by TEA (20 mM) and iberiotoxin (iberio, 1 μ M), but not by apamin (Apa, 500 nM). (C) Inhibition of voltage-dependent K⁺ current by si-hBK (20 nM). i-v curves shown here represent the average difference between currents obtained at HP -80 mV and those obtained at HP -40 mV. Inset: representative membrane currents measured at -20 mV from HP -80 mV. (D) Representative inhibition of membrane currents (measured at -20 mV from HP -80 mV) by si-hBK (20 nM) and si- α_{1H1} and si- α_{1H2} (5 nM), but not by si-Ctl (20 nM) or si-hIK1 (20 nM). Treatments for 3 days with si-hBK (20 nM) inhibit about 80% of the Ca²⁺-dependent K⁺ current in both LNCaP-NE (C) and LNCaP- α_{1H} (D) cells.

(100 μ M, n=4), or clotrimazole (10 μ M, n=7). As shown in Fig. 5C,D, downregulation of BK channels by si-hBK decreased the magnitude of the T-type activated BK currents in both LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H} cells. In addition, knocking down the expression of Cav3.2 Ca²⁺ channels (α_{1H} T-type Ca²⁺ channels) with previously validated siRNAs (si- α_{1H1} and si- α_{1H2} (Gackière et al., 2008)), considerably reduced of the amplitude of T-type-activated BK currents (Fig. 5D). Conversely, si-hIK1 and si-Ctl had no significant influence on T-type Ca²⁺ currents or on T-type-activated BK currents.

We therefore investigated whether there could be a functional coupling between Cav3.2 and BK channels in the plasma membrane. In order to study the co-localization of Cav3.2 and BK channels, we carried out single-channel experiments in the cell-attached configuration of the patch-clamp technique. Cells were depolarized with 100 mM KCl in the bath, in order to clamp the membrane potential at a value close to 0 mV. The patch-pipette contained 140 mM NaCl, 5 mM KCl to measure K⁺

currents. As shown in Fig. 6, a depolarization to -20 mV in LNCaP-NE cells induced channel openings. As measured from their unitary conductance, these channels were identified as BK channels (conductance=150–200 pS). Smaller K⁺ conductances, like the IK channels that we have previously demonstrated to be present and which are activated by cytosolic Ca²⁺ increases in LNCaP cells (Lallet-Daher et al., 2009), were not observed to be activated by Cav3.2 dependent Ca²⁺ entry in our experiments. Channel opening was transiently stimulated immediately after the depolarization. In order to observe T-type Ca²⁺ channel activity, we replaced NaCl by 100 mM CaCl₂ in the patch-pipette (100 mM CaCl₂, 5 mM KCl, no NaCl). Under these conditions, a small inward current could be observed just before BK channel openings (Fig. 6C, left panel). We are inclined to think that this small inward current (1 pA) is due to a T-type Ca²⁺ channel opening. Indeed, at such a divalent concentration (100 mM), the

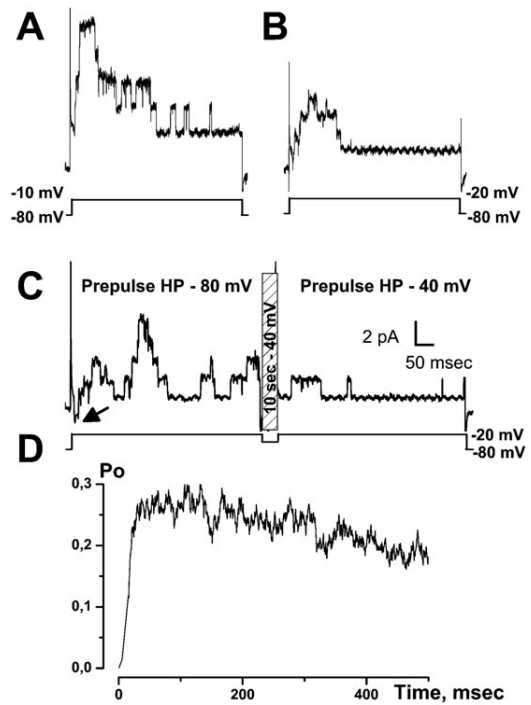


Fig. 6. Cell-attached single-channel study of coupling between BK and Cav3.2 channels in LNCaP-NE cells. (A) Example of recording of BK channel opening following a voltage step to -10 mV. (B) Example of recording of BK channel opening following a voltage step to -20 mV. As seen, channel opening occurs mainly at the beginning of the depolarization. (C) Examples of channel openings following stimulation to -20 mV for two different holding potentials (HP). For each patch, the same protocol was applied (shown below channel recordings). The patch was first depolarized from a HP of -80 mV (pre-pulse HP) to a test pulse of -20 mV for 500 msec (left panel). The membrane potential was then immediately returned to a HP of -40 mV for 10 sec in order to inactivate T-type Ca²⁺ channels. A second test pulse to -20 mV was then applied for 500 msec (right panel). The membrane potential was then returned to -80 mV. As seen, BK channel opening for a HP of -80 mV occurs immediately after the inward Ca²⁺ current (arrow). This is impeded when an HP -40 mV pre-pulse was applied for 10 sec just before the test pulse. (D) Average BK channel open probability (Po) during a depolarization to -20 mV in LNCaP-NE cells. This value is computed by averaging (20–50 different voltage pulses from 15 cells) and subtracting single-channel currents obtained for an HP of -40 mV from those obtained for an HP of -80 mV. In these experiments, there were an average number of 4 BK channels in each patch.

single channel conductance of T-type Ca^{2+} channels is close to 7 pS (for a review, see Perez-Reyes and Lory, 2006) and the corresponding single-channel current at -20 mV is expected to be about 1 pA. In addition, as shown in Fig. 6C, this inward current was rapidly inactivated after the onset of depolarization. When T-type Ca^{2+} channels were inactivated by a 10 sec conditioning potential pulse at -40 mV (Fig. 6C, right panel), we did indeed observe that this small inward current was inhibited showing that it is carried by Ca^{2+} entry through Cav3.2. Furthermore, the transient BK channel opening probability (P_o) was significantly reduced in LNCaP-NE cells by a previous inactivation of T-type Ca^{2+} channels at -40 mV (Fig. 6C, right panel). Such a functional coupling between Cav3.2 and BK channels in the same patch was observed in all the LNCaP- α_{1H} cell patches and in almost half of the LNCaP-NE ones (46%, $n=39$ cells). From the average channel density in LNCaP-NE cells displaying a functional coupling (4 ± 0.2 BK channel per patch), we were able to compute the T-type activated BK channel open probability (Fig. 6D). We can observe that the maximum average P_o is reached only 30 msec after the onset of depolarization, showing a fast coupling between both Cav3.2 and BK channels. We thus carried out confocal immunofluorescence experiments to study the subcellular localization of these channels. As shown in Fig. 7A–C, confocal experiments using immunofluorescent staining of LNCaP cells overexpressing Cav3.2 channels (LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H}) show that there is a colocalization of both ion channels, as illustrated by the overlay of fluorescence at both

FITC and Rhodamine wavelengths. Fluorescence was particularly strong at the cell periphery (Fig. 7D), indicating that these channels could be expressed together in the same plasma membrane areas. In addition, we performed co-immunoprecipitation studies in order to assess whether Cav3.2 and BK channels belong to the same molecular complex. We show in Fig. 7E that each channel protein could be immunoprecipitated by the other one, indicating that both ion channels could be part of a common protein complex.

We investigated the possibility that Cav3.2 channels could promote Ca^{2+} entry and could thereby activate BK channels. In Fura2 Ca^{2+} imaging experiments, although basal Ca^{2+} was significantly higher in LNCaP-NE cells than in LNCaP-CTL cells (84 ± 5.3 nM ($n=50$) vs 62 ± 1.2 nM ($n=61$), $P < 0.01$), there were no detectable Ca^{2+} oscillations in these cells. In LNCaP- α_{1H} cells, the cytosolic Ca^{2+} concentration was significantly higher (109 ± 3 nM, $n=358$) than in LNCaP-NE cells ($P < 0.001$). Basal Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in both LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H} cells was reduced by NiCl_2 (20 μM , reduction of $[\text{Ca}^{2+}]_i$: $\Delta\text{Ca} = 11 \pm 3$ nM, $n=42$) and si- α_{1H1} and si- α_{1H2} ($\Delta\text{Ca} = 18 \pm 2.5$ nM, $n=62$, $P < 0.001$ and 15 ± 1.5 nM, $n=43$, $P < 0.001$, respectively). We carried out current-clamp recordings in zero current conditions to study the functional role of Cav3.2 channels in the Resting Membrane Potential (RMP) setting. BK channels are partially responsible for LNCaP cells RMP (RMP = -32 ± 2 mV, $n=15$). Indeed, RMP was significantly depolarized by increasing the extracellular K^+ concentration and by TEA, paxillin (-3.5 ± 1.9 mV, $n=27$, $P < 0.001$) and

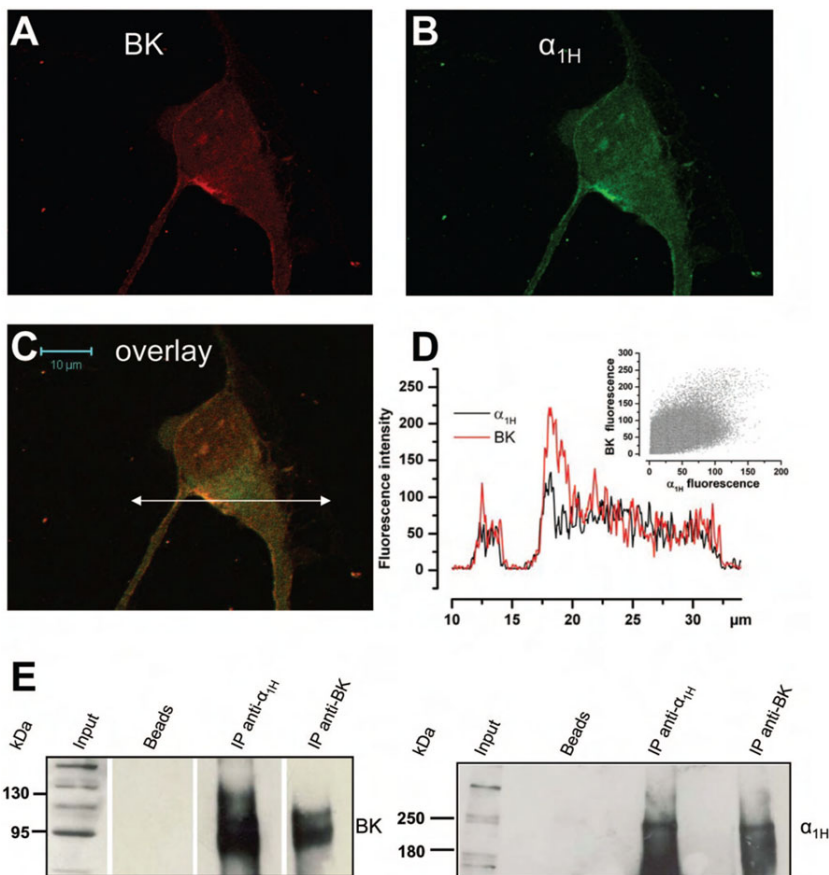


Fig. 7. Cav3.2 and BK channels co-localize in the same membrane area and belong to the same molecular complex. (A–C) Confocal immunofluorescence images of a LNCaP cell overexpressing Cav3.2 GFP (green) stained with an anti-BK antibody (red). Staining is more pronounced on the plasma membrane for both channels and the overlay shows that there is a co-localization (yellow-orange areas) on plasma membrane areas. Scale bar: 10 μm . (D) Representation of both Cav3.2 and BK fluorescence intensities along the horizontal line shown in panel C. Inset: a scattergram of BK fluorescence vs Cav3.2 fluorescence showing a correlation between both channels (Pearson's $r=0.77$). (E) Western-blot of proteins immunoprecipitated by the anti-Cav3.2 antibody (anti- α_{1H}) or the anti-BK antibody. Membranes were revealed with the anti-BK antibody and the anti- α_{1H} (right panel) antibody. Bead lanes contain the beads used during the immunoprecipitation without the protein input.

iberiotoxin (-7 ± 1.8 mV, $n=10$, $P<0.001$). Similarly, si-hBK strongly depolarized LNCaP cells (-1.7 ± 5.8 mV, $n=8$, $P<0.001$). In contrast, inhibition of IK or SK channels by siRNAs, apamin or d-tubocurarine did not alter the membrane potential. LNCaP-NE cells were slightly hyperpolarized (-40 ± 0.8 mV, $n=10$, $P<0.05$) as compared to undifferentiated cells (-32 ± 2 mV), with 0.1 mM EGTA in the patch-pipette. In addition, LNCaP- α_{1H} cells were even more hyperpolarized (-54.2 ± 1 mV, $n=32$, $P<0.001$). This hyperpolarization was antagonized by both siRNAs raised against Cav3.2 (-41.8 ± 4.4 ($n=10$) for si- α_{1H1} , -29.9 ± 1.9 ($n=19$) for si- α_{1H2} , $P<0.001$) and by 20 μ M NiCl₂ (-37.8 ± 1.3 ($n=16$), $P<0.001$). When EGTA was increased to 10 mM in the patch-pipette, the RMP of both LNCaP-NE and LNCaP- α_{1H} cells was depolarized to values similar to those measured for LNCaP-CTL cells.

We then investigated whether such a coupling could participate in prostate cancer cell growth. As shown in Fig. 8A using MTS survival assays, cell proliferation was dose-dependently inhibited by NiCl₂ after 4 days of incubation. At a concentration which blocks Cav3.2 channels at 80% (20 μ M), NiCl₂ induced a 20% cell growth reduction. At concentrations inhibiting Cav3.2 channels, flunarizine (5 μ M) or si- α_{1H} (20–50 nM) also induced a similar reduction in cell proliferation (Fig. 8C,D). Furthermore, overexpressing Cav3.2 channels led to a significant stimulation of cell proliferation (Fig. 8B). These results thereby demonstrate that Cav3.2 Ca²⁺ channels are involved in cell proliferation. Similarly, we show that BK channels stimulate LNCaP cell growth. Indeed, paxillin (10 μ M) significantly decreased LNCaP cell growth by about 20%. In addition, the inhibitory action of paxillin on proliferation was mimicked by si-hBK, indicating that its action occurs *via* BK channel inhibition (Fig. 8D). Since BK channels are already strongly expressed in LNCaP cells, we did not assess whether the overexpression of BK channels could lead to proliferation stimulation. In order to confirm the results obtained with MTS assay, we also performed Ki-67 immunostaining, which allows the discrimination of quiescent cells in the G0 phase (unstained) from proliferating cells (stained). The number of proliferating cells was determined as the proportion of cells stained by the Ki67 antibody. As illustrated in Fig. 8E–G, the percentage of Ki67 positive cells was reduced by T-type Ca²⁺ channels inhibitors, BK channels inhibitors, si-hBK or si- α_{1H} . In addition to increasing the proportion of cells in the G0 phase, a FACS analysis showed that both T-type Ca²⁺ channel inhibition and BK channel inhibition increased the percentage of cells in the G1 phase by 8–10% and decreased the proportion of cells in S and G2/M phases (Fig. 8H). Reduction in cell growth was not due to cell apoptosis since no detectable SubG1 peak was observed with any of the inhibitors or siRNAs used in this study (not shown). Furthermore, there was no additive action of NiCl₂ (20 μ M) and paxillin (10 μ M), suggesting that both antagonists decrease cell proliferation *via* common pathways (Fig. 8H). The additive action of siRNAs could not be assessed because of the cytotoxic effects caused by the increased total siRNA concentration.

Discussion

Our results confirm that BK channels are expressed in LNCaP cells, as previously shown by others (Gessner et al., 2006; Gutierrez et al., 1999) and that most of the voltage-dependent K⁺ current is carried by BK channels in these cells. These BK

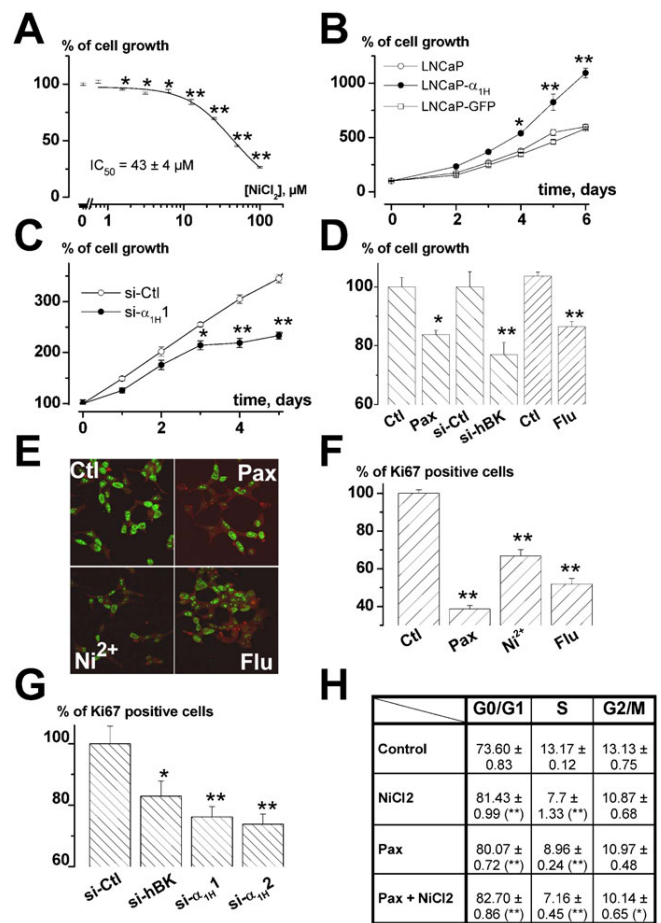


Fig. 8. Role of BK and Cav3.2 channels in LNCaP-CTL cell proliferation. (A) Inhibition of cell growth (assayed by MTS) induced by a 4-day incubation in various concentrations of NiCl₂. Data are normalized to the proliferation rates measured in control conditions (100%) as in panel D. $n=9$ per condition. (B) Stable overexpression of Cav3.2 stimulated LNCaP cell growth (as assayed by MTS). Results are normalized to DO at t0 (100%) as in panel C. $n=12$ per condition. (C) Inhibition of LNCaP cell growth by si- α_{1H1} (20 nM) measured by MTS. siRNAs were added when seeding the cells. $n=12$ per condition. (D) Cell growth measured with MTS after 4 days in various channel inhibitors or si-RNAs (Pax: paxillin (10 μ M), Flu: flunarizine (10 μ M), si-Ctl and si-hBK (20 nM)). $n=6$ per condition. (E) Immunodetection of Ki-67 in LNCaP-CTL cells after 4 days of incubation in various BK and Cav3.2 channel inhibitors (Pax: paxillin 10 μ M, Flu: flunarizine 5 μ M and Ni²⁺: NiCl₂ 20 μ M) and relative % of cells immunostained with Ki-67 antibody in the presence of these channel inhibitors (F) or siRNAs (20 nM) (G). (H) Table showing the % of cells in each phase of the cell cycle using FACS analysis (G0/G1, S and G2/M). Inhibition of both T-type and BK channels (with 20 μ M NiCl₂ and 10 μ M paxillin, respectively) increases the proportion of cells in G0/G1 phase and decreases the proportion of cells in S phase without additive action. This experiment is representative of 3 experiments (for each experiment, $n=3$, each measured in duplicate). Statistical significance: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

currents have standard single-channel conductances (about 200 pS in symmetrical K⁺ conditions), but display non-standard Ca²⁺ dependency as previously shown by Gessner et al. (Gessner et al., 2006). Indeed, BK currents can be fully activated in very low concentrations of cytosolic Ca²⁺ (buffered with 10 mM EGTA). In whole-cell configuration with 10 mM EGTA in the recording pipette, BK currents are activated at around -10 mV in LNCaP cells. Such a property has been attributed to a

regulating subunit LRCC26 (Yan and Aldrich, 2010). In LNCaP cells, we demonstrate that BK channels maintain the resting membrane potential to values around -30 mV, which are very close to those described elsewhere (Gutierrez et al., 1999; Mariot et al., 2002). In addition, BK channels are sensitive to Ca^{2+} concentration increases. Despite the low density of Cav3.2 channels on the plasma membrane, BK channels were consistently activated by Ca^{2+} entry through Cav3.2 channels, which indicates that there is a specific and functional coupling between both channels in LNCaP cells. However, an activation of IK channels, another Ca^{2+} -dependent K^+ channel expressed in LNCaP cells activated by large increases in cytosolic Ca^{2+} concentration (Lallet-Daher et al., 2009; Parihar et al., 2003), was never observed in response to T-type Ca^{2+} channels activity.

We therefore investigated whether a functional interaction could exist between Cav3.2 and BK channels. There is evidence showing co-localization and coupling between different voltage-dependent Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -dependent K^+ channels. For instance, L-type Ca^{2+} channels have been shown, using single-channel experiments, to be specifically coupled to SK channels (Marrion and Tavalin, 1998). In addition, T-type Ca^{2+} channels have been shown to be coupled to small conductance SK channels in dopaminergic neurons (Wolfart and Roeper, 2002). Such functional couplings between BK and other voltage-dependent Ca^{2+} channels have been demonstrated in various cell types, such as L- and Q-type channels in adrenal chromaffin cells (Prakriya and Lingle, 1999), L-type and N-type channels in neocortical pyramidal neurons (Sun et al., 2003) or the active zones of hair cells (Issa and Hudspeth, 1994; Samaranayake et al., 2004). Co-localization and physical interaction have been demonstrated between BK channels and L-type Cav1.2 channels in rat brain and adrenal chromaffin cells (Wolfart and Roeper, 2002; Grunnet and Kaufmann, 2004; Berkefeld et al., 2006). In our experiments, because functional coupling was frequently observed in cell-attached patch single channel experiments (in half of the cell-attached patches in neuroendocrine LNCaP cells), we suggest that there is a co-localization of both channels. Firstly, the location of BK channels in clusters (50% of BK channels are pooled in only 17% of the plasma membrane surface) is a strong argument for a functional coupling with other ion channels. Furthermore, coupling was observed essentially in patches displaying 3 or more single BK channel opening levels, which means that Cav3.2 channels are probably located in BK channel clusters. In addition, our co-immunoprecipitation and immunofluorescence experiments suggest that both channels belong to the same macromolecular complexes.

The activation of BK channels by Cav3.2 channels was observed not only in a Cav3.2 overexpressing cell model (LNCaP- α_{1H}), but also in cells endogenously expressing moderate levels of Cav3.2 channels (from 0.3 pA/pF (1 channel/30 μm^2) to 1 pA/pF (1 channel/10 μm^2)). Despite such a low Cav3.2 channel density, BK channels were activated in all LNCaP cells expressing functional Cav3.2 currents. Since endogenous expression of Cav3.2 channels is not associated with calcium oscillations in LNCaP cells, it is likely that Cav3.2 channel activity only allows calcium increases restricted to small areas underneath the plasma membrane. These local Ca^{2+} increases may in turn activate nearby BK channels. In prostate cancer cells, such Ca^{2+} entry would occur at a resting membrane potential (RMP) window, as shown previously for Cav3.2 channels in LNCaP cells (Mariot et al., 2002), in other endogenously

expressing cell models (Bijlenga et al., 2000) and in overexpressing cell models (Xie et al., 2007). In prostate cancer cells, this RMP window is probably set by BK and Cav3.2 channel coupling. Indeed, inhibiting BK channels depolarized the RMP to close to 0 mV, showing that they are the main ion channels involved in this function. In addition, overexpressing Cav3.2 channels surprisingly led to a more hyperpolarized RMP, whereas blocking the Cav3.2 expression or function produced a depolarized RMP. Therefore, Cav3.2 channels are able, through BK channel activation, to shift the RMP towards negative values. It is therefore probable that RMP automatically equilibrates at around the optimum value for generating a window Ca^{2+} current through Cav3.2 channels, thereby producing a steady Ca^{2+} entry. If RMP drifts towards more negative values (hyperpolarization), this will close Cav3.2 channels. This will in turn decrease basal Ca^{2+} entry and thereby reduce the cytosolic Ca^{2+} concentration underneath the plasma membrane. This would lead to reduced BK channel activation and thus to a membrane depolarization that may reopen Cav3.2 channels once the optimal RMP has been reached.

In neuronal cells, functional coupling between voltage-dependent Ca^{2+} channels and Ca^{2+} -dependent K^+ channels has been shown to participate in action potential repolarization (Sun et al., 2003) or burst firing (Wolfart and Roeper, 2002; Swensen and Bean, 2003). We investigated the potential role of this coupling in non-excitabile prostate cancer cells proliferation. The role of BK channels in proliferation has previously been studied in different cell models and noticeably in prostate cancer cells, where they would appear to be either stimulatory or inhibitory or negligible according to the cell type or the cell line. For example, in osteosarcoma, BK-silencing using an siRNA strategy induced *in vivo* tumorigenesis (Cambien et al., 2008). In breast cancer cells, whilst their expression is correlated to the different phases of the cell cycle, their inhibition by iberiotoxin was not correlated to any changes in proliferation (Ouadid-Ahidouch et al., 2004; Roger et al., 2004). In addition, to add even more complexity, their stimulation by tamoxifen could promote cell proliferation (Coiret et al., 2007), an action inhibited by BK channel blockade. In gliomas, BK channels have been shown to be upregulated in high grades of the diseases (Liu et al., 2002). Furthermore, their inhibition leads to reduced glioma cell proliferation (Weaver et al., 2004). In the prostate, it has recently been shown that BK channels are overexpressed in cancer and that their inhibition reduces cell proliferation (Bloch et al., 2007; Oeggerli et al., 2012). Similarly, a role for T-type Ca^{2+} channels in proliferation and cancer progression has been suggested in various cell types (for reviews, see Lory et al., 2006; Panner and Wurster, 2006), such as breast cancer cell lines (Taylor et al., 2008), oesophageal cancer (Lu et al., 2008) or gliomas (Panner et al., 2005). Our results obtained using FACS analysis of the cell cycle, cell survival and Ki67 expression, point to a joint role of both BK and Cav3.2 channels in cell proliferation. Indeed, their pharmacological inhibition or their downregulation by specific siRNAs decreased the proportion of cells in the S-phase of the cell cycle, slowing cell growth and reducing the proportion of cells expressing Ki-67, which is a known marker of proliferating cells. Besides, no additive inhibition was observed when T-type Ca^{2+} channels and BK channels were simultaneously pharmacologically inhibited, showing that they are involved in a common pathway implicated in cell proliferation. In addition, we have observed that BK channels, as previously demonstrated for Cav3.2 channels (Gackière et al., 2006), are involved in Prostatic Acid Phosphatase secretion (not

shown). This allows us to speculate that the role of BK and Cav3.2 channels in proliferation may be either direct, by activating transcription factors relying on Ca^{2+} signalling as previously demonstrated for TRPC6 channels (Thebault et al., 2006), or indirect, by promoting the secretion of mitogenic factors which in turn could activate cell proliferation.

In summary, we have shown here that both Cav3.2 and BK channels localize in same plasma membrane areas and may be part of a common molecular complex. Through such an interaction, they might regulate prostate cell proliferation. Such a role played by coupled BK and Cav3.2 channels could explain previously published discrepancies relative to the role of either BK or Cav3.2 channels in proliferation (for reviews, see Lory et al., 2006; Panner and Wurster, 2006). It is therefore likely that the role of each channel in cell proliferation depends on a concerted action with other channels or partner proteins.

Materials and Methods

Cell culture and treatments

LNCaP cells were purchased from the American Type Culture Collection and grown as recommended in RPMI 1640 (Gibco, Life Technology, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France), and 2 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Cells were routinely grown in 75 cm² flasks (Nunc, Poly-Labo, France) in a humidified atmosphere at 37°C (95% air–5% CO₂). For electrophysiological and imaging studies, cells were detached from their support using trypsin–EDTA for two minutes, centrifuged and sub-cultured in Petri dishes (Nunc) and on glass coverslips for imaging studies only. The culture medium was then changed every three days. In order to induce neuroendocrine differentiation, LNCaP cells were cultured with 1 mM dibutylryl cyclic-AMP (Bt₂cAMP) and 100 μM isobutylmethylxanthine (IBMX) for 3–6 days. Stable cell lines expressing Cav3.2 (α_{1H}) channel (LNCaP- α_{1H}), or α_{1H} -GFP fusion protein (LNCaP- α_{1H} GFP) were designed as previously reported (Gackière et al., 2008).

Fluorescence imaging

Fluorescence imaging was carried out in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of external solutions were adjusted to 310 mOsm.l⁻¹ and 7.4, respectively. Cytosolic Ca²⁺ concentration was measured using Fura2-loaded cells (2 μM) as described elsewhere (Gackière et al., 2006). The intracellular Ca²⁺ concentration was derived from the ratio of the fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths (F340/F380) and from the Grynkiewicz et al. equation (Grynkiewicz et al., 1985). The cells were continuously perfused with the HBSS solution and chemicals were added *via* a perfusion system.

Electrophysiological recordings

Whole-cell patch-clamp recordings (Hamill et al., 1981) were performed using a RK-300 patch-clamp amplifier (Biologic, Grenoble, France) as previously described (Gackière et al., 2008). Whole-cell membrane currents were measured in the voltage-clamp mode after the previous cancellation of series resistance (Rs value was usually 5 MΩ when breaking into whole-cell configuration and kept stable for the first 10 minutes of each experiment). Unless otherwise specified, the bath medium used for whole-cell and outside-out experiments was HBSS. For cell-attached single-channel recordings, the bath medium contained 100 mM KCl, 45 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose and 2 mM CaCl₂. We previously conducted current-clamp experiments to determine that this solution induced a membrane depolarization to 0 mV. The osmolarity and pH of the external buffers were adjusted to 310 mOsm.l⁻¹ and 7.4, respectively. For whole-cell or outside-out single-channel experiments, the recording pipettes were filled with a solution containing 130 mM K-Gluconate, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, with 0.1 to 10 mM EGTA. For cell-attached single-channel experiments, the pipette solution contained standard HBSS or a medium containing 100 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 5 mM KCl. Osmolarity and pH were adjusted to 290 mOsm.l⁻¹ and 7.2, respectively.

Junction potential was cancelled when the patch-pipette was dipped in the bath solution (standard HBSS containing 5 mM K⁺ and 145 mM Na⁺) close to the cell before sealing the cell membrane. Using JPCalc software we calculated that the greatest variation in liquid junction potential that could occur in our experiments (when bath medium was changed from 145 mM Na⁺ and 5 mM K⁺ to 0 mM Na⁺ and 150 mM K⁺) was –3.7 mV. The chloride concentration was kept constant during perfusion. Resting membrane potential (RMP) values (measured in zero

current conditions) compensated for these calculated values (RMP = Recorded membrane potential – Liquid Junction Potential) in our experiments.

siRNAs design and cell preparation

Small interfering RNAs against the human coding sequence of Cav3.2 (α_{1H}) channels (Genebank accession # NM-021098.2) were designed and two selective sequences, referred to as si- α_{1H1} and si- α_{1H2} , were selected to knock down the expression of T-type α_{1H} Ca²⁺ channels. We have previously validated these siRNAs in LNCaP cells (Gackière et al., 2008). In addition, siRNAs against human forms of BK channels (referred to as si-hBK, Genebank accession # HSU11717) and IK1 channels (referred to as si-hIK1, Genebank accession # NM_002250) were used to downregulate the expression of both large and intermediate conductance Ca²⁺-dependent K⁺ currents, respectively. We have also previously validated the siRNAs directed against the human form of KCa3.1 channels in LNCaP cells (Lallet-Daher et al., 2009). The siRNAs used in this study included a non-specific control siRNA (si-Ctl) with at least 4 mismatches to any human genes. Sense sequences of siRNAs were 5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3' (si-Ctl), 5'-ACGUGAGCAUGCUGGUAUdTdT-3' (si- α_{1H1} , position 311–329 from ATG), 5'-AGAUGGCCGUGGCGUCUAUdTdT-3' (si- α_{1H2} , position 2166–2184 from ATG), 5'-GAGTCCTGGTTGTCTTAGT-3' (si-hBK, position 485–503 from ATG), and 5'-CAAGCACCGGTTTCGAAATGT-3' (si-hIK1, position 975–994 from ATG). siRNAs were purchased from Dharmacon (France).

LNCaP-CTL and LNCaP- α_{1H} cells were transfected with either 5 or 20 nM siRNA si- α_{1H1} , si- α_{1H2} , si-hBK, si-hIK1 or si-Ctl using HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) as described previously (Gackière et al., 2008).

Analysis of the BK and IK channel gene expression (RT-PCR)

RT-PCR was carried out as previously described (Gackière et al., 2008). The PCR primers used to amplify the 794 bp KCa1.1 amplicon (accession number: NM_001014797.1) were 5'-CAGACACTGACTGGCAGAGT-3' (forward) and 5'-TGACGTCATCCCGTCTTGTGCA-3' (reverse), and those used to amplify the 234 bp GAPDH amplicon (accession number: NM_002046.3) were 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' (forward) and 5'-GGCATGGACTGTGGT-CATGA-3' (reverse). The PCR primers used to amplify the 578 bp KCa3.1 amplicon (accession number: NM_002250) were 5'-TCCAGCAGCCATCAG-CAAGCCA-3' (forward) and 5'-GCTGGAGTTAACAAGGCAGA-3' (reverse).

Western blotting and co-immunoprecipitation

After being washed in phosphate buffered saline (PBS), cells were collected by scraping in a lysis buffer (Triton X-100 1%, Na deoxycholate 1%, NaCl 150 mM, PO₄NaK 10 mM, pH 7.2) with an anti-protease cocktail and incubated on ice for 45 min. The lysates were centrifuged at 12000 G for 10 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by BCA assay (Pierce Chemical Company). For co-immunoprecipitation, a mixture containing protein A/G PLUS agarose beads (Santa Cruz, Biotechnology) and 1 μg anti-BK (or anti- α_{1H}) antibody was incubated under rotation for 1 h at 4°C. An equal amount of cell extract (500 μg) and protease inhibitor were added to the total volume and incubated under rotation overnight at 4°C. After washing, the beads–antibody–proteins complex was re-suspended in SDS sample buffer for 30 min at 37°C. The immune complexes were separated by electrophoresis on 6 or 8% SDS-PAGE gels. Western-blot analysis of protein expression was designed as described elsewhere (Gackière et al., 2008) using the same primary antibodies as in immunoprecipitation: anti- α_{1H} polyclonal antibody (1/200, rabbit, Santa Cruz) and anti-BK polyclonal antibody (1/500, rabbit, Alomone).

Cell extract (50 μg) without immunoprecipitation was also used as a source of marker proteins (Input) and was submitted directly to SDS-PAGE and immunoblotting as presented in the figures.

Viability test

Cell viability was assessed by a colorimetric method (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. Cells were grown on 24 well plates. Each mean represents the averaged value of 6–12 different measurements. Each experiment is representative of at least three independent experiments.

Cell cycle analysis

For each condition, cells were grown in three 60-mm dishes and each measurement was done in duplicate. Drugs or siRNAs were applied as described above. After treatments, cells were trypsinized, harvested and resuspended in 0.2 ml sterile PBS. 1 ml of cold 70% ethanol was added to cell suspensions while vortexing. Samples were centrifuged, washed in sterile PBS and then incubated with ribonuclease (2 μg/ml) for 15 min at room temperature. Propidium iodide (25 μg/ml final in PBS–Triton X-100 0.1%) was then added and allowed to incubate for an additional 30 min at room temperature. DNA content was measured by exciting propidium iodide at 488 nm and measuring the emission at 520 nm, using a flow cytometer (Beckman coulter Epics XL4-MCL with Expo32

acquisition). Data analysis was carried out using Multicycle for Windows (Phoenix Flow system). Each experiment is representative of at least three independent experiments.

Immunostaining and confocal analysis

Immunostaining and confocal observations were carried out as previously described (Gackière et al., 2008), using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) connected to a Zeiss Axiovert 200 M with a $\times 63$ oil-immersion objective lens (numerical aperture 1.4). Anti-Ki-67 antibody was used to evaluate the percentage of proliferating cells (1/100, rabbit, Abcam). At least 500 cells per slide and three slides per condition were double-blind counted. Co-localization of BK channels and Cav3.2 channels was studied using both anti- α_{1H} polyclonal antibody (1/200, rabbit, Santa Cruz) and anti-BK polyclonal antibody (1/500, rabbit, Alomone).

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma, except for Fura2-AM, which was bought from Calbiochem (France Biochem, Meudon, France).

Statistical analysis

Each average current/voltage relationship shown in this article corresponds to the mean of at least 10 cells and is representative of at least 3 independent experiments. Plots were produced using Origin 7.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analyses were performed using unpaired t-tests (for comparing two groups) or ANOVA tests, followed by either Dunnett (for multiple control vs test comparisons) or Student-Newman-Keuls (for multiple comparisons) post-tests. Contingency tables were analyzed using Fisher's test. Differences were considered significant with * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Author Contributions

P.M. and M.R. supervised the study. Patch-clamp studies were carried out by F.G. Proliferation studies were conducted by M.W., F.G. and P.D. Co-immunoprecipitation studies were performed by M.W., M.K., S.D., E.D. and C.S. Calcium measurements were performed by S.H. Data were analyzed by P.M., F.G. and M.W. The manuscript was written by P.M. and corrected by M.R., M.W., F.G. and N.P.

Acknowledgements

We thank Prof. Delahaye, Professor of Mathematics, University of Lille1, for his helpful contribution and comments about theoretical stochastic binomial distribution of BK channels in the plasma membrane (Fig. 2).

Competing Interests

4 The authors have no competing interests to declare.

References

- Bennett, E. S., Smith, B. A. and Harper, J. M. (2004). Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch.* **447**, 908-914.
- Berkefeld, H., Sailer, C. A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J. O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D. et al. (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* **314**, 615-620.
- Bijlenga, P., Liu, J. H., Espinos, E., Haeggeli, C. A., Fischer-Lougheed, J., Bader, C. R. and Bernheim, L. (2000). T-type α_{1H} Ca²⁺ channels are involved in Ca²⁺ signaling during terminal differentiation (fusion) of human myoblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7627-7632.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J., Kunzelmann, K. and Bubendorf, L. (2007). KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* **26**, 2525-2534.
- Cambien, B., Rezzonico, R., Vitale, S., Rouzère-Dubois, B., Dubois, J. M., Barthel, R., Karimjee, B. S., Mograbi, B., Schmid-Alliana, A. and Schmid-Antomarchi, H. (2008). Silencing of hSlo potassium channels in human osteosarcoma cells promotes tumorigenesis. *Int. J. Cancer* **123**, 365-371.
- Coiret, G., Borowiec, A. S., Mariot, P., Ouadid-Ahidouch, H. and Matifat, F. (2007). The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **71**, 843-851.
- Farias, L. M., Ocaña, D. B., Díaz, L., Larrea, F., Avila-Chávez, E., Cadena, A., Hinojosa, L. M., Lara, G., Villanueva, L. A., Vargas, C. et al. (2004). Ether a-go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer Res.* **64**, 6996-7001.

- Fiske, J. L., Fomin, V. P., Brown, M. L., Duncan, R. L. and Sikes, R. A. (2006). Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 493-500.
- Gackière, 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**, 357-366.
- Gackière, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoi-Mariot, M. T., Mauroy, B., Prevarskaya, N. et al. (2008). CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 10162-10173.
- Gessner, G., Schönherr, K., Soom, M., Hansel, A., Asim, M., Baniahmad, A., Derst, C., Hoshi, T. and Heinemann, S. H. (2006). BKCa channels activating at resting potential without calcium in LNCaP prostate cancer cells. *J. Membr. Biol.* **208**, 229-240.
- Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X. and O'Rourke, S. T. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol. Ther.* **110**, 103-116.
- Grunnet, M. and Kaufmann, W. A. (2004). Coassembly of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in rat brain. *J. Biol. Chem.* **279**, 36445-36453.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450.
- Gutierrez, A. A., Arias, J. M., García, L., Mas-Oliva, J. and Guerrero-Hernández, A. (1999). Activation of a Ca²⁺-permeable cation channel by two different inducers of apoptosis in a human prostatic cancer cell line. *J. Physiol.* **517**, 95-107.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100.
- Huang, L., Li, B., Li, W., Guo, H. and Zou, F. (2009). ATP-sensitive potassium channels control glioma cells proliferation by regulating ERK activity. *Carcinogenesis* **30**, 737-744.
- Issa, N. P. and Hudspeth, A. J. (1994). Clustering of Ca²⁺ channels and Ca(2+)-activated K⁺ channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7578-7582.
- Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *J. Membr. Biol.* **205**, 159-173.
- Lallet-Daher, H., Roudbaraki, M., Bavencoffe, A., Mariot, P., Gackière, F., Bidaux, G., Urbain, R., Gosset, P., Delcourt, P., Fleurisse, L. 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**, 1792-1806.
- Lang, F., Föllmer, 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**, 147-157.
- Liu, X., Chang, Y., Reinhart, P. H., Sontheimer, H. and Chang, Y. (2002). Cloning and characterization of glioma BK, a novel BK channel isoform highly expressed in human glioma cells. *J. Neurosci.* **22**, 1840-1849.
- Lory, P., Bidaud, I. and Chemin, J. (2006). T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* **40**, 135-146.
- Lu, F., Chen, H., Zhou, C., Liu, S., Guo, M., Chen, P., Zhuang, H., Xie, D. and Wu, S. (2008). T-type Ca²⁺ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation. *Cell Calcium* **43**, 49-58.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M. F. and Prevarskaya, N. (2002). Overexpression of an α_{1H} (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 10824-10833.
- Marrion, N. V. and Tavalin, S. J. (1998). Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature* **395**, 900-905.
- Morokuma, J., Blackiston, D., Adams, D. S., Seeborn, G., Trimmer, B. and Levin, M. (2008). Modulation of potassium channel function confers a hyperproliferative invasive phenotype on embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 16608-16613.
- Oeggerli, M., Tian, Y., Ruiz, C., Wijker, B., Sauter, G., Obermann, E., Güth, U., Zlobec, I., Sausbier, M., Kunzelmann, K. et al. (2012). Role of KCNMA1 in breast cancer. *PLoS ONE* **7**, e41664.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Ahidouch, A., Delcourt, P. and Prevarskaya, N. (2004). Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**, 244-251.
- Panner, A. and Wurster, R. D. (2006). T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* **40**, 253-259.
- Panner, A., Cribbs, L. L., Zainelli, G. M., Origitano, T. C., Singh, S. and Wurster, R. D. (2005). Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium* **37**, 105-119.
- Pardo, L. A. and Stühmer, W. (2008). Eag1 as a cancer target. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 837-843.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sánchez, A., Alves, F., Brüggemann, A., Beckh, S. and Stühmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J.* **18**, 5540-5547.
- Parihar, A. S., Coghlan, M. J., Gopalakrishnan, M. and Shieh, C. C. (2003). Effects of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *Eur. J. Pharmacol.* **471**, 157-164.
- Perez-Reyes, E. and Lory, P. (2006). Molecular biology of T-type calcium channels. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* **5**, 605-609.

- Prakriya, M. and Lingle, C. J.** (1999). BK channel activation by brief depolarizations requires Ca^{2+} influx through L- and Q-type Ca^{2+} channels in rat chromaffin cells. *J. Neurophysiol.* **81**, 2267-2278.
- Prevorskaya, N., Skryma, R. and Shuba, Y.** (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 609-618.
- Roger, S., Potier, M., Vandier, C., Le Guennec, J. Y. and Besson, P.** (2004). Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1667**, 190-199.
- Samaranayake, H., Saunders, J. C., Greene, M. I. and Navaratnam, D. S.** (2004). Ca^{2+} and K^{+} (BK) channels in chick hair cells are clustered and colocalized with apical-basal and tonotopic gradients. *J. Physiol.* **560**, 13-20.
- Sanchez, M. and McManus, O. B.** (1996). Paxilline inhibition of the alpha-subunit of the high-conductance calcium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* **35**, 963-968.
- Skryma, R. N., Prevorskaya, N. B., Dufy-Barbe, L., Odessa, M. F., Audin, J. and Dufy, B.** (1997). Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation. *Prostate* **33**, 112-122.
- Skryma, R., Van Coppenolle, F., Dufy-Barbe, L., Dufy, B. and Prevorskaya, N.** (1999). Characterization of Ca^{2+} -inhibited potassium channels in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Receptors Channels* **6**, 241-253.
- Spitzner, M., Ousingsawat, J., Scheidt, K., Kunzelmann, K. and Schreiber, R.** (2007). Voltage-gated K^{+} channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *FASEB J.* **21**, 35-44.
- Sun, X., Gu, X. Q. and Haddad, G. G.** (2003). Calcium influx via L- and N-type calcium channels activates a transient large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} current in mouse neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* **23**, 3639-3648.
- Swensen, A. M. and Bean, B. P.** (2003). Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons. *J. Neurosci.* **23**, 9650-9663.
- Taylor, J. T., Huang, L., Pottle, J. E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B. M., Agrawal, K. C., Hansen, J. B. and Li, M.** (2008). Selective blockade of T-type Ca^{2+} channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett.* **267**, 116-124.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L. et al.** (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca^{2+} entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res.* **66**, 2038-2047.
- Weaver, A. K., Liu, X. and Sontheimer, H.** (2004). Role for calcium-activated potassium channels (BK) in growth control of human malignant glioma cells. *J. Neurosci. Res.* **78**, 224-234.
- Wolfart, J. and Roeper, J.** (2002). Selective coupling of T-type calcium channels to SK potassium channels prevents intrinsic bursting in dopaminergic midbrain neurons. *J. Neurosci.* **22**, 3404-3413.
- Xie, X., Van Deusen, A. L., Vitko, I., Babu, D. A., Davies, L. A., Huynh, N., Cheng, H., Yang, N., Barrett, P. Q. and Perez-Reyes, E.** (2007). Validation of high throughput screening assays against three subtypes of Ca^{2+} T-type channels using molecular and pharmacologic approaches. *Assay Drug Dev. Technol.* **5**, 191-203.
- Yan, J. and Aldrich, R. W.** (2010). LRRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* **466**, 513-516.

Article 2

" $\alpha 2\delta 2$ subunits regulate prostate cell proliferation and cell secretion independently of Cav3.2 voltage-dependent calcium channels in prostate cancer cells"

Marine Warnier, Morad Roudbaraki, Sandra Derouiche, Alexandre Bokhobza, Philippe Delcourt, Natalia Prevarskaya, and Pascal Mariot.

Manuscrit soumis prochainement (attente du dépôt de brevet).

Les canaux calciques voltage-dépendants participent aux phénomènes d'invasion cellulaire, de migration, de différenciation ou encore de prolifération (Lory et al., 2006) (Huang et al., 2004). Une étude du laboratoire a montré que l'expression du canal calcique de type T, $Ca_v3.2$ est augmentée dans les cellules cancéreuses prostatiques ayant un phénotype plus agressif (Mariot et al., 2002). De plus, ce canal, exprimé par les cellules épithéliales des acini, intervient dans la sécrétion de PAP et de sérotonine (Gackiere et al., 2008). Cependant, la structure multimérique des canaux de type T reste peu connue à l'heure actuelle contrairement à celle des canaux à haut seuil. Il a été montré que ces derniers sont associés à des sous-unités accessoires de type $\alpha 2\delta$, β et γ , capables de moduler leur expression et leur activité. Ainsi, les sous-unités β jouent un rôle crucial dans l'adressage et dans la régulation de l'activité du canal auquel elles sont associées (Buraei and Yang, 2010). Enfin, plusieurs études ont montré que les sous-unités $\alpha 2\delta$ pouvaient augmenter l'amplitude du courant (Dolphin et al., 1999) (Gao et al., 2000) en jouant sur l'expression membranaire du canal calcique (Bernstein and Jones, 2007) (Canti et al., 2005).

Le but de cette étude a été de mettre en évidence l'expression de potentielles sous-unités accessoires des canaux de type T dans le tissu cancéreux prostatique. Ces sous-unités régulent-elles l'activité et/ou l'expression du canal de type T dans les cellules cancéreuses prostatiques ?

Nous montrons qu'en plus du canal $Ca_v3.2$, les cellules cancéreuses expriment des sous-unités accessoires, à savoir les sous-unités $\alpha 2\delta 2$, $\beta 4$ et $\gamma 4$. Celles-ci sont présentes dans le tissu prostatique aussi bien chez le rat que chez l'homme. Nous nous sommes focalisés sur la sous-unité $\alpha 2\delta 2$, et par une étude de coimmunoprécipitation nous mettons en évidence l'association du canal $Ca_v3.2$ et de la protéine $\alpha 2\delta 2$ au sein d'un même complexe. De plus, cette protéine

participe à l'homéostasie calcique. Ainsi, nous montrons que la concentration de calcium basale est augmentée dans les clones de surexpression LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ et qu'elle est réduite par la gabapentine, un ligand d' $\alpha 2\delta 2$. Cependant, $\alpha 2\delta 2$ n'a aucun effet sur le courant calcique $Ca_v 3.2$ endogène, suggérant que cette sous-unité régulerait l'homéostasie calcique par une voie indépendante de $Ca_v 3.2$. Néanmoins, la suppression d' $\alpha 2\delta 2$ diminue l'expression membranaire du canal de type T dans le clone LNCaP- $Ca_v 3.2$. Enfin, nous montrons que $Ca_v 3.2$ et $\alpha 2\delta 2$ participent à la prolifération des cellules LNCaP par des voies de signalisation différentes. En effet, la surexpression d' $\alpha 2\delta 2$ augmente l'activité NFAT et la sécrétion de VEGF, et diminue la sécrétion de PAP, alors que les effets opposés sont observés dans les clones LNCaP- $Ca_v 3.2$.

Cette étude a mis en évidence pour la première fois, l'expression des sous-unités accessoires $\alpha 2\delta 2$, $\beta 4$ et $\gamma 4$ dans le tissu prostatique. L'expression de ces sous-unités au niveau de la membrane plasmique suggère un rôle de protéine régulatrice du canal ou de récepteur. En effet, $\alpha 2\delta 2$ stimule la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP, *via* une voie indépendante de $Ca_v 3.2$.

$\alpha 2\delta 2$ subunits regulate prostate cell proliferation and cell secretion independently of Cav3.2 voltage-dependent calcium channels in prostate cancer cells

Marine Warnier, Morad Roudbaraki, Sandra Derouiche, Alexandre Bokhobza, Philippe Delcourt, Natalia Prevarskaya and Pascal Mariot

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

keywords:

Cav3.2, CACNA1H, T-type calcium channels, CACNA2D2, $\alpha 2\delta 2$, VEGF, prostatic acid phosphatase, prostate, proliferation, cancer cell growth.

Corresponding author:

Pascal Mariot, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Phone: (33) 03 20 33 63 13; Fax: (33) 03 20 43 40 66; E-mail: Pascal.Mariot@univ-lille1.fr

Abstract

We have in the present study studied the expression of different voltage-dependent calcium channel subunits in prostate cancer cells and prostate tissues. We show that, in addition to Cav3.2 channels previously shown to be expressed in prostate cells, putative regulatory subunits of voltage-dependent channels are present, namely $\gamma 4$, $\beta 4$ and $\alpha 2\delta 2$ subunits. We have focused our attention on $\alpha 2\delta 2$ subunits and we show that they participate to cytosolic calcium concentration homeostasis. We show that though they can associate with Cav3.2, silencing the expression of $\alpha 2\delta 2$ subunits does not reduce endogenous voltage-dependent T-type calcium currents but still reduces cytosolic free calcium concentration, showing that $\alpha 2\delta 2$ can regulate cytosolic calcium concentration independently of its association with Cav3.2 channels. In addition, $\alpha 2\delta 2$ overexpression stimulates while its silencing inhibits cell proliferation. We show that though Cav3.2 has a similar stimulating effect on cell proliferation, they both involve different signalling pathways since the calcineurin/NFAT pathway is involved in $\alpha 2\delta 2$ -mediated cell growth but not in Cav3.2 dependent cell proliferation. Finally, we demonstrate that $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 may generate opposite cell responses regarding PAP or VEGF secretion. These results demonstrate that $\alpha 2\delta 2$ may produce physiological responses in prostate cells independently of its calcium channel regulating activity.

Abbreviations

siRNA : Small Interfering RNA, FBS : Fetal Bovine Serum, HBSS : Hank's Balanced Salt Solution, PBS : Phosphate Buffer Solution, RMP : Resting Membrane Potential, HP : Holding Potential, PCa : prostate carcinoma

Introduction

Prostate cancer cells have been demonstrated to express a variety of ion channels participating in different aspects of cancer growth (1), (2). Among them, calcium channels constitute a large and heterogeneous family of transmembrane proteins allowing calcium entry into the cytoplasm, thereby participating in calcium homeostasis and in gene regulation (3). A number of calcium channels thus participate in cell proliferation, cell migration or invasion, angiogenesis and apoptosis. Transient Receptor Potential (TRP) channels are important players of calcium homeostasis in non excitable cells such as prostate cells which participate in cell growth (4) or cell migration (for review see (5)). Voltage-operated calcium channels have also been demonstrated to be involved in various stages of tumorigenesis of non-excitable cells. Low-Voltage Activated Calcium Channels have been demonstrated to be involved in cell proliferation of a variety of cells including breast, prostate, esophageal, glioma, melanoma and ovarian cells (6). In the prostate, we have shown that Low-Voltage Activated (LVA) T-type calcium channels are expressed in different cell lines (7) and tissues (8). Cav3.2 subunits are responsible for T-type calcium currents in prostate cancer cells and are overexpressed during the progression of cells towards more aggressive androgen-independent stages (7) participating in cell proliferation (9) and in the secretion of prostatic acid phosphatase (8).

Voltage-operated calcium channels (VOCC) are classified, based on their biophysical and pharmacological properties, as Low-Voltage Activated calcium channels (LVA or T-type calcium channels) and High-Voltage Activated calcium channels (HVA or L, N, P/Q, R- type calcium channels). On a molecular basis, ten different $\alpha 1$ pore subunits have been identified that possess voltage-dependent calcium channel properties (10): Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4 (L-type channels), Cav2.1 (P/Q-type), Cav2.2 (N-type), Cav2.3 (R-type), and Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3 (T-type channels). In addition, different families of accessory subunits ($\alpha 2\delta$, γ and β) have been described which can regulate calcium channel activity or trafficking. The HVA skeletal muscle calcium channel (DiHydroPyridine Receptor) has been described to be constituted by a complex formed by a Cav1.1 pore subunit and $\alpha 2\delta 1$, $\gamma 1$ and $\beta 1a$ regulatory subunits (11). In addition to L-type channels, N and P/Q channels have been shown to associate with regulatory subunits (11). LVA channels may be distinguished from High-Voltage Activated (HVA) calcium channels by the ability for $\alpha 1$ pore subunits to promote calcium influx without regulatory subunits. However, it was shown in various cells that T-type calcium channels (Cav3.x) associate with $\alpha 2\delta$. For example, Cav3.1 subunits interact with $\alpha 2\delta 1$ subunits in COS7 cells in which they were overexpressed (12). Similarly,

endogenous Cav3.2 associates with $\alpha 2\delta 1$ in bone osteocytes thereby allowing ATP release (13). Not only can VOCC associate with those regulatory subunits but also with other ion channels, receptors and enzymes. We have previously demonstrated recently using single-channel recording, confocal imaging and co-immunoprecipitation approaches, that Cav3.2 T-type channels and large conductance potassium channels BK channels are located in the same patches of membranes, forming functional complexes (9). We have shown that Cav3.2 channels can regulate cell proliferation through an association with BK potassium channels. Since voltage-dependent Cav3.2 Ca^{2+} channels have been shown to be expressed in LNCaP cells, we hypothesized that Cav3.2 channels might regulate cell proliferation through a close association with alleged regulatory subunits such as $\alpha 2\delta$, γ , or β subunits. In the present study, we therefore wished to assess whether Cav3.2 channels could also associate with putative $\alpha 2\delta$, γ , or β accessory subunits and whether this interaction could regulate cell proliferation. We show in this article that prostate epithelial cells express mainly $\alpha 2\delta 2$, $\gamma 4$ and $\beta 4$ subunits together with Cav3.2 T-type calcium channels. These subunits are expressed in prostate cancer cell lines and in rat and human prostate luminal cells. In rat and human prostate tissues, the expression is greater on the apical side of the luminal cells. Confocal microscopy and coimmunoprecipitation studies show that Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ are colocalized in the same cell areas and form functional complexes participating in voltage-dependent calcium influx in LNCaP cells overexpressing Cav3.2 channels. Indeed, cytosolic calcium levels are reduced by gabapentin, a known ligand of $\alpha 2\delta$ subunits (14) and by siRNA targeting $\alpha 2\delta 2$. In addition, we show that silencing $\alpha 2\delta 2$ reduced the expression of Cav3.2 at the plasma membrane in LNCaP cells overexpressing Cav3.2. However, we show that though silencing $\alpha 2\delta 2$ reduced cytosolic calcium concentration in LNCaP cells, this did not inhibit endogenous T-type calcium currents suggesting that $\alpha 2\delta 2$ may regulate calcium homeostasis in a different way. Finally, we show that the inhibition of $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 similarly reduced cell proliferation but that this inhibition did not rely on mandatory common signalling pathways. In addition, we demonstrate that $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 regulate VEGF and PAP secretion and NFAT activities in opposite ways, suggesting that $\alpha 2\delta 2$ may regulate cell proliferation and secretion in a T-type calcium-channel independent manner.

Materials and Methods

Cell culture and treatments

LNCaP, DU145 and PC3 prostate cancer cells were purchased from the American Type Culture Collection and grown as recommended in RPMI 1640 (Gibco, Life Technology, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France), and 2 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Cells were routinely grown in 75 cm² flasks (Nunc, Poly-Labo, France) in a humidified atmosphere at 37°C (95 % air - 5 % CO₂). For electrophysiological and imaging studies, cells were detached from their support using trypsin-EDTA for two minutes, centrifuged and sub-cultured in Petri dishes (Nunc) and on glass coverslips for imaging studies only. The culture medium was then changed every three days. Stable cell lines expressing Cav3.2 (α_{1H}) channel (LNCaP-Cav3.2), GFP protein (LNCaP-GFP), $\alpha 2\delta 2$ protein (LNCaP- $\alpha 2\delta 2$) or α_{1H} -GFP fusion protein (LNCaP-Cav3.2-GFP) were designed as previously reported (8).

Fluorescence imaging

Fluorescence imaging was carried out in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) containing 142 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM or 10 mM CaCl₂, 10 mM HEPES and 5.6 mM glucose. The osmolarity and pH of external solutions were adjusted to 310 mOsm.l⁻¹ and 7.4, respectively. Cytosolic Ca²⁺ concentration was measured using Fura2-loaded cells (2 μ M) as described elsewhere (15). Intracellular Ca²⁺ concentration was expressed as the ratio of the fluorescence intensities for each of the excitation wavelengths (F340/F380) or its calibrated value in nM. The cells were continuously perfused with the HBSS solution and chemicals were added *via* a perfusion system.

Electrophysiological recordings

Whole-cell patch-clamp recordings (16) were performed using a RK-300 patch-clamp amplifier (Biologic, Grenoble, France) as previously described (8). Whole-cell membrane currents were measured in the voltage-clamp mode after the previous cancelation of series resistance (Rs value was usually 5 MOhm when breaking into whole-cell configuration and kept stable for the first 10 minutes of each experiment). Unless otherwise specified, the bath medium used for whole-cell experiments was HBSS supplemented with 10 mM TEA. For whole-cell experiments, the recording pipettes were filled with a solution containing 130 mM NMG-Gluconate, 10 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, with 10 mM EGTA. Osmolarity and pH were adjusted to 290 mOsm.l⁻¹ and 7.2, respectively. Junction potential

was cancelled when the patch-pipette was dipped in the bath solution (standard HBSS containing 5 mM K⁺ and 145 mM Na⁺) close to the cell before sealing the cell membrane. Using JPCalc software we calculated that the greatest variation in liquid junction potential that could occur in our experiments (when bath medium was changed from 145 mM Na⁺ and 5 mM K⁺ to 0 mM Na⁺ and 150 mM K⁺) was -3.7 mV.

siRNAs design and cell transfection

Small interfering RNAs against the human coding sequence of Cav3.2 (α_{1H}) channels (Genebank accession # NM-021098.2) were designed to knock down the expression of T-type α_{1H} Ca²⁺ channels. We have previously validated these siRNAs in LNCaP cells (8). Small interfering RNAs (Eurogentech, France) against the human coding sequence of $\alpha 2\delta 2$ (Genebank accession # NM_001174051) were designed and referred to as si $\alpha 2\delta 2$. The siRNAs used in this study included a non-specific control siRNA (siCtl) with at least 4 mismatches to any human genes. Sense sequences of siRNAs were 5'-UAGCGACUAAACACAUCAA-3' (si-Ctl), 5'-ACGUGAGCAUGCUGGUAAUdTdT-3' (siCav3.2, position 311-329 from ATG), and 5'-GACCAACGUUCUGAUCUGCdTdT-3' (si $\alpha 2\delta 2$). All siRNAs were purchased from Dharmacon (France).

LNCaP-CTL, LNCaP-Cav3.2 and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells were transfected with either 50 nM siRNA using HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) as described previously (8). The efficiency of the siRNA is validated by RT-PCR and by western blot analysis.

Analysis of channel gene expression (RT-PCR)

RNA extraction was carried out using Trizol® using the method originally described by Chomczynski et Sacchi (17). RT-PCR was carried out as previously described (8) using the primers described in (18) for CACNG subunits and as described in the table 1 for CACNA2D subunits.

Protein	Gene	Forward Sequences (5'-3')	Reverse Sequences (5'-3')	Size (bp)	Accession number
$\alpha 2\delta 1$	CACNA2D1	TGCAAGAAGACCTTGTCACA	ACACAATTGTTGAGCCCTCA	400	GI 179761
$\alpha 2\delta 2$	CACNA2D2	GATGCGGAGCTAGAGGATGA	GCTGTACGTGTTGAGATGCT	505	BC 152438
$\alpha 2\delta 3$	CACNA2D3	CCATGGAGGTGAAGAAGACA	TTGTCACCAGCTTTCAGGAA	500 439	NM_018398
β actine		CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGAT	220	NM_001101

Table 1: Expected size of the amplicon is indicated in bp. For some primers, several sizes might be observed according to the expressed splice variant.

Western blotting and co-immunoprecipitation

After being washed in phosphate buffered saline (PBS), cells were collected by scraping in a lysis buffer (Triton X-100 1%, Na deoxycholate 1%, NaCl 150 mM, PO₄NaK 10mM, pH 7,2) with an anti-protease cocktail and incubated on ice for 45 min. The lysates were centrifuged at 12000 G for 10 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by BCA assay (Pierce Chemical Company). For co-immunoprecipitation, a mixture containing protein A/G PLUS agarose beads (Santa Cruz, Biotechnology) and 1 µg anti- $\alpha 2\delta 2$ (or anti- α_{1H}) antibody was incubated under rotation for 1h at 4°C. An equal amount of cell extract (500 µg) and protease inhibitor were added to the total volume and incubated under rotation overnight at 4°C. After washing, the beads-antibody-proteins complex was re-suspended in SDS sample buffer for 30 min at 37°C. The immune complexes were separated by electrophoresis on 6 or 8% SDS/PAGE gels. Western-blot analysis of protein expression was designed as described elsewhere (8) using the same primary antibodies as in immunoprecipitation: anti- α_{1H} polyclonal antibody and anti- $\alpha 2\delta 2$ polyclonal antibody.

Fifty micrograms of each sample were analysed by SDS-PAGE on either 6%, 8% or 12 % acrylamide and processed for western-blotting using Western-blot analysis of protein expression was designed as described elsewhere (8) using primary antibodies in the table below.

Antibody	Name	Company	Dilution In WB	Dilution in IF/IH	Secondary antibody	MW (kDa)
$\alpha 2\delta 2$	H210	Santa Cruz	1/200	1/100 ^e or 1/50 ^e	Rabbit	130
$\alpha 2\delta 2$	A01	Abnova	/	1/50 ^e	Mouse	130
$\beta 4$	$\beta 4$	Abcam	1/200	1/50	Mouse	58
$\gamma 4$	$\gamma 4$	Abcam	1/200	1/50	Rabbit	36
Cav3.2	H300	Santa Cruz	1/200	1/50	Rabbit	250
β -actin	A-5441	Sigma	1/4000	/	Mouse	43
Calnexin	mab 3126	Millipore	1/2000	/	Mouse	95
VEGF	Ab46154	Abcam	1/200	1/50	Rabbit	43
Androgen receptor	AR	Santa Cruz	1/500		Rabbit	110

Table 2: Antibodies used in western blotting, immunohistochemical and immunofluorescence experiments.

VEGF and Prostatic Acid Phosphatase Secretion assays

Secretion of VEGF was measured in vitro using an ELISA approach as described by the manufacturer (Abcam, Paris, France). After seeding, cells were cultured in 12 well plates for three days before culture medium was changed. VEGF was then assayed in the culture medium after 24 hours incubation (3 wells per condition, the experiment was repeated at least three times). For the PAP assay, we used a Sigma colorimetric procedure in which *p*-nitrophenol phosphate was used as the substrate to quantify the acid phosphatase activity at pH4.8 by measuring the absorbance of released *p*-nitrophenol at 405 nm (8).

Viability Test

Cell viability was assessed by a colorimetric method (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. Cell proliferation was also assessed by manual counting of cells extruding Trypan Blue. Ki-67 staining was also used to discriminate cells in quiescence (G0 phase) and cycling cells. Cells were grown on 24 well plates. Each mean represents the averaged value of 6-12 different measurements. Each experiment is representative of at least three independent experiments.

Cell Cycle Analysis

For each condition, cells were grown in three 60-mm dishes and each measurement was done in duplicate. Drugs or siRNAs were applied as described above. After treatments, cells were trypsinized, harvested and resuspended in 0.2 ml sterile PBS. 1 ml of cold 70% ethanol was added to cell suspensions while vortexing. Samples were centrifuged, washed in sterile PBS and then incubated with ribonuclease (2 µg/ml) for 15 min at room temperature. Propidium iodide (25 µg/ml final in PBS-triton X-100 0.1%) was then added and allowed to incubate for an additional 30 min at room temperature. DNA content was measured by exciting propidium iodide at 488 nm and measuring the emission at 520 nm, using a flow cytometer (Beckman coulter Epics XL4-MCL with Expo32 acquisition). Data analysis was carried out using Multicycle for Windows (Phoenix Flow system). Each experiment is representative of at least three independent experiments.

Immunostaining and confocal analysis

The protein expression studies in prostate cancer (PCA) cells and tissues were carried out using indirect immunofluorescence analysis on acetone fixed cells and formalin-fixed paraffin embedded tissues. Human and rat tissues were studied using immunohistochemical procedures. Slides of tissues were microwaved for 20 min, and washed three times in 10 mM

citrate buffer (pH 6.0). To inhibit nonspecific binding of antibodies and permeabilize the cells, slides were incubated with PBS containing 0.2% BSA, 0.1% TritonX-100 and 5% donkey serum, for 30 min at room temperature. They were then incubated overnight at 4°C with PBS/5% non-immunized serum containing the relevant primary antibody (see dilutions in table).

For immunofluorescence studies, cells were incubated with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (A-21206; Molecular Probes; dilution 1:2000) diluted in PBS for 1 h at room temperature. After rinsing three times in PBS, the slides were mounted with Mowiol. For immunohistochemical studies, Horse Radish Peroxidase-DAB detection method was used (dilution of secondary antibody 1/100). Endogenous peroxidase activity was inhibited using 0.3% H₂O₂ before microwaving the slides. Azure B was used to counterstain the slides of tissues.

Immunostaining and confocal observations were carried out as previously described (8), using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) connected to a Zeiss Axiovert 200 M with an x63 oil-immersion objective lens (numerical aperture 1.4). Anti-Ki-67 antibody was used to evaluate the percentage of proliferating cells (1/100, rabbit, Abcam). At least 500 cells per slide and three slides per condition were double-blind counted. Colocalization of BK channels and Cav3.2 channels was studied using both anti- α_{1H} polyclonal antibody (1/200, rabbit, Santa Cruz) and anti-BK polyclonal antibody (1/500, rabbit, Alomone).

NFAT assay

Cells are seeded in 60 mm dishes and are transfected with a NFAT-Luciferase plasmid or with Luciferase only (1 μ g of plasmid per dish). Cells were rinsed the day after. Cells are lysed and proteins are extracted using the Luciferase Assay System Kit (Promega). NFAT-luciferase activity is then measured according to the manufacturer's protocol. NFAT activity is normalized to the number of cells measured using the MTS/PMS assay.

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma, except for Fura2-AM, which was bought from Calbiochem (France Biochem, Meudon, France).

Statistical analysis

Each average current/voltage relationship shown in this article corresponds to the mean of at least 10 cells and is representative of at least 3 independent experiments. Plots were produced

using Origin 7.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean \pm sem. Statistical analyses were performed using unpaired t-tests (for comparing two groups) or ANOVA tests, followed by either Dunnett (for multiple control *vs* test comparisons) or Student-Newman-Keuls (for multiple comparisons) post-tests. Contingency tables were analyzed using Fisher's test. Differences were considered significant with $p < 0.05$: * , $p < 0.01$: ** , $p < 0.001$: ***.

Results

Expression of calcium channel subunits in prostate cells and tissues

We have previously shown that Cav3.2 calcium channels subunits are expressed in prostate LNCaP cells (7) and in prostate tissues (8). Since the expression and activity of voltage-dependent calcium channels may be regulated by accessory subunits as shown by others (11, 19), we have investigated whether such subunits may be expressed in prostate cancer cells. Gamma subunits ($\gamma 1$ to $\gamma 8$) and $\alpha 2\delta$ ($\alpha 2\delta 1$ to $\alpha 2\delta 3$) were screened by RT-PCR in prostate LNCaP cells. As shown on Figure 1, $\gamma 4$ and $\alpha 2\delta 2$ are the main subunit transcripts expressed in LNCaP cells. In addition, we show (Figure 1C) that transcripts of $\alpha 2\delta 2$ subunits are expressed in other prostate cancer cell lines which represent more aggressive androgeno-independent stages of prostate cancers (PC3 and DU145 cells). The expression of protein subunits in prostate cell lines was thus investigated by western-blot and immunofluorescence. As illustrated Figure 1D, $\gamma 4$ and $\alpha 2\delta 2$ protein subunits are expressed in LNCaP cells. In addition, we show that another putative partner of T-type calcium channels, the $\beta 4$ subunit is expressed in LNCaP cells (Figure 1D). Furthermore, immunostaining experiments show that the $\alpha 2\delta 2$ protein subunits are present in LNCaP, PC3 and DU145 prostate cells (Figure 1E). The $\alpha 2\delta 2$ immunostaining was particularly pronounced at the cell periphery in each prostate cancer cell line, suggesting a stronger expression in plasmalemmal compartments. A similar pattern of expression at the plasma membrane was observed for $\beta 4$ and $\gamma 4$ subunits in LNCaP cells (Figure 1E).

Immunostaining was therefore carried out on human prostate cancer and rat ventral prostate tissues to assess whether these subunits are expressed *in situ*. As shown on Figure 2, we found a pattern of expression for Cav3.2, $\gamma 4$, $\beta 4$ and $\alpha 2\delta 2$ subunits in rat (Figure 2A) and human cancer tissues (Figure 2B), similarly to that observed in cancer cell lines. The expression of $\gamma 4$, $\beta 4$ and $\alpha 2\delta 2$ subunits was particularly intense in epithelial cells in acini of both rat and human prostate tissues whereas no specific immunostaining could be observed in stromal

tissue. Immunohistochemical and immunofluorescence experiments demonstrate that the expression was stronger on the apical side of luminal cells.

Association of $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 subunits

We then focused our attention on the role of $\alpha 2\delta 2$ subunits since the gene (CACNA2D2) coding for this protein has been proposed as a tumor suppressor gene. We first evaluated whether $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 subunits could associate in functional complexes and could modulate the properties of T-type calcium channels. We first carried out immunofluorescence experiments in confocal microscopy in both wild-type LNCaP cells (LNCaP-ctl) and LNCaP-cells overexpressing Cav3.2 (LNCaP-Cav3.2). As shown on Figure 3A, we show that in LNCaP-Cav3.2 cells, there is an overlap of both Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ fluorescence. This is confirmed by a significant Pearson's coefficient (0.81) between both channels as opposed to the one obtained for the correlation between DAPI and $\alpha 2\delta 2$ channels (0.13). In LNCaP-ctl cells, the fluorescence of Cav3.2 channel was much less pronounced as expected from the weak endogenous expression of Cav3.2 channels in LNCaP-ctl cells (7). As illustrated by the Figure 3B, there is still no partial costaining of Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ channels in LNCaP-ct cells. We can observe that both channel subunits are also expressed in separate cell area. However, the Cav3.2 immunostaining is probably too weak to detect significant signals. In addition, we carried out co-immunoprecipitation experiments in both LNCaP-Cav3.2 and LNCaP-ctl cells. First, as shown on the supplemental figure S1, the $\alpha 2\delta 2$ antibody (H210) used for coimmunoprecipitation recognises a specific band at 160 kD. In addition, as demonstrated on Figure 3C, each channel subunit can immunoprecipitate the other one, suggesting that they can form protein complexes.

Role of $\alpha 2\delta 2$ in calcium homeostasis

In order to decipher the implication of $\alpha 2\delta 2$ in cell proliferation, we studied whether $\alpha 2\delta 2$ alone or in association with Cav3.2 channels could regulate calcium homeostasis. We have previously shown that Cav3.2 channels are responsible for basal calcium entry even without action potential activity (7). However, this calcium entry through Cav3.2 channels leads to only slight increases in basal cytosolic calcium level in LNCaP cells. Indeed, when inhibiting Cav3.2 channels using NiCl₂ (20 μ M), a 5 nM decrease was observed in the basal cytosolic calcium concentration (7). Similarly, we have assessed the potency of endogenous $\alpha 2\delta 2$ to promote calcium entry. Inhibiting $\alpha 2\delta 2$ using siRNA did not significantly alter cytosolic calcium levels (53.1 \pm 0.8 nM, n=32 for sictl vs 54.3 \pm 1.1 nM, n=38, for si $\alpha 2\delta 2$ treated cells). As shown on supplemental Figure S1B, a treatment of 4 days using si $\alpha 2\delta 2$ (50 nM) reduced

the expression of $\alpha 2\delta 2$ proteins, such that no specific band could be observed at a size of 160 kD on western-blot. However, since basal cytosolic calcium level is maintained at low levels with a redundancy of mechanisms, this does not mean that $\alpha 2\delta 2$ does not participate in calcium homeostasis. We have thus assessed whether the $\alpha 2\delta 2$ may regulate calcium homeostasis in conditions of increased expression of Cav3.2 channels. The overexpression of Cav3.2 channels in LNCaP cells, as reported in one of our previous study (8), leads to increased cytosolic calcium levels. In addition, we have observed that Cav3.2-overexpressing LNCaP cells can seldom (in less than 5 % of cells) generate large and irregular calcium oscillations in 2 mM extracellular calcium concentration. The percentage of cells displaying such calcium oscillations was increased to 70% when the extracellular calcium concentration was raised up to 10 mM (Figure 4A and 4C). In these conditions, these calcium oscillations display a regular pattern with a frequency of 5.6 ± 0.5 oscillations/min (n=95) and a mean amplitude of 207 ± 12 nM. These calcium oscillations are completely inhibited by NiCl₂ (20 μ M-Figure 4B), flunarizine (10 μ M) or siCav3.2 (50 nM) (not shown) showing that they are generated by Cav3.2 channels. We have observed in our experiments that the proportion of cells displaying calcium oscillations is decreased down to 32% by si $\alpha 2\delta 2$ (50 nM for 3 days-Figure 4C). Furthermore, whereas the frequency of calcium oscillations was not modified, the amplitude of these calcium oscillations was significantly reduced by si $\alpha 2\delta 2$ down to 150 ± 8 nM (n=78-Figure 4D). In addition, gabapentin (100 μ M, Figure 4B and 4C) induced a moderate decrease in the intracellular calcium concentration in cells untreated with si $\alpha 2\delta 2$. This suggests that $\alpha 2\delta 2$ may positively regulate the activity of overexpressed Cav3.2 channels and by this means enhances calcium entry.

In addition, we have investigated whether the overexpression of $\alpha 2\delta 2$ may enhance by itself the basal calcium levels, in other words in conditions of low endogenous expression of Cav3.2 channels. Basal calcium concentration was measured in $\alpha 2\delta 2$ -overexpressing LNCaP cells (LNCaP- $\alpha 2\delta 2$). Using Fura2 calcium imaging, we show that the cytosolic free calcium concentration (ratio F340/F380) is slightly increased in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells compared to LNCaP-ctl cells in either 2 mM or 10 mM extracellular calcium concentration (Figure 4E). Furthermore, in order to assay whether calcium homeostasis, and internal calcium store capacity, was altered in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells, we challenged the cells with ionomycin (1 μ M), a Ca²⁺ ionophore which can induce calcium mobilization from internal endoplasmic reticulum stores and thapsigargin (0.5 μ M), an endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase inhibitor. Our results show that both ionomycin and TG led to slightly stronger calcium releases in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$

cells than in LNCaP-ctl cells showing that the overexpression of $\alpha 2\delta 2$ alters calcium homeostasis in LNCaP cells (Figure 4F and 4G).

We thus carried out patch-clamp recording studies to assess whether $\alpha 2\delta 2$ subunit could regulate voltage-dependent T-type calcium currents. We have investigated the influence of siRNA targeting $\alpha 2\delta 2$ in LNCaP-Cav3.2 cells and in LNCaP-ctl cells. As shown on Figure 5A, we demonstrate that si $\alpha 2\delta 2$ significantly reduce T-type calcium channels in LNCaP-Cav3.2 cells as compared to siCtl (ICa at -30 mV = -16.9 ± 1.3 pA/pF, n=63 and -10.9 ± 1.1 , n=65 for siCtl and si $\alpha 2\delta 2$, respectively). However, si $\alpha 2\delta 2$ only reduced T-type calcium channels amplitude without altering their activation or inactivation properties (Figure 5B), thereby probably inducing a reduction of Cav3.2 channel expression at the plasma membrane without altering their biophysical properties. In addition, coexpression of $\alpha 2\delta 2$ with Cav3.2 led to larger T-type calcium currents as shown on Figure 5C (ICa at -30 mV = -27.9 ± 4.7 pA/pF, n=10 and -43.7 ± 7.8 , n=10 for LNCaP-Cav3.2 and LNCaP-Cav3.2- $\alpha 2\delta 2$, respectively). Similarly, activation and inactivation properties of Cav3.2 calcium currents were not significantly altered by coexpressing $\alpha 2\delta 2$ (not shown). In order to investigate the role of $\alpha 2\delta 2$ subunits in T-type calcium currents, we used gabapentin which is known to inhibit various voltage-dependent calcium channels through its action on $\alpha 2\delta$ regulatory subunit (14). As shown on Figures 5D, we observed that gabapentin (100 μ M) rapidly and reversibly decreased T-type calcium currents in LNCaP-Cav3.2 cells (n=5) by 16 ± 5 %. On their part, endogenous T-type calcium currents in LNCaP-ctl cells, which only express Cav3.2 channels as previously described (7), have been recorded after pretreating the cells for several days with dibutyryl cyclic AMP (1 mM) and IBMX (isobutyl methyl xanthine, 100 μ M) in order to enhance the expression of Cav3.2 channels (7) As shown on Figure 5E, T-type calcium currents are not inhibited by si $\alpha 2\delta 2$ (peak ICa = -0.61 ± 0.07 pA/pF, n=27 and -0.69 ± 0.206 , n=32 for siCtl and si $\alpha 2\delta 2$, respectively). In addition, overexpressing $\alpha 2\delta 2$ alone did not modify (Figure 5F) the amplitude of T-type calcium currents in LNCaP (peak ICa = -0.75 ± 0.09 pA/pF, n=11 and -0.7 ± 0.11 , n=12 for LNCaP-ctl and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$, respectively). This shows that endogenous Cav3.2 dependent T-type calcium activity may not depend on $\alpha 2\delta 2$ subunits in LNCaP cells. Using confocal microscopy, we have investigated whether the expression of Cav3.2 at the plasma membrane could be altered by knocking down the expression of $\alpha 2\delta 2$ using si $\alpha 2\delta 2$. The presence of Cav3.2 channels was followed in LNCaP cells using the GFP reporter. As illustrated by Figure 6 (left panel), GFP fluorescence is particularly strong at the plasma membrane when LNCaP-Cav3.2-GFP are pretreated with siCtl for three days. On the opposite, a treatment with si $\alpha 2\delta 2$ diminishes the GFP

fluorescence at the cell periphery, close to the plasma membrane. Similarly, immunofluorescence experiments carried out on fixed LNCaP-Cav3.2 cells show that Cav3.2 channels are located in the cell periphery and that their density in that cell compartment decreases after a treatment with si α 2 δ 2 (Figure 6, right panel).

Functional roles of α 2 δ 2 and cav3.2 subunits in cell proliferation

We have investigated the role of both α 2 δ 2 and Cav3.2 subunits in cell proliferation using different approaches, manual cell count and MTS assay. As shown on Figure 7, a 4 day treatment with si α 2 δ 2 or siCav3.2 similarly reduced LNCaP cell proliferation. Similar results were obtained whatever the nature of the assay (manual cell counting: Figure 7A, MTS: Figure 7B). Furthermore, no additive action of si α 2 δ 2 or siCav3.2 was observed. Similar experiments were conducted on prostate cancer cells expressing transcripts for Cav3.2 but undetectable levels of functional T-type calcium currents, i.e. DU145 and PC3 cells. As shown on Figure 7C, si α 2 δ 2 reduced cell proliferation in both DU145 and PC3 with a stronger potency in PC3 cells than in DU145 cells ($20 \pm 2.3\%$ inhibition in PC3 cells vs 8.2 ± 2.3 in DU145 cells). It therefore seems that the proliferation inhibition exerted by knocking-down the expression of α 2 δ 2 does not depend on Cav3.2 functionality. The effect of Cav3.2 and α 2 δ 2 overexpression on cell proliferation was also investigated. As shown on Figure 7D, the overexpression of both channel subunits leads to a stimulation of cell proliferation as measured by MTS assay. In addition, as for siRNA experiments, no additive effect of overexpression was observed. This may indicate that both protein subunits are involved in a common transduction pathway leading to cell proliferation.

α 2 δ 2-dependent proliferation involves NFAT pathway

Since calcium homeostasis is altered by α 2 δ 2 and Cav3.2, we investigated whether NFAT-calcineurin pathway could be involved in α 2 δ 2 and Cav3.2 signaling. First, we show that NFAT activity was increased in LNCaP cells overexpressing α 2 δ 2 compared to control LNCaP cells (Figure 7E). Surprisingly, whereas the overexpression of Cav3.2 leads to higher resting cytosolic calcium levels, NFAT activity was not increased but even slightly reduced. Co-overexpression of α 2 δ 2 and Cav3.2 led to basal (similar to control cells) NFAT activity, as if each subunit oppositely regulated NFAT. In order to evaluate the role of calcineurin/NFAT pathway in cell proliferation, we have used two different inhibitors of calcineurin (cyclosporin A and FK506). LNCaP cell proliferation was indeed reduced by both inhibitors of calcineurin. Reduction of cell proliferation by these inhibitors of calcineurin was more pronounced in LNCaP- α 2 δ 2 cells than in control LNCaP cells (Figure 7F).

Functional roles of $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 subunits in PAP secretion, VEGF release, and androgen-receptor expression

LNCaP cells are known to secrete a variety of growth factors, among which VEGF. We have thus studied the secretion of VEGF by LNCaP cells using an ELISA assay. We show that VEGF secretion is enhanced by $\alpha 2\delta 2$ and reduced by Cav3.2 overexpression (Figure 8A). On the contrary to $\alpha 2\delta 2$ -dependent proliferation, $\alpha 2\delta 2$ -dependent VEGF secretion was not inhibited by cyclosporin A, an NFAT inhibitor (Figure 8B). VEGF secretion was shown to be calcium-dependent since it was stimulated by ionomycin (1 μ M-Figure 8C). LNCaP cells synthesize and secrete prostatic acid phosphatase (PAP) in the culture medium. We have shown in a previous study that the overexpression of Cav3.2 increases PAP synthesis and its release in the extracellular medium probably through a stimulation of Ca-dependent secretion. As shown here, PAP release is enhanced in prostate LNCaP cells but not in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells by increasing cytosolic calcium concentration using ionomycin (Figure 8D). In addition, NFAT inhibition by CsA abolished ionomycin-dependent PAP secretion. We have compared the ability of both Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ to modulate PAP release. Both basal and ionomycin-dependent PAP secretions were reduced in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells *versus* LNCaP-ctl cells (Figure 8D and 8E). Furthermore, while reduced in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells, ionomycin-dependent PAP secretion was increased in Cav3.2-overexpressing cells (Figure 8E). Since LNCaP cells are known to be androgen-dependent cells, we have investigated whether the expression of Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ could regulate androgen receptor expression. We show that androgen receptor expression was increased only in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells and not in LNCaP-Cav3.2 cells (Figure 8F).

Discussion

Voltage-dependent calcium channels have been shown to be expressed in prostate cancer cell lines and prostate tissues. Whereas HVA calcium channels have been characterized in neuroendocrine cells of the rat ventral lobe (20), we have previously demonstrated that LVA Cav3.2 channels are expressed in human prostate cancer LNCaP cells and are overexpressed during neuroendocrine differentiation (7). We have previously shown that this Cav3.2 pore subunit was responsible for the stimulation of calcium-dependent secretion of PAP (8) and participate in the regulation of cell proliferation together with BK potassium channels (9). Cav3.2 calcium channels have therefore been shown in different cellular systems to promote cell proliferation and/or tumorigenesis (for review see (6)). We have thus initiated this study

in order to characterize other calcium channels subunits which could belong to the channel heteromultimeric complex.

RT-PCR and western-blot experiments show that the three most abundant calcium channel subunits in prostate tissues, rat or human, are $\beta 4$, $\gamma 4$ and $\alpha 2\delta 2$ subunits. These proteins are coded respectively by *CACNB4*, *CACNG4* and *CACNA2D2* genes. The $\beta 4$ subunit is a member of β accessory subunits which are cytoplasmic proteins shown to interact with a high affinity with a conserved 18 amino-acids conserved motif (called AID for alpha-interaction domain) within intracellular loops of voltage-dependent Cav1.x and Cav2.x channels (21). Through this association, β subunits regulate plasma membrane targeting and gating of calcium channels (22). The AID in Cav3.x channels is less conserved and shows important differences from that of HVA channels. Still, it has been shown that AID peptides of Cav3.x can interact with β subunits with a low affinity (Kd around 3 μ M against 20 to 60 nM for AID peptides from Cav2.x channels). Particularly, it was demonstrated a low affinity interaction between Cav3.3 and $\beta 4$ subunits (23). In addition, other AID-independent interactions mechanisms have been proposed for β binding with $\alpha 1$ subunits (22). Furthermore, β subunits can interact with other plasma membrane protein partners and thus can produce physiological effects independent on voltage-dependent calcium channels. $\beta 1$ subunits have been shown to interact with and to inhibit BK channels (24). β subunits can also interact with nuclear proteins and could therefore regulate gene expression. For example, it was shown that $\beta 3$ can directly interact with an isoform of Pax6 (25), a transcription factor important for the development of the nervous system. $\beta 4$ binds to Ppp2r5d, a nuclear regulatory subunit of phosphatase 2A (PP2A), thereby regulating transcriptional regulation upon stimulation of electrical activity (26). Similarly, we have observed that $\gamma 4$ subunits are expressed in rat and human epithelial cells. Though initially shown as accessory subunits of voltage-dependent calcium channels, γ subunits, and notably $\gamma 4$, have also been shown to mainly regulate AMPA receptor and are thus called transmembrane AMPA receptors regulatory proteins (TARPs) (27). $\gamma 4$ subunits have been shown to facilitate cancer progression since *CACNG4* is involved in resistance to chemotherapy gliomas (*CACNG4*, (28)). So far, we do not know the role of these two $\beta 4$ and $\gamma 4$ subunits in prostate epithelial cells where they are expressed. We will investigate their possible interaction with previously demonstrated complex formed by Cav3.2 and BK channels.

$\alpha 2\delta 2$ proteins have been shown, like other accessory subunits, to interact with and regulate $\alpha 1$ pore subunits. It has been demonstrated in overexpression studies that T-type calcium channel activity may be dependent on the coexpression of $\alpha 2\delta$ and Cav3.1 subunits (12, 29). In these

studies, T-type calcium channel activity carried by Cav3.1 was increased by the coexpression of $\alpha 2\delta 1$ or $\alpha 2\delta 2$ subunits. In addition, it was shown in osteocytes that $\alpha 2\delta 1$ subunit can associate with Cav3.2 channel and increase its membrane expression thereby enhancing voltage-dependent calcium currents and promoting ATP release (13). Our results show that in LNCaP overexpressing Cav3.2, there is a detectable colocalization of both Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ in confocal fluorescence imaging. In addition, coimmunoprecipitation experiments show that both proteins can be part of a common complex. Similar experiments were carried out on endogenous Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ channels in LNCaP cells. Though colocalization could be observed, endogenous $\alpha 2\delta 2$ fluorescence was stronger than Cav3.2 and often localized in different cell areas. Coimmunoprecipitation was still detectable in endogenously expressed channels. Therefore, we suggest that due to low levels of expression of Cav3.2 in LNCaP cells, a high proportion of $\alpha 2\delta 2$ is not endogenously associated with Cav3.2 channel. Therefore, when the expression of Cav3.2 is increased, the proportion of $\alpha 2\delta 2$ associated with Cav3.2 mechanically increases.

CACNAD2 gene has been previously shown to be potentially involved in tumorigenesis. Indeed, this gene is located in a cluster of genes which is frequently deleted hypermethylated in different forms of cancer such as lung, kidney or breast cancers (30) (31). In addition, exogenous re-expression of CACNA2D2 in non-small cell lung carcinoma cells promotes cytosolic calcium elevation, inhibition of cell growth and stimulates apoptosis through mitochondrial depolarization (32). Our results show that CACNA2D2 may behave not as a tumor suppressor gene but as an oncogene. This seems to occur independently of calcium channel activity since the overexpression of $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 involve different signaling pathways. Indeed, whereas the $\alpha 2\delta 2$ subunit increases NFAT activity, Cav3.2 channels inhibit the NFAT pathway. In addition, the activation of the calcineurin/NFAT pathway by $\alpha 2\delta 2$ promotes cell proliferation since we show that blocking this pathway antagonizes the $\alpha 2\delta 2$ -dependent proliferation. The inhibition of the NFAT pathway by Cav3.2 observed in our study is in agreement with a recent work that demonstrates that binding of calcineurin on Cav3.2 channels inhibits Cav3.2 channels' activity and reduces NFAT activity (33). In addition, though both subunits participate in calcium homeostasis and promote calcium increases in the cytosol, they mediate opposite physiological responses. Indeed, whereas Cav3.2 overexpression promotes PAP secretion, it inhibits VEGF release. On the opposite, while $\alpha 2\delta 2$ stimulates VEGF release, it reduces PAP secretion. In addition, $\alpha 2\delta 2$, but not Cav3.2, overexpression leads to an increased expression of androgen receptor. This suggests that though $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 may associate at least to a certain extent in cell membranes, both

channels subunits do not require a physical association to promote their physiological effect. A substantial proportion of free $\alpha 2\delta 2$ subunits may therefore generate physiological effects which are independent of voltage-dependent calcium channels. Various interacting domains have been demonstrated in $\alpha 2\delta 2$ which suggest that $\alpha 2\delta 2$ may interact with proteins other than calcium channels. Indeed, $\alpha 2\delta 2$ present a large C-terminal sequence that protrudes in the extracellular environment which could serve, not only to interact with pore subunits but with other proteins. This extracellular sequence contains a VWF domain (34) which is present in many proteins such as integrins that interact with the extracellular matrix. It has been therefore suggested that this domain may serve as a receptor to extracellular ligands (35-36). It is therefore conceivable that $\alpha 2\delta 2$ promotes cell proliferation through a signalling pathway which does not involve voltage-dependent calcium channels. It has been shown recently that $\alpha 2\delta 1$ is the receptor for thrombospondin 1 (TSP1) and is responsible for TSP1- induced synaptogenesis in a calcium channel independent manner (35). Similarly, since a reduced expression of $\alpha 2\delta 1$ decreased muscle cell attachment and migration without altering voltage-dependent calcium currents, a previous publication suggested that $\alpha 2\delta 1$ may be essential in skeletal muscle development in a calcium channel independent manner, therefore supporting the involvement of this protein in extracellular signalling (36).

Our results show that diverse voltage-dependent calcium channels accessory subunits are present in prostate cells and tissues. Mostly, we show that rat and human prostate tissues express $\alpha 2\delta 2$, $\beta 4$ and $\gamma 4$ subunits. The expression of these subunits on the plasma membrane strongly suggests their functional role as either ligand receptor or regulators of ion channels. We also show that though $\alpha 2\delta 2$ subunits can stimulate cell proliferation as Cav3.2 channels do, and though they can associate in prostate cells, they probably do not require a physical association to produce their respective physiological effects.

Acknowledgments: This work was supported by INSERM, the University Lille1 and the Region Nord-Pas de Calais.

References

1. Fiske, J.L., Fomin, V.P., Brown, M.L., Duncan, R.L., and Sikes, R.A. 2006. Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25:493-500.
2. Kunzelmann, K. 2005. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 205:159-173.
3. Barbado, M., Fablet, K., Ronjat, M., and De Waard, M. 2009. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1793:1096-1104.
4. Shapovalov, G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. 2013. Calcium channels and prostate cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 8:18-26.

5. Gkika, D., and Prevarskaya, N. 2011. TRP channels in prostate cancer: the good, the bad and the ugly? *Asian J Androl* 13:673-676.
6. Panner, A., and Wurster, R.D. 2006. T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* 40:253-259.
7. Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M.F., and Prevarskaya, N. 2002. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:10824-10833.
8. Gackiere, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoi-Mariot, M.T., Mauroy, B., Prevarskaya, N., et al. 2008. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* 283:10162-10173.
9. Gackiere, F., Warnier, M., Katsogiannou, M., Derouiche, S., Delcourt, P., Dewailly, E., Slomianny, C., Humez, S., Prevarskaya, N., Roudbaraki, M., et al. 2013. Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology Open* 2:941-951.
10. Catterall, W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
11. Dolphin, A.C. 2012. Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13:542-555.
12. Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G., and Perez-Reyes, E. 1999. The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol* 519 Pt 1:35-45.
13. Thompson, W.R., Majid, A.S., Czymmek, K.J., Ruff, A.L., Garcia, J., Duncan, R.L., and Farach-Carson, M.C. 2011. Association of the alpha(2)delta(1) subunit with Ca(v)3.2 enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes. *J Bone Miner Res* 26:2125-2139.
14. Dooley, D.J., Taylor, C.P., Donevan, S., and Feltner, D. 2007. Ca²⁺ channel alpha2delta ligands: novel modulators of neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci* 28:75-82.
15. 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* 39:357-366.
16. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
17. Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
18. Chu, P.J., Robertson, H.M., and Best, P.M. 2001. Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* 280:37-48.
19. Buraei, Z., and Yang, J. 2013. Structure and function of the beta subunit of voltage-gated Ca(2)(+) channels. *Biochim Biophys Acta* 1828:1530-1540.
20. 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* 446:88-99.
21. Chen, Y.H., Li, M.H., Zhang, Y., He, L.L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L., and Yang, J. 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature* 429:675-680.

22. Buraei, Z., and Yang, J. 2010. The β_4 subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiol Rev* 90:1461-1506.
23. Bae, J., Suh, E.J., and Lee, C. 2010. Interaction of T-type calcium channel $\text{Ca}_v3.3$ with the β -subunit. *Mol Cells* 30:185-191.
24. Zou, S., Jha, S., Kim, E.Y., and Dryer, S.E. 2008. The β_1 subunit of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels. *Mol Pharmacol* 73:369-378.
25. Zhang, Y., Yamada, Y., Fan, M., Bangaru, S.D., Lin, B., and Yang, J. 2010. The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* 285:2527-2536.
26. Tadmouri, A., Kiyonaka, S., Barbado, M., Rousset, M., Fablet, K., Sawamura, S., Bahemba, E., Pernet-Gallay, K., Arnoult, C., Miki, T., et al. 2012. *Cacnb4* directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *Embo J* 31:3730-3744.
27. Chen, R.S., Deng, T.C., Garcia, T., Sellers, Z.M., and Best, P.M. 2007. Calcium channel γ subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem Biophys* 47:178-186.
28. Halatsch, M.E., Low, S., Mursch, K., Hielscher, T., Schmidt, U., Unterberg, A., Vougioukas, V.I., and Feuerhake, F. 2009. Candidate genes for sensitivity and resistance of human glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 111:211-218.
29. Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M.H., Lerman, M., Lee, J.H., Perez-Reyes, E., et al. 2000. Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel $\alpha_2\delta$ auxiliary subunit gene (*CACNA2D2*). *J Biol Chem* 275:12237-12242.
30. Lerman, M.I., and Minna, J.D. 2000. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 60:6116-6133.
31. Senchenko, V.N., Liu, J., Loginov, W., Bazov, I., Angeloni, D., Seryogin, Y., Ermilova, V., Kazubskaya, T., Garkavtseva, R., Zabarovska, V.I., et al. 2004. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene* 23:5719-5728.
32. Carboni, G.L., Gao, B., Nishizaki, M., Xu, K., Minna, J.D., Roth, J.A., and Ji, L. 2003. *CACNA2D2*-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity. *Oncogene* 22:615-626.
33. Huang, C.H., Chen, Y.C., and Chen, C.C. 2013. Physical interaction between calcineurin and $\text{Cav}3.2$ T-type Ca^{2+} channel modulates their functions. *FEBS Lett* 587:1723-1730.
34. Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A., et al. 2005. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of $\alpha_2\delta$ subunits is key to trafficking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11230-11235.
35. Eroglu, C., Allen, N.J., Susman, M.W., O'Rourke, N.A., Park, C.Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S.B., Annis, D.S., Huberman, A.D., et al. 2009. Gabapentin receptor $\alpha_2\delta$ -1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139:380-392.
36. Garcia, K., Nabhani, T., and Garcia, J. 2008. The calcium channel $\alpha_2\delta$ 1 subunit is involved in extracellular signalling. *J Physiol* 586:727-738.

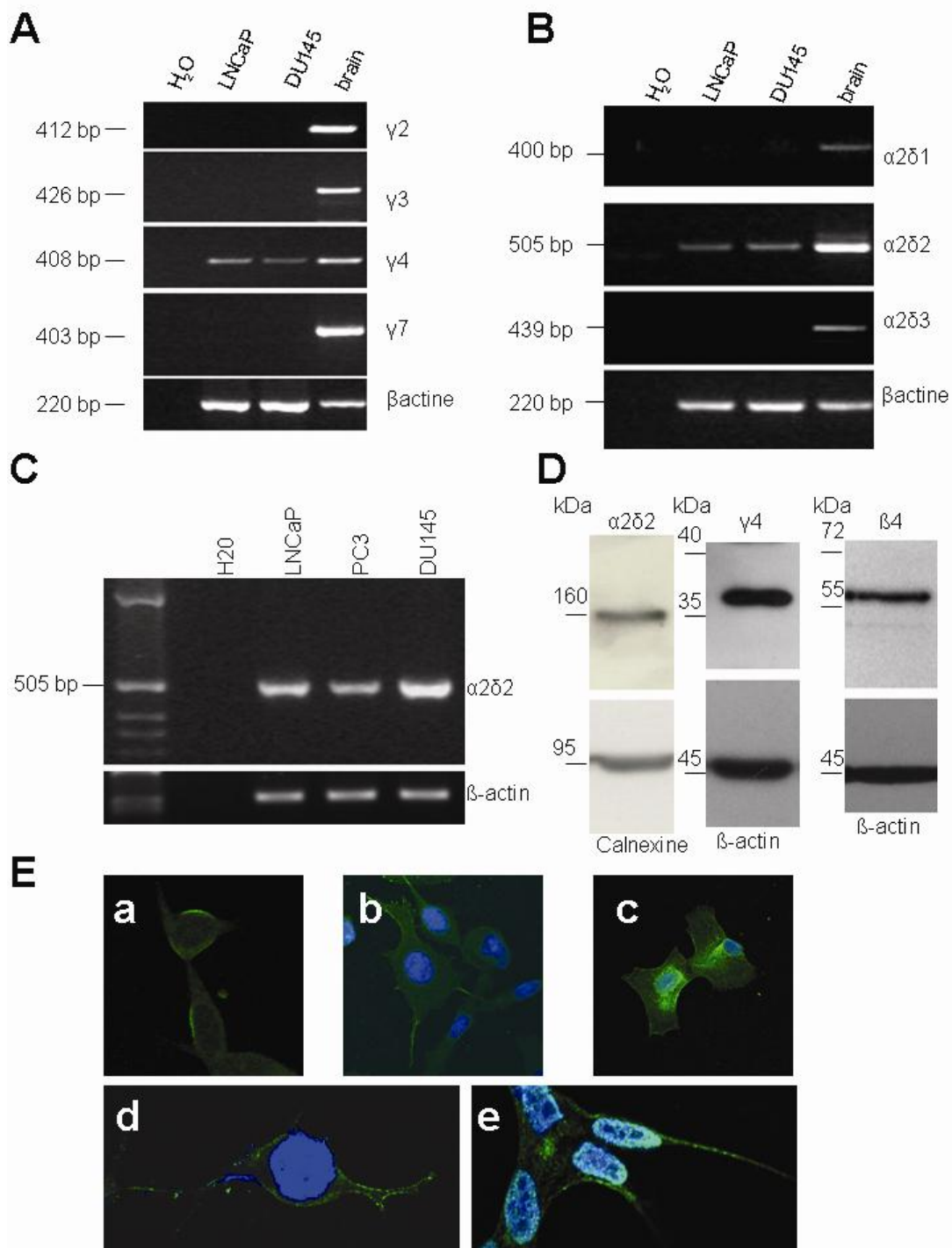


Figure 1: Expression study of accessory subunits of voltage-dependent calcium channels in prostate cancer cell lines. **A)** RT-PCR of γ subunits. **B)** RT-PCR of $\alpha 2\delta$ subunits. **C)** RT-PCR of $\alpha 2\delta 2$ subunits in different prostate cancer cell lines. **D)** Western-blot study of the expression of $\alpha 2\delta 2$, $\gamma 4$ and $\beta 4$ subunits in LNCaP cells. **E)** Immunofluorescence analysis of the expression of $\alpha 2\delta 2$ protein subunits in LNCaP (a), PC3 (b) and DU145 (c) prostate cancer cell lines. Immunofluorescent staining of $\beta 4$ (d) and $\gamma 4$ (e) subunits in LNCaP cells.

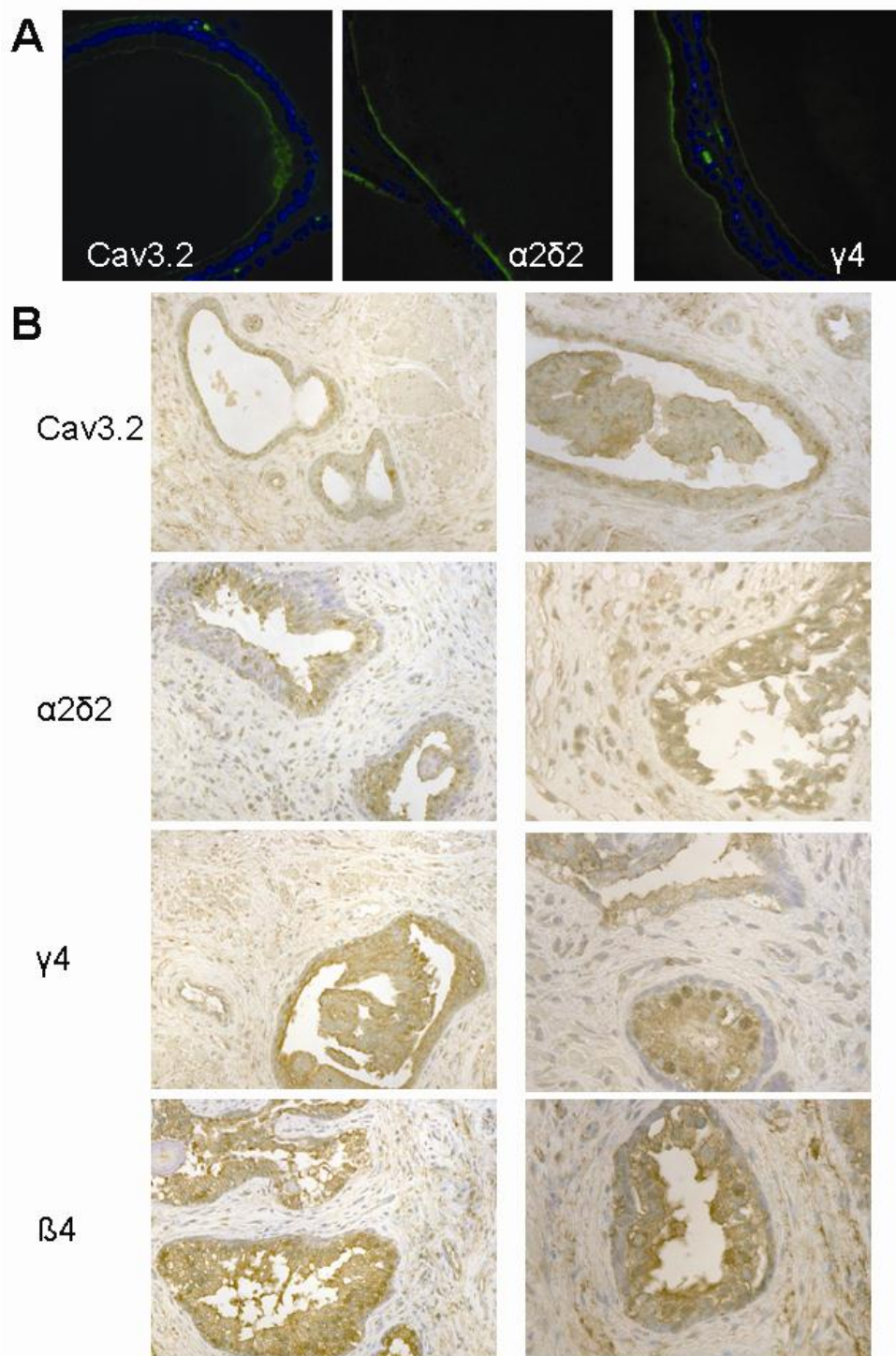


Figure 2: Protein expression study of Cav3.2, $\gamma4$, $\alpha2\delta2$, and $\beta4$ subunits in rat and human prostate tissues. **A)** Immunofluorescence study of the expression of Cav3.2 (left panel), $\alpha2\delta2$ (middle panel), and $\gamma4$ (right panel). Cell nuclei were stained using DAPI. Immunofluorescence was particularly intense at the apical border of the acini for each protein subunit. **B)** Immunohistochemical expression study of Cav3.2, $\alpha2\delta2$, $\gamma4$ and $\beta4$ subunits (from top to bottom panel). Expression was essentially localized in epithelial cells of the acini with a stronger staining on the apical border. Left panels: objective 20x. Right panels: objective 40x.

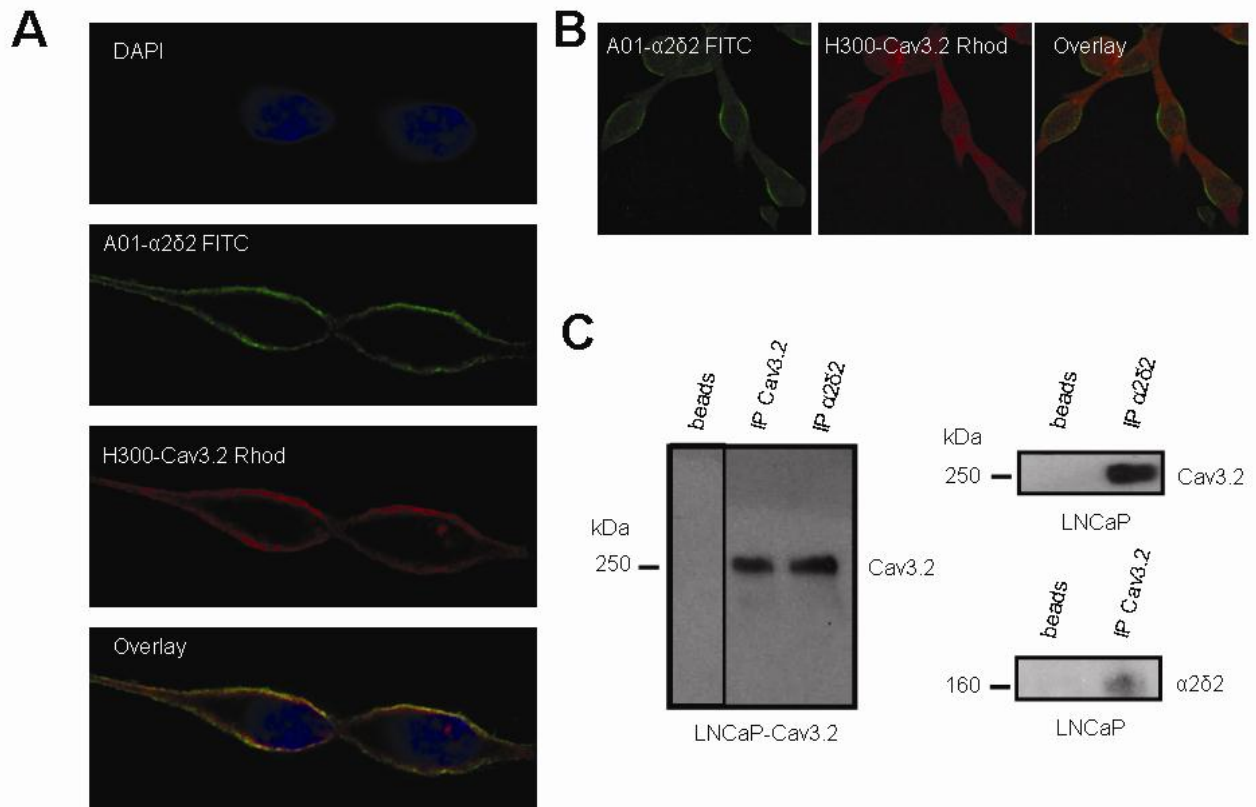


Figure 3: Colocalization and association study of Cav3.2 and α 2 δ 2 subunits. **A and B)** Immunofluorescence confocal study of the colocalization of Cav3.2 and α 2 δ 2 in LNCaP cells overexpressing Cav3.2 (LNCaP-Cav3.2 cells (**A**)) and LNCaP cells (**B**). Magnification: objective 40x. Cav3.2 and α 2 δ 2 were revealed using the rabbit H300 and the mouse A01 antibodies, respectively. The overlay shows that there is a partial colocalization in LNCaP-Cav3.2 cells (Pearson coefficient 0.81) between both red and green channels. **C)** Coimmunoprecipitation of Cav3.2 and α 2 δ 2 in LNCaP-Cav3.2 (left) and LNCaP-ctl (right) cells.

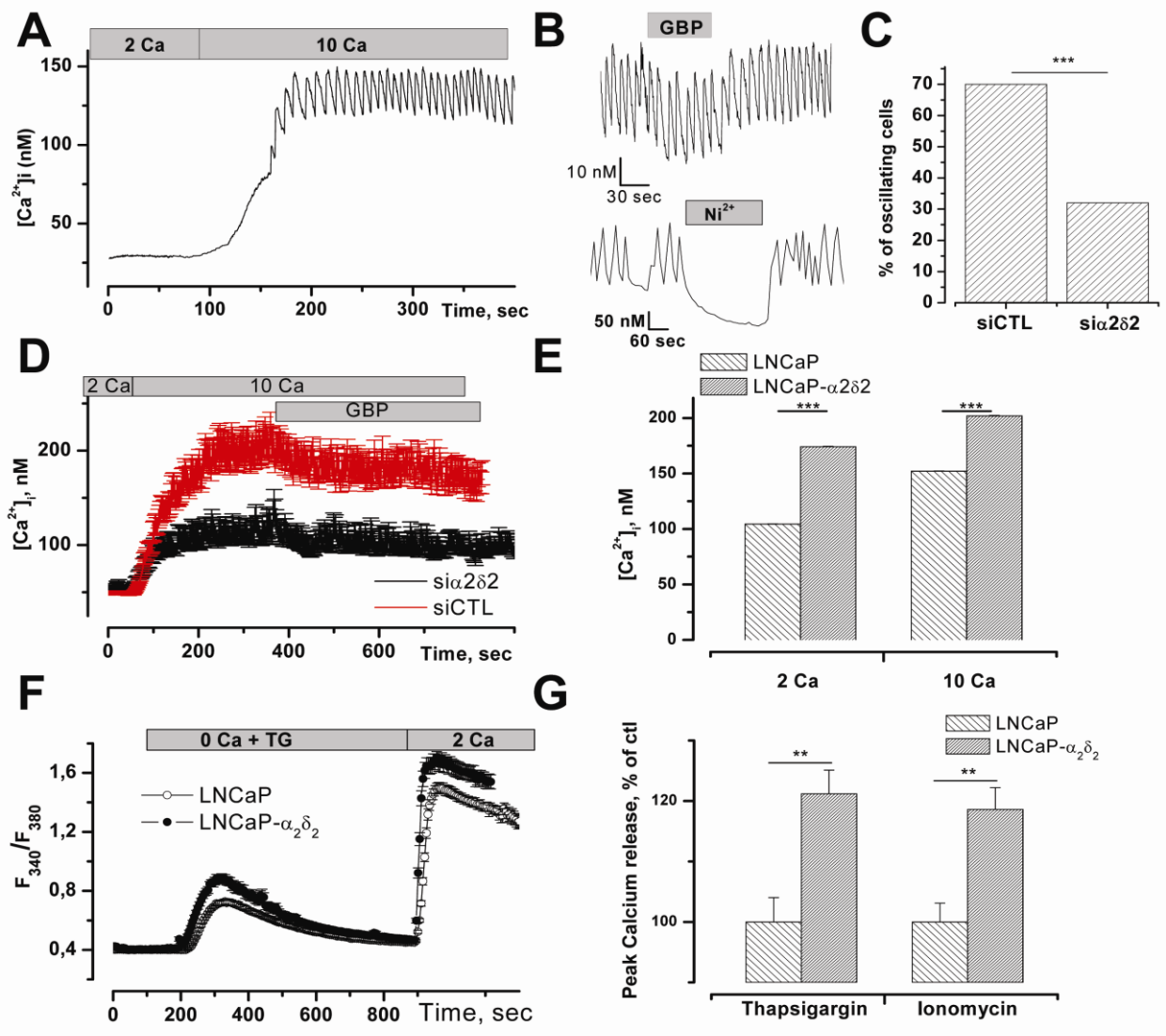


Figure 4: Calcium imaging studies show that $\alpha 2\delta 2$ is involved in calcium homeostasis. **A)** In LNCaP-Cav3.2 cells, switching from 2 to 10 mM CaCl_2 in the extracellular buffer induced regular calcium oscillations. **B)** These calcium oscillations observed in high extracellular calcium concentrations are blocked by NiCl_2 (20 μM) and only reduced by gabapentin (GBP-100 μM), a ligand of $\alpha 2\delta$ subunits. **C)** The percentage of cells displaying calcium oscillations was reduced ($p < 0.001$ (Fisher test)) by a pretreatment with siRNA targeting $\alpha 2\delta 2$ (si $\alpha 2\delta 2$ 50 nM, 3 days). **D)** Average curves obtained from LNCaP-Cav3.2 cells treated with 50 nM siCtl (red curve) or si $\alpha 2\delta 2$ (black curve). Knocking down the expression of $\alpha 2\delta 2$ reduced the average calcium increase induced by switching the extracellular calcium concentration from 2 to 10 mM. Gabapentin (100 μM) reduced the average calcium concentration in cells treated with siCtl but had a marginal effect on si $\alpha 2\delta 2$ treated cells. **E)** Overexpressing $\alpha 2\delta 2$ in LNCaP cells (LNCaP- $\alpha 2\delta 2$) slightly increased the basal cytosolic calcium concentration in both 2 and 10 mM external calcium concentration conditions as shown by the increase in the F340/F380 ratio. **F)** Application of 0.5 μM Thapsigargin (TG) induced a calcium release from internal stores of lower amplitude in LNCaP-ctl cells as compared to LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells. **G)** Average peak amplitude of calcium release induced by TG (0.5 μM) and ionomycin (iono 1 μM) in both LNCaP-ctl and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells.

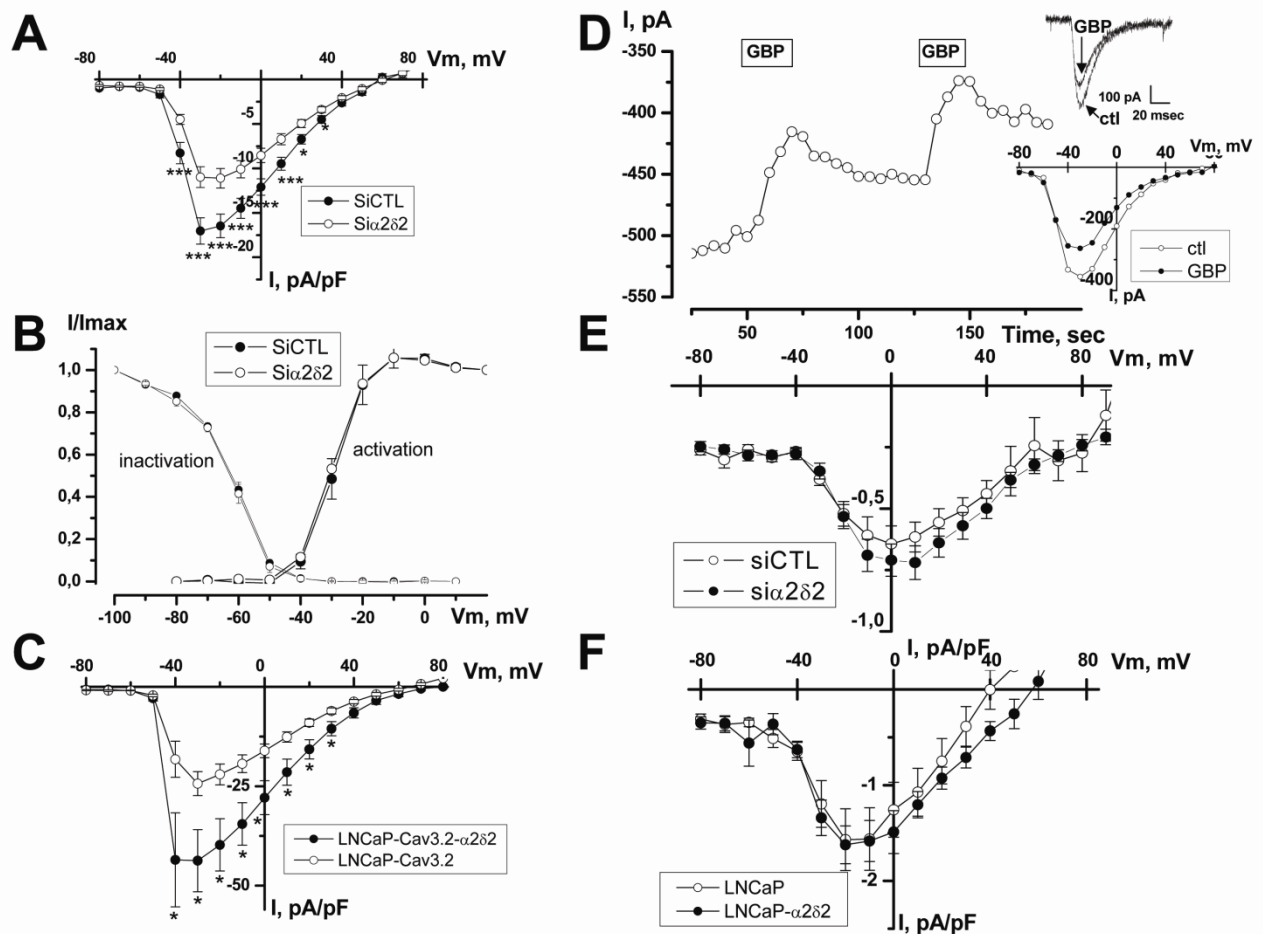


Figure 5: Patch-clamp experiments showing that $\alpha 2\delta 2$ regulates Cav3.2 activity

A) T-type currents were elicited in LNCaP-Cav3.2 cells by a membrane depolarization from -80 mV to various membrane potential values for 50 msec and the amplitude of the resulting peak membrane current was plotted as a function of the membrane potential (current-voltage (I-V) curve). A pretreatment with 50 nM $\text{si}\alpha 2\delta 2$ for 3 days significantly reduced the amplitude of the average I-V relationship at every membrane potential between -40 and +20 mV. **B)** Inactivation and activation curves for T-type currents in LNCaP-Cav3.2 treated for 3 days with 50 nM siCtl or $\text{si}\alpha 2\delta 2$. Inactivation and activation curves were obtained as previously detailed in (7). Inactivation and activation properties of T-type calcium currents were not altered by $\text{si}\alpha 2\delta 2$. **C)** I-V curves for LNCaP cells overexpressing Cav3.2 only or Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$. Overexpressing both $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 subunits in LNCaP cells led to large T-type calcium currents than in Cav3.2 only overexpressing cells. **D)** Time course of T-type calcium currents generated by a depolarization from -80 to -20 mV every 5 sec in an LNCaP-Cav3.2 cell. Gabapentin (GBP-100 μM) reduced T-type currents. Uppermost inset: typical recordings of T-type calcium currents elicited by a depolarization to 20 mV in control and gabapentin condition. Lowermost inset: I-V curve of T-type calcium currents obtained in the same cell before and during gabapentin application. **E)** I-V curves for endogenous T-type currents recorded in LNCaP cells treated with 1 mM dbcAMP and 0.1 mM IBMX for three days. $\text{si}\alpha 2\delta 2$ did not reduce endogenous T-type calcium currents. **F)** I-V curves for T-type current recorded in LNCaP-ctl cells and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells treated with 1 mM dbcAMP and 0.1 mM IBMX for three days. The overexpression of $\alpha 2\delta 2$ did not enhance endogenous T-type calcium currents

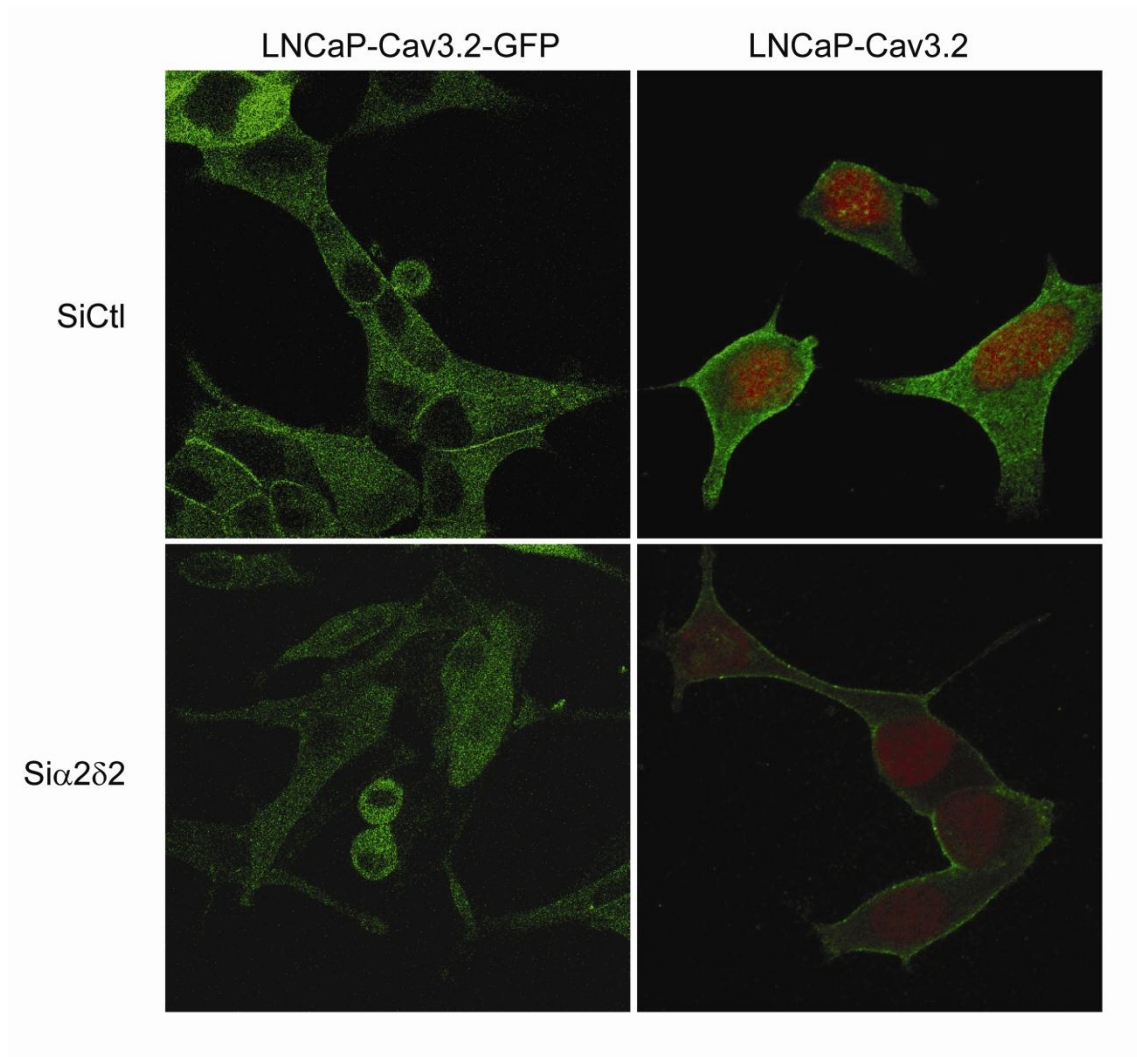


Figure 6: $\alpha 2\delta 2$ facilitates Cav3.2 targeting of Cav3.2 channels.

Confocal images showing that Cav3.2 expression in LNCaP cells overexpressing Cav3.2 or Cav3.2-GFP (left panel: GFP tag allowing visualization of Cav3.2 channel on live cells and right panel: immunofluorescence study using the H300 Cav3.2 antibody on acetone-fixed cells) at the plasma membrane is altered by a treatment with $\text{si}\alpha 2\delta 2$ (50 nM, 3 days). As observed on the pictures (top panels: siCtl , bottom panels: $\text{si}\alpha 2\delta 2$), $\text{si}\alpha 2\delta 2$ reduced the proportion of Cav3.2 channels at the cell periphery, presumably on the plasma membrane.

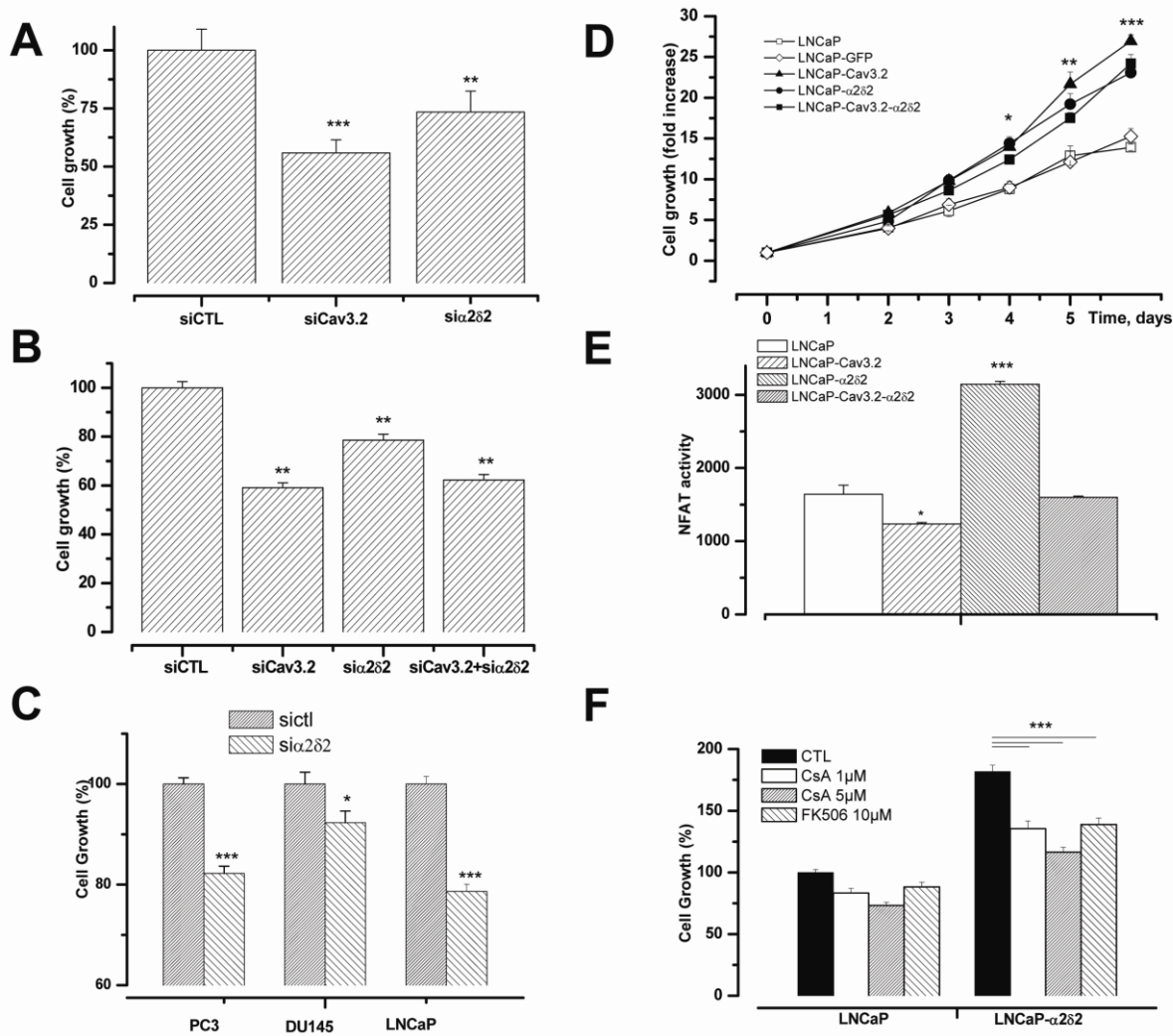


Figure 7: $\alpha 2\delta 2$ stimulates LNCaP cell proliferation through the NFAT/calcineurin pathway

A) LNCaP cell growth measured by manual cell counting of cells extruding trypan blue. SiCav3.2 and si $\alpha 2\delta 2$ induced a similar reduction of cell growth. **B)** MTS measurement of LNCaP cell growth. SiCav3.2 and si $\alpha 2\delta 2$ and the combination of both siRNA induced a similar reduction of cell growth. **C)** Reduction of cell proliferation (measured using an MTS assay) by si $\alpha 2\delta 2$ in various prostate cancer cell lines (PC3, DU145 and LNCaP cell growth). **D)** Overexpression of Cav3.2, $\alpha 2\delta 2$ or both proteins induced a stimulation of cell growth as measured using an MTS assay. **E)** Measurement of NFAT activity in LNCaP cells show the overexpression of $\alpha 2\delta 2$ is associated with a significant stimulation of NFAT activity whereas the overexpression of Cav3.2 led to a decreased NFAT activity. The overexpression of both Cav3.2 and $\alpha 2\delta 2$ led to intermediate NFAT activity levels, similar to that of controls'. **F)** Inhibitors of calcineurin (cyclosporin A (CsA 1 and 5 μM) and FK506 10 μM) reduced cell growth stimulated by the overexpression of $\alpha 2\delta 2$

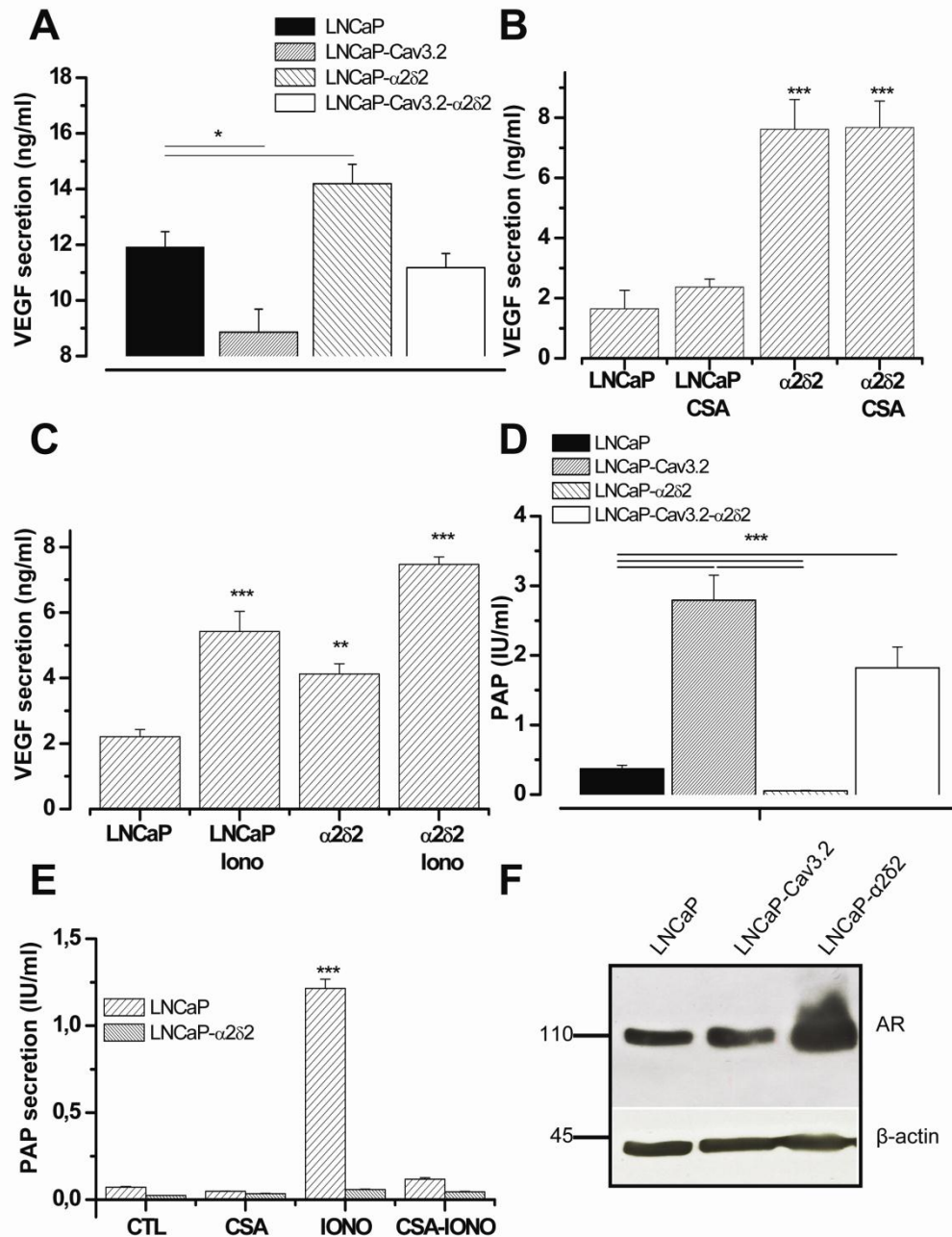
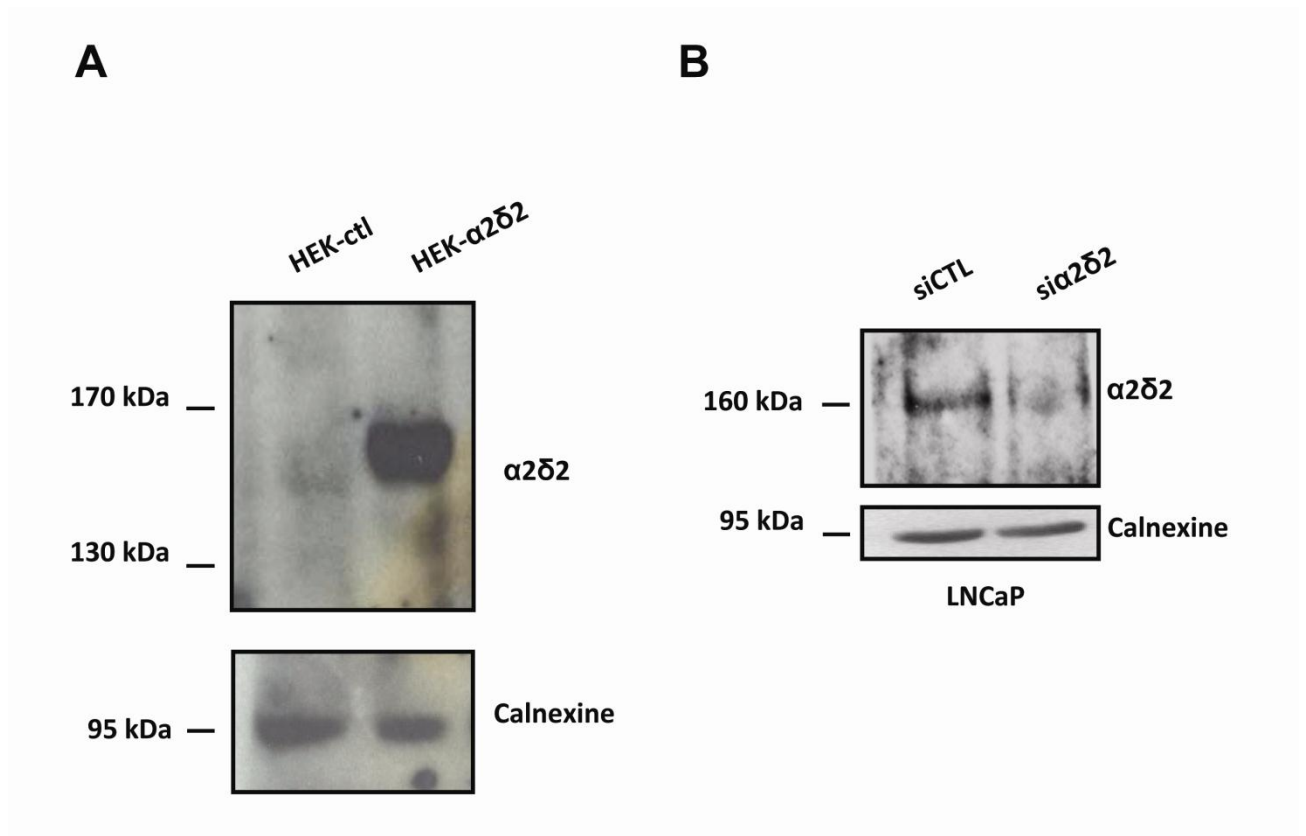


Figure 8: $\alpha 2\delta 2$ and Cav3.2 promote different cell secretory responses

A) Secretion of VEGF in the culture medium measured using an ELISA kit (48 hours of incubation). The overexpression of $\alpha 2\delta 2$ stimulates by about 20 %, whilst Cav3.2 overexpression inhibits by 30 %, VEGF secretion. Coexpression of $\alpha 2\delta 2$ with Cav3.2 led to intermediate levels of VEGF secretion, similar to that of controls'. **B)** Cyclosporin A (1 μ M) did not inhibit VEGF secretion (24 hours of incubation) induced by $\alpha 2\delta 2$ overexpression showing that $\alpha 2\delta 2$ enhances VEGF secretion in a calcineurin/NFAT independent manner. **C)** Ionomycin 1 μ M for 24h is able to promote VEGF secretion (24 hours of incubation) which show that VEGF secretion is a calcium-dependent process. LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ are also sensitive to ionomycin in a similar way as LNCaP cells since their VEGF secretion is potentiated by ionomycin. **D)** Stimulation of PAP secretion by ionomycin (48 hours, ionomycin 1 μ M) is

inhibited by cyclosporin (CsA, 1 μ M) showing that ionomycin-dependent secretion of PAP is a calcineurin/NFAT dependent process. The inhibition of PAP secretion by the overexpression of $\alpha 2\delta 2$ is not antagonized by CsA. **E)** Overexpression of $\alpha 2\delta 2$ drastically reduced whereas Cav3.2 overexpression enhanced ionomycin-stimulated PAP secretion (48 hours of incubation in 1 μ M ionomycin). Coexpression of both proteins led to intermediate levels of PAP secretion significantly higher than the control conditions. **F)** Western-blot of the androgen receptor (AR) in LNCaP cells. Overexpression of $\alpha 2\delta 2$ induced an increased expression of AR not mimicked by the overexpression of Cav3.2.



Supplemental Figure S1: Validation of $\alpha 2\delta 2$ antibody and the si $\alpha 2\delta 2$ used in this study. **A)** Western blot carried out on protein extracts from HEK cells overexpressing (right lane) or not (left lane) $\alpha 2\delta 2$. The $\alpha 2\delta 2$ protein was detected at the expected size of 160 kDa using the H210 antibody. **B)** The si $\alpha 2\delta 2$ (4 days at 50 nM) used in our study reduced the expression of the $\alpha 2\delta 2$ protein in LNCaP cells as shown on this western-blot.

Article 3

" $\alpha 2\delta 2$ (CACNA2D2) subunits induce tumorigenesis in mice xenografts through a stimulation of cell proliferation and angiogenesis."

Marine Warnier, Morad Roudbaraki, Sandra Derouiche, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Natalia Prevarskaya and Pascal Mariot.

Manuscrit soumis prochainement (attente du dépôt de brevet).

Différentes approches *in vitro* et *in vivo* ont montré que les canaux calciques de type T étaient impliqués dans le développement cancéreux de plusieurs tissus tels que le poumon, le sein, le tissu glial (Strobl et al., 1990) (Bertolesi et al., 2002) (Valerie et al., 2013). Concernant le cancer de la prostate, il a été montré que l'expression du canal $Ca_v3.2$ augmentait lors de la différenciation neuroendocrines (Mariot et al., 2002). De plus, ce canal intervient dans la sécrétion de PAP et de facteurs mitogènes (Gackiere et al., 2008). Ces sécrétions pourraient alors favoriser la prolifération des cellules avoisinantes.

Par ailleurs, les sous-unités accessoires ($\alpha 2\delta$, β et γ) des canaux calciques voltage-dépendants peuvent intervenir dans le développement tumoral. Il a été montré que l'expression de la sous-unité $\beta 3$ augmentait dans le cancer pulmonaire (Mitra et al., 2011). De plus, des études suggèrent que les gènes codant les sous-unités $\alpha 2\delta$, notamment CACNA2D2 et CACNA2D3 puissent être de potentiels gènes suppresseurs de tumeur (Qin et al., 2008). Une délétion de la région chromosomique 3p21, locus du gène CACNA2D2 est observée dans les cancers du poumon (Lerman and Minna, 2000). La présence de la protéine $\alpha 2\delta 2$ est liée à une augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires (Carboni et al., 2003). Cependant, une étude récente montre qu' $\alpha 2\delta 1$ favorise le développement du cancer du foie (Zhao et al., 2013).

Après avoir mis en évidence l'expression de la protéine $\alpha 2\delta 2$ dans les cellules épithéliales prostatiques saines et cancéreuses dans l'article 2, nous avons voulu savoir quel était le rôle de cette protéine dans la tumorigenèse prostatique.

Nous montrons qu' $\alpha 2\delta 2$ est exprimée plus fréquemment dans le tissu cancéreux prostatique que dans le tissu sain et que son expression augmente avec la progression du cancer. De plus,

par des études *in vitro* et *in vivo*, nous démontrons que cette protéine augmente la prolifération cellulaire et la croissance tumorale. La gabapentine, un ligand d' $\alpha 2\delta 2$ réduit le développement des tumeurs LNCaP issues de xénogreffes sur des souris *nude*. Enfin, les études d'immunohistochimie mettent en évidence que la surexpression d' $\alpha 2\delta 2$ favorise l'angiogenèse en augmentant la sécrétion de VEGF.

Les résultats de cette étude renforcent l'idée selon laquelle la protéine $\alpha 2\delta 2$ peut jouer un rôle différent sur le développement tumoral en fonction de l'organe ou du tissu concerné. Ainsi, dans le cancer de la prostate, cette protéine favorise la prolifération *via* une stimulation de l'angiogenèse. De par sa localisation membranaire, cette protéine pourrait être une cible thérapeutique et par son augmentation d'expression dans le cancer, un marqueur diagnostique.

$\alpha 2\delta 2$ (CACNA2D2) subunits induce tumorigenesis in mice xenografts through a stimulation of cell proliferation and angiogenesis

Marine Warnier, Morad Roudbaraki, Sandra Derouiche, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Natalia Prevarskaya and Pascal Mariot

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

keywords:

T-type calcium channels, CACNA2D2, $\alpha 2\delta 2$, VEGF, prostate, proliferation, angiogenesis, LNCaP, xenograft, cancer cell growth.

Corresponding author:

Pascal Mariot, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, INSERM U1003, Bâtiment SN3, Université Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Phone: (33) 03 20 33 63 13; Fax: (33) 03 20 43 40 66; E-mail: Pascal.Mariot@univ-lille1.fr

Abstract

We have in the present study assessed whether a putative calcium channel auxiliary subunit ($\alpha 2\delta 2$ protein), could be involved in prostate cancer progression. We Therefore carried out experiments to determine whether this protein is expressed in prostate cancer LNCaP cells and in prostate cancer tissues and whether its expression may be altered during cancer development. In addition, we evaluated the influence of overexpressing or down-regulating this subunit on cell proliferation. In vitro experiments show that $\alpha 2\delta 2$ subunit overexpression is associated with increased cell proliferation. Furthermore, we carried out in-vivo experiments on immunodeficient nude mice in order to evaluate the tumorigenic potency of this $\alpha 2\delta 2$ subunit. We show that $\alpha 2\delta 2$ overexpressing prostate cancer LNCaP cells are more tumorigenic than control LNCaP cells. In addition, gabapentin, a ligand of $\alpha 2\delta 2$, reduces tumor development in LNCaP xenografts. Finally, we show that the action of $\alpha 2\delta 2$ on tumor development occurs not only through a stimulation of proliferation but also through a stimulation of angiogenesis, *via* an increased secretion of VEGF in cells overexpressing $\alpha 2\delta 2$.

Introduction

Whereas calcium signaling implication in genetic cardiovascular, neurological or metabolic diseases has been known for years (1), it has only been recently admitted to be likewise involved in other pathologies such as cancers. Hanahan and Weinberg have distinguished in their principle review (2) different hallmarks that cancers may acquire during their progression: self-sufficiency in growth signaling, resistance to apoptosis, insensitivity to anti-growth signals, unlimited replication potential, the ability to promote angiogenesis and to invade neighboring or distant organs. Calcium homeostasis deregulation may be involved in each of these processes leading to cancer development (3). As a matter of fact, it has been shown that either calcium transports (through pumps, exchangers or channels) or calcium targets (calcium binding proteins, calcium-dependent kinases...) may be subject to remodeling or altered expression during cancer progression (4). Voltage-dependent calcium channels have for instance been shown to be either overexpressed or down-regulated during the acquisition of a cancerous phenotype, for example to be up-regulated in colon cancer (Cav1.2 channels (5)) or down-regulated in lung cancer (Cav3.1 channel (6)).

Using *in vitro* or *in vivo* approaches, calcium channels have been shown to be implicated in cancer development of different tissues or organs including prostate, breast, brain (7, 8). Indeed, calcium channels have been demonstrated to participate in cell invasion, migration, differentiation or proliferation (9-12). In most cases, overexpressing calcium channels accelerates cell proliferation whereas inhibiting or down-regulating calcium channels reduce cell growth. In our laboratory, we have previously shown that voltage-dependent Cav3.2 T-type calcium channels are overexpressed in prostate cancer cell lines progressing towards a more aggressive phenotype (10). In addition, we have shown that these channels are expressed in human prostate cancer acini and allow the secretion of paracrine factors such as serotonin or prostatic acidic phosphatase that may participate to cancer progression (13). Additionally, regulatory or auxiliary voltage-dependant calcium channels subunits are potential candidates involved in tumor growth. Indeed, several putative calcium channel subunits genes have been identified as being either down or up-regulated regulated in some cancer tissues such as CACNA2D2 and CACNA2D3 in lung and gastric cancer (14, 15, 16), CACNB3 in recurrent non small cell lung cancer (17), or involved in resistance of gliomas to chemotherapy (CACNG4, (18)).

A cluster of genes in the locus 3p21 has been identified as a tumor suppressor gene cluster. In this cluster lies a gene CACNA2D2 coding for a putative regulatory subunit of voltage-

dependent calcium channels ($\alpha 2\delta 2$ subunit) (14). This subunit was identified as promoting cell death apoptosis (19). This subunit was therefore thought to be a tumor suppressor gene by itself (14). We have in the present study addressed whether this putative calcium channel auxiliary subunit ($\alpha 2\delta 2$ protein), could be involved in cancer progression. Therefore, we carried out experiments to determine whether this protein is expressed in prostate cancer LNCaP cells and in prostate cancer tissues and whether its expression may be deregulated during cancer development. In addition, we evaluated the influence of overexpressing or down-regulating this subunit on cell proliferation. We show that $\alpha 2\delta 2$ subunit is associated with an increase in cell proliferation. Furthermore, we carried out *in vivo* experiments on immunodeficient nude mice in order to evaluate the tumorigenic potency of the $\alpha 2\delta 2$ subunit. We show that $\alpha 2\delta 2$ -overexpressing prostate cancer LNCaP cells are more tumorigenic than control LNCaP cells. Finally, we show that the action of $\alpha 2\delta 2$ on tumor development probably occurs through a stimulation of both proliferation and angiogenesis.

Materials and Methods

Cell culture and treatments

LNCaP prostate cancer cell lines were purchased from the American Type Culture Collection and cultured as described by Gackière et al (13) in RPMI 1640 (GIBCO, Life Technologies, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, L'Isle d'Abeau, France), and 2 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France). Cells were routinely grown in 75 cm² flasks (Nunc, Poly-Labo, France) in a humidified atmosphere at 37°C (95 % air - 5 % CO₂). LNCaP cell lines stably expressing $\alpha 2\delta 2$ protein (LNCaP- $\alpha 2\delta 2$) were used in this study.

Cell transfection

Small interfering RNAs (Eurogentech, France) against the human coding sequence of $\alpha 2\delta 2$ (Genebank accession # NM_001174051) were designed and referred to as si- $\alpha 2\delta 2$ (5'-GACCAACGUUCUGAUCUGC (dTdT)-3'. siRNAs used in this study included a non-specific control siRNA (si-Ctl) against Luciferase (5'- CUUACGCUGAGUACUUCGA (dTdT)-3'accession # FN554878).

Cells were transfected with either 20 to 50 nM siRNA using HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen) as described previously (13). The efficiency of the siRNA is validated by RT-PCR and by western blot analysis.

Analysis of the $\alpha 2\delta 2$ subunit gene expression by RT-PCR or quantitative RT-PCR

RNA extraction was carried out using Trizol® using the method originally described by Chomczynski et Sacchi (20). RT-PCR was carried out as previously described (13).

Protein	Gene	Forward Sequences (5'-3')	Reverse Sequences (5'-3')	Size (bp)	Accession number
$\alpha 2\delta 1$	CACNA2D1	TGCAAGAAGACCTTGTCACA	ACACAATTGTTGAGCCCTCA	400	GI 179761
$\alpha 2\delta 2$	CACNA2D2	GATGCGGAGCTAGAGGATGA	GCTGTACGTGTTGAGATGCT	505	BC 152438
$\alpha 2\delta 3$	CACNA2D3	CCATGGAGGTGAAGAAGACA	TTGTCACCAGCTTTCAGGAA	500 439	NM_018398
β actine		CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGAT	220	NM_001101

Table 1: Expected size of the amplicon is indicated in bp. For some primers, several sizes might be observed according to the expressed splice variant.

Western blotting

After washing in phosphate buffered saline (PBS), cells were collected by scraping in lysis buffer (Triton X-100 1%, Na deoxycholate, 1%, NaCl 150 mM, PO₄NaK 10mM, pH 7,2) with anti-protease cocktail and incubated on ice for 45 min. The lysates were centrifuged at 12000 G for 10 min at 4°C. The protein concentration of the supernatant was determined by the BCA assay (Pierce Chemical Compagny). Western-blot analysis of protein expression was designed as described elsewhere (13) using anti- $\alpha 2\delta 2$ polyclonal antibody. Fifty micrograms of each sample were analyzed by SDS-PAGE on either 6% or 12 % acrylamide and processed for western-blotting using primary antibodies in the table below.

Antibody	Name	Company	Dilution In WB	Dilution in IF/IH	Secondary antibody	MW (kDa)
$\alpha 2\delta 2$	H210	Santa Cruz	1/200 ^e	1/100 ^e or 1/50 ^e	Rabbit	130
$\alpha 2\delta 2$	A01	Abnova	/	1/50 ^e	Mouse	130
PCNA	Sc-56	Santa Cruz	1/200 ^e	/	Mouse	36
β -actin	A-5441	Sigma	1/4000 ^e	/	Mouse	43
Calnexine	mab 3126	Millipore	1/2000 ^e	/	Mouse	95
Ki-67	Sc-101861	Santa Cruz	/	1/100 ^e	Rabbit	
CD31	Ab28364	Abcam	1/200 ^e	1/50 ^e	Rabbit	130
VEGF	Ab46154	Abcam	1/200 ^e	1/50 ^e	Rabbit	43

Table 2: Antibodies used for western blotting, immunohistochemical and immunofluorescence identification.

Immunostaining and confocal analysis

The protein expression studies in prostate cancer (PCA) cells and tissues were carried out using indirect immunofluorescence analysis on acetone fixed cells and formalin-fixed paraffin embedded tissues. Tissue microarrays and mice tumoral tissues were studied using immunohistochemical procedures.

Multi-tumor tissue microarray slides were obtained from Biomax (USA). 30 tumors with adjacent matching normal tissues were analysed. All tumors were formalin-fixed and paraffin-embedded. Slides of tissues were microwaved for 20 min, and washed three times in 10 mM citrate buffer (pH 6.0). To inhibit nonspecific binding of antibodies and permeabilize the cells, slides were incubated with PBS containing 0.2% BSA, 0.1% TritonX-100 and 5% donkey serum, for 30 min at room temperature. They were then incubated overnight at 4°C with PBS/5% non-immunized serum containing the relevant primary antibody (see dilutions in table).

For immunofluorescence studies, cells were incubated with the secondary Alexa fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (A-21206; Molecular Probes; dilution 1:2000) diluted in PBS for 1 h at room temperature. After rinsing three times in PBS, the slides were mounted with Mowiol. For immunohistochemical studies, Horse Radish Peroxidase-DAB detection method was used (dilution of secondary antibody 1/100). Endogenous peroxidase activity was inhibited using 0.3% H₂O₂ before microwaving the slides. Azure B was used to counterstain the slides of tissues.

Immunostaining and confocal observations were realized as previously described using a Zeiss LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Le Pecq, France) connected to a Zeiss Axiovert 200 M (13).

Cell proliferation and tests of viability

Cell viability was assessed by a colorimetric method (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, USA) according to manufacturer's instructions. Cell proliferation was also assessed by manual counting of cells extruding Trypan Blue. Ki-67 or PCNA staining were also used to discriminate cells in quiescence (G₀ phase) and cycling cells.

Cell Cycle Analysis

Cells were grown in three 60-mm dishes per condition and drugs or siRNA were applied as described above. After treatments, cells were trypsinized, harvested and resuspended in 0.2 ml

sterile PBS. 1 ml of cold 70% ethanol was added onto cell suspensions while vortexing. Samples were centrifuged, washed in sterile PBS and then incubated with ribonuclease (2 µg/ml) for 15 min at room temperature. Propidium iodide (25 µg/ml final in PBS-triton X-100 0.1%) was then added and allowed to incubate for an additional 30 min at room temperature. DNA content was measured by exciting propidium iodide at 488 nm and measuring the emission at 520 nm using a flow cytometer (Beckman coulter Epics XL4-MCL with Expo32 acquisition). Data interpretation was made using Multicycle for Windows (Phoenix Flow system).

VEGF secretion assay

Secretion of VEGF was measured *in vitro* using an ELISA approach as described by the manufacturer (Abcam, Paris, France). After seeding, cells were cultured in 12 well plates for three days before culture medium was changed. VEGF was then assayed in the culture medium after 24 hours incubation (3 wells per condition, the experiment was repeated at least three times).

In vivo experiments

Experiments were conducted on mice according to the agreement provided by the local ethical comity (protocol CEEA 202012). Six-week old male swiss nude mice (Charles River Laboratories, France) were injected on each flank with either LNCaP cells or LNCaP cells overexpressing $\alpha 2\delta 2$. Six millions cells were injected on both flanks of each mouse. Cells were prepared in a mixture composed of 50 % PBS and 50 % BD-Matrigel® (BD Bioscience, France). Tumors were measured twice a week and animals were sacrificed when total tumor size reached 10% of the animal weight. On the day of sacrifice, tumors were weighed and divided for further immunohistochemical, western blot and RT-PCR experiments. At least 10 animals per condition were used. For studying gabapentin action on tumor development, gabapentin was administrated in drinking water which was renewed every other day. Water consumption was assessed for every cage of animals and gave an average volume of ingested water of 5 ml/day/mouse. Gabapentin concentration in drinking water was set to 400 mg/l in order to have for every animal a consumption of 60 mg/day/kg, a dose corresponding to the maximal dose used in medical treatments in human. The stability of gabapentin being very high in water even at room temperature, its concentration should not be affected in our experiments (21),

Statistical analysis

Plots were produced using Origin 7.0 (Microcal Software, Inc., Northampton, MA). Results are expressed as mean \pm sem. Statistical analysis were performed using unpaired t-tests (for comparing two groups) or ANOVA tests followed by either Dunnett (for multiple control *vs* test comparisons) or Student-Newman-Keuls post-tests (for multiple comparisons) or Chi2 tests to compare proportions. Differences were considered significant with $p < 0.05$: * , $p < 0.01$: ** , $p < 0.001$: ***.

Results

$\alpha 2\delta 2$ expression in prostate cancer tissues and cell lines.

We have shown in previous studies that voltage-dependent calcium channels Cav3.2 are expressed in prostate cancer cell lines and human prostate tumors (10, 13). We have investigated here whether $\alpha 2\delta$ regulatory subunits could also be expressed in these cells. As shown on figure 1A, using RT-PCR, we show that prostate cancer LNCaP cells expressed the $\alpha 2\delta 2$ transcript. The other $\alpha 2\delta$ subunits investigated ($\alpha 2\delta 1$ and $\alpha 2\delta 3$) are not expressed in this prostate cancer cell line. Similarly, RT-PCR experiments demonstrate that $\alpha 2\delta 2$ is present in normal and cancerous human prostate tissues (Figure 1C). We thus performed immunodetection assays to demonstrate the expression of $\alpha 2\delta 2$ proteins in prostate cancer LNCaP cell line and prostate tissue sections. As illustrated on figure 2A, immunofluorescent experiments show that prostate cancer LNCaP cells are strongly stained by $\alpha 2\delta 2$ antibodies. Immunostaining for $\alpha 2\delta 2$ is evident throughout the cell but particularly on the cell periphery, therefore close to plasma membrane area. Additionally, in western blot experiments, we observe the presence of a couple of bands around 160 kD using antibodies raised against $\alpha 2\delta 2$ (figure 2B). Furthermore, the expression of these bands is strongly reduced when LNCaP cells are cultured in the presence of siRNA directed against $\alpha 2\delta 2$ (figure 2B). These bands of 160 kD observed in western blot experiments corresponds to the expected size of $\alpha 2\delta 2$, which therefore shows that the antibody that we used in this study successfully detects the $\alpha 2\delta 2$ protein.

Immunofluorescent (IF) or immunohistochemical (IH) staining of prostate cancer sections obtained from patients was carried out on frozen (IF) or paraffin (IH peroxydase reaction) sections of prostate tissues. We show that there is a consistent staining of $\alpha 2\delta 2$ in epithelial glandular structures. Acini were frequently stained with $\alpha 2\delta 2$ antibodies (figure 2C and D). In addition, Figure 2C and D shows that there is a stronger staining on apical membranes of the

epithelium than on basolateral membranes. Immunostaining on prostate cancer epithelial cells in primary culture show that there is indeed a strong $\alpha 2\delta 2$ staining on cell periphery (Figure 2E).

In order to evaluate potential disorders in the expression of $\alpha 2\delta 2$ between normal and tumoral tissues, we carried out a comparison of the $\alpha 2\delta 2$ expression using an RT-PCR approach in 18 prostate cancer tissues and 20 non-cancerous prostate tissues. As illustrated on figure 1B and C, $\alpha 2\delta 2$ is more frequently expressed (significantly different, $p < 0.001$, Chi2) in cancer tissues (95% of cancer tissues expressed $\alpha 2\delta 2$) than in non-cancerous tissues (40% of non cancerous prostate tissues expressed $\alpha 2\delta 2$).

Similarly, we compared the expression of $\alpha 2\delta 2$ on prostate tissue macroarrays in 24 different tissues (16 cancers and 8 non cancer tissues). As shown on figure 3, epithelial cells lining the acini were stained by $\alpha 2\delta 2$ antibody in normal, hyperplastic and cancer samples. In advanced cancers, many of the stained cells leak out of the acini (see Figure 3 B, Grades 3 and metastasis). Different samples with various Gleason grades were analysed. Both stained surface and DAB density increased in advanced grades of prostate cancer as compared to normal or hyperplastic prostate. As shown on figure 3, cellular localization is different between normal, BPH, early stages of cancers and advanced cancers. In normal, BPH tissues and early stages of cancer (Grade 1 G1: corresponding to well differentiated cancers: Gleason Scores less than 6), staining is mostly apical and intracellular whereas in advanced stages of cancer (G2: corresponding to intermediately differentiated cancers with Gleason scores between 6 and 7, and G3: corresponding to poorly differentiated cancers with Gleason Scores between 7 and 10), staining increases in every cellular compartment and remarkably on cell nuclei. We also analyzed staining density using color deconvolution to extract DAB staining from counterstaining (Azure blue) and show that DAB density is greater in advanced stages of cancer, showing that $\alpha 2\delta 2$ expression is enhanced in prostate cancers (Figure 3).

Inhibition of $\alpha 2\delta 2$ reduces cell proliferation whereas its overexpression accelerates cell proliferation

Since $\alpha 2\delta 2$ is expressed in prostate cancer epithelial LNCaP cells, we assessed whether this protein could participate in prostate cell growth. Different approaches were used to evaluate cell proliferation (Figure 4). First, using MTS assay, we show that LNCaP cell proliferation was reduced by 50 nM si- $\alpha 2\delta 2$ as compared to si-ctl conditions. Kinetic experiments (Figure 4A) indeed illustrate that si- $\alpha 2\delta 2$ has a significant inhibitory effect on cell proliferation only after 3 days incubation and reaches its maximal action after 5 days (inducing a 40% reduction

in cell proliferation). FACS analysis of cell cycle shows that this inhibitory action of si- $\alpha 2\delta 2$ on cell proliferation was correlated to an increased number of cells in G1 phase together with a decrease in cells in G2/M and S phase (Figure 4B). We therefore tested gabapentin, which is known to inhibit various voltage-dependent calcium channels through its action on $\alpha 2\delta$ regulatory subunit, on cell proliferation. Indeed, gabapentin has been shown to be a ligand of both $\alpha 2\delta 1$ and $\alpha 2\delta 2$ subunits (22). In our experiments, gabapentin, when added in the cell culture medium at 100 μM , reduced cell proliferation by about 35% after 48h incubation (Figure 4C). Gabapentin-induced inhibition then slightly decreased down to 20% after 4 days, which may be due to gabapentin desensitization. LNCaP clones stably overexpressing $\alpha 2\delta 2$ were similarly used in cell proliferation assays. We show (figure 4D) that two different $\alpha 2\delta 2$ overexpressing LNCaP clones (C9 and C11) displayed faster rates of proliferation than control LNCaP cells, with doubling time of 47,5 hours for LNCaP against 40,5 hours for clone 9 and 36 hours for clone 11. We then carried out immunofluorescence experiments using Ki-67 staining (Figure 4E) on LNCaP and LNCaP overexpressing $\alpha 2\delta 2$ (clone 11). Ki-67 is a marker of proliferating cells. It is only expressed in phases G1, S, G2 and M and cells in G0 phase do not express significant levels of Ki-67. It can either exhibit punctuate nuclear localization in G1 and S phase or a more homogeneous localization in the nucleus during G2 and M phase. We demonstrate here that $\alpha 2\delta 2$ is associated with a decrease in the number of cells in G0 phase of the cell cycle. In our experiments, non proliferating cells represent 35.6 ± 1.6 % of the whole LNCaP cell population whereas they represent only 21.6 ± 3.5 % of the whole LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cell population, this being correlated with an increase in the number of cells in G1/S and G2/M phases of the cell cycle in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells. Altogether, these results show that $\alpha 2\delta 2$ enhances LNCaP cell proliferation.

Overexpression of $\alpha 2\delta 2$ promotes in vivo tumor development, blood vessel formation and VEGF secretion

We conducted *in vivo* experiments on immunodeficient nude mice. Mice were injected on both flanks with either wild-type LNCaP cells, LNCaP cells transfected with an empty pcDNA3 plasmid (LNCaP-Neo) or with LNCaP cells overexpressing $\alpha 2\delta 2$ (Figure 5). Tumor size, which was measured twice a week, usually began to increase after 4-7 weeks delay. The delay was a little bit longer in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors (49.5 ± 3 , 34.5 ± 3.5 , 37.8 ± 2.8 days for LNCaP- $\alpha 2\delta 2$, LNCaP-ctl and LNCaP-Neo, respectively). Once the tumors were detectable, they grew with a doubling time of 12.2 ± 1.9 days in LNCaP tumors and 10.7 ± 1.2 days for LNCaP-neo tumors to reach an average size of 940 ± 146 mm³ (1.26 ± 0.22 g). On their part,

LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors grew with a doubling time of 8.3 ± 0.8 days to reach a size of 1760 ± 154 mm³ (2.3 ± 0.21 g) after 11 weeks. In the different tumors, maximum tumor size was reached usually 4 weeks after the onset of tumor growth in each mouse. Altogether, LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors grow faster and reach larger size than LNCaP tumors and LNCaP-Neo tumors. We have tested on another lot of animals the effect of gabapentin on LNCaP tumor development. As seen on Figure 5, gabapentin consumption from the onset of the experiment considerably slowed the tumoral development.

Both LNCaP and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors (Figure 6), which can also be seen on figure 5A, were highly irrigated, and were characterized by abundant blood vessels but also by signs of hemorrhages with leakage of red blood cells in surrounding tissues and numerous foci of inflammation and necrosis. We did not detect any significant differences in necrosis between LNCaP and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors. On the contrary, PCNA immunofluorescence studies, which allow identification of cells in S phase of the cell cycle, show that there are more proliferating cells in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors than in control tumors *in vivo* (Figure 6C).

In addition, histological slides show that there are more blood vessels in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors than in LNCaP tumors (see figure 6Aa and 6Ab). We thus stained blood vessels with CD31 (Figure 7A and B), which is a marker commonly used to stain endothelial cells and to detect angiogenesis in tumors. We show that there is a two fold increase in surface stained by CD31 in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors as compared to LNCaP tumors (Figure 7C). This was confirmed using western blots experiments which demonstrate that there is a 50% increase in CD31 expression in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors (Figure 8A).

Since $\alpha 2\delta 2$ is associated with blood vessels formation, we measured VEGF expression and secretion in prostate cells and tumors. As shown on figure 8A, western blot experiments demonstrate that VEGF expression was slightly but significantly increased in tumors overexpressing $\alpha 2\delta 2$. ELISA assays of VEGF were thus performed to assess whether its secretion *in vitro* is altered in LNCaP cells overexpressing $\alpha 2\delta 2$. As shown on Figure 8B, ELISA tests show that overexpression of $\alpha 2\delta 2$ significantly enhances VEGF secretion in two different clones of LNCaP- $\alpha 2\delta 2$.

Implication of $\alpha 2\delta 2$ in other tissues

In order to assess the potential relevance of $\alpha 2\delta 2$ in tumorigenesis in other tissues, we compared the expression of $\alpha 2\delta 2$ on tissue macroarrays in other cancer tissues (lung, breast and colon). We show that $\alpha 2\delta 2$ is consistently expressed in lung, breast and colon cancer tissues and that stained surface is increased in cancer *vs* normal tissues (Figure 9). In addition,

we carried out RT-PCR in different pancreatic cell lines. Our results show that $\alpha 2\delta 2$ is expressed in pancreatic tumorigenic carcinoma cell lines (ASPC1, BxPC3, Capan1, MiaPaca2, Panc1) but not in human nontumorigenic immortalized pancreatic ductal H6c7 epithelial cell line (figure 9).

Discussion

We demonstrate for the first time in this study that $\alpha 2\delta 2$, which has been previously shown to regulate voltage-dependent calcium channel activity and is therefore suspected to be a calcium channel accessory subunit (23), is able by itself to promote cell proliferation *in vitro* and tumorigenesis *in vivo*.

We first demonstrate by RT-PCR, western blot and immunofluorescence that $\alpha 2\delta 2$ is expressed in prostate cancer cell lines and that $\alpha 2\delta 2$ is more frequently expressed in cancer tissues than in non cancerous prostate tissues obtained from surgical human samples. In addition, immunohistochemical experiments illustrate that $\alpha 2\delta 2$ is expressed mainly in the epithelial component of the prostate, and that the surface of tissues immunoreactive to anti- $\alpha 2\delta 2$ antibody, together with staining intensity, therefore the expression of $\alpha 2\delta 2$, is increased in cancer tissues compared to normal tissues. This result was quite unexpected at the onset of this study because other publications have shown that the gene coding for this protein (CACNA2D2) is located in the 3p21.3 chromosomal region which is a tumor suppressor gene cluster (14). It has been shown that this region may be deleted or hypermethylated in various cancer such as lung or pancreatic cancers (15). In addition, CACNA2D2 promotes apoptosis in non-small cell lung cancer cells (19) and reduces tumor growth in nude mice. However, some studies have shown that CACNA2D2 itself is not hypermethylated. In a recent study, it was even shown that CACNA2D2 is overexpressed in breast cancer cell lines compared to non-tumorigenic cell lines (24). Since we show that it may be overexpressed in a variety of cancer cells (prostate, breast, pancreas, lung, colon), CACNA2D2 may possess oncogenic properties. It is interesting to note that another protein of the same family, the $\alpha 2\delta 1$ subunit (CACNA2D1) has been recently shown to be expressed on liver cancer stem cells and that RNAi knock-down of $\alpha 2\delta 1$ expression reduces tumorigenicity in cancer liver cells (25), suggesting that different proteins of the CACNA2D family may have oncogenic properties.

The CACNA2D2 gene may therefore, according to the tissues or circumstances, behave as a tumor suppressor gene or an oncogen. Such a property is known for various genes such as REST (Repressor Element-1 (RE-1) Silencing Transcription (REST) factor), which acts as on

oncogen in neural cells or a tumor suppressor gene in breast or lung (26), or other transcription factors such as WT1, KLF4, SnoN, and Runx (for review see (26)). RASFF1 gene has also been reported to display both oncogenic and tumor suppressive properties in lung neuroendocrine tumors (27), depending on the expressed isoform. Interestingly, RASFF1 gene is located in the same 3p21.3 locus as CACNA2D2.

In vitro experiments have been carried out using various proliferation assays (manual cell counting, MTS assay, FACS and Ki67 staining) and all the methods used here converge towards the same results, *i.e.*, that $\alpha 2\delta 2$ by itself activates cell proliferation in prostate cancer LNCaP cells, decreasing the number of cells in G₀ and G₁ phases and increasing the proportion of cells in S and M phases. This was demonstrated using overexpression studies, siRNA strategy and ligand (gabapentin)-inhibition of $\alpha 2\delta 2$. Furthermore, we demonstrate that $\alpha 2\delta 2$ overexpression is associated with VEGF secretion *in vitro* and blood vessel formation *in vivo*. We thus suggest that $\alpha 2\delta 2$, through a stimulation of VEGF secretion, promotes angiogenesis. Therefore, both proliferative and angiogenic actions of $\alpha 2\delta 2$ may be responsible for $\alpha 2\delta 2$ -induced tumor development in mice xenografts. In addition, we show that gabapentin, a known ligand of $\alpha 2\delta 2$, reduced tumor size in mice xenografts, confirming that $\alpha 2\delta 2$ may be involved in tumor development.

It has been proposed that $\alpha 2\delta 2$ is a voltage-dependent calcium channel subunit and could regulate both targeting and activity of $\alpha 1$ pore subunits. Indeed, as shown by Hobom et al (28) coexpression of $\alpha 2\delta 2$ with Cav1.2 or Cav2.1 channels (together with β subunits) increased the calcium current density and shifted the *I-V* curve to hyperpolarized potentials. In the presence of γ subunits, $\alpha 2\delta 2$ was also able to regulate Cav2.3 calcium channel (28). Concerning T-type calcium channels, it was shown that $\alpha 2\delta 1$ increased the current density of Cav3.1 (29). The authors suggested that $\alpha 2\delta 2$ interacts with Cav3.1 possibly by an improved targeting or stabilization of the calcium channel complex in some heterologous expression systems (29). In addition, Hobom and coworkers demonstrated a slight action of $\alpha 2\delta 2$ on T-type current through Cav3.1 channels (28). Since prostate cancer cells express functional Cav3.2 T-type calcium channels (10), one may speculate that $\alpha 2\delta 2$ involvement in tumorigenesis relies on its interaction with Cav3.2 channels. However, various interacting domains have been demonstrated in $\alpha 2\delta 2$ which suggest that $\alpha 2\delta 2$ may interact with proteins other than calcium channels. Indeed, $\alpha 2\delta 2$ present a large C-terminal sequence that protrudes in the extracellular environment which could serve to interact with proteins other than calcium channels. For example, the VWF domain (30) which is present in this extracellular domain may participate in the interaction with the extracellular matrix. This extracellular domain may also serve as a

receptor to extracellular ligands such as Thrombospondin 1(31-32). Thrombospondin have themselves been shown to control angiogenesis through their interaction with their numerous receptors (33). While TSP1 may inhibit angiogenesis through their interaction with CD36 or VLDL-R membrane receptors, they can also promote angiogenesis after binding with $\alpha 3\beta 1$ integrins (33). It is therefore conceivable that $\alpha 2\delta 2$ promotes cell proliferation or angiogenesis through a signalling pathway which does not involve voltage-dependent calcium channels. We will thus investigate whether $\alpha 2\delta 2$ subunits could regulate angiogenesis in response to TSP1 binding.

Altogether, our results suggest that $\alpha 2\delta 2$ is a potentially relevant marker of prostate cancer progression and could therefore be evaluated as relevant target in diagnosis assays. In addition, our experiments show that molecular or pharmacological inhibition of $\alpha 2\delta 2$ leads to a reduction of proliferation *in vitro*. It remains to determine whether such inhibition occurs through or is independent of voltage-dependent calcium channels. Since gabapentin and pregabalin are known ligands of $\alpha 2\delta 2$ already used in neurological diseases (22), it is conceivable that these ligands may also constitute the basis for alternative prostate cancer treatments in men.

Acknowledgments :

This work was supported by INSERM, the University Lille1 and the Region Nord-Pas de Calais.

References

1. Bidaud, I., Mezghrani, A., Swayne, L.A., Monteil, A., and Lory, P. 2006. Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim Biophys Acta* 1763:1169-1174.
2. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
3. Monteith, G.R., Davis, F.M., and Roberts-Thomson, S.J. 2012. Calcium channels and pumps in cancer: changes and consequences. *J Biol Chem* 287:31666-31673.
4. Lee, J.M., Davis, F.M., Roberts-Thomson, S.J., and Monteith, G.R. 2011. Ion channels and transporters in cancer. 4. Remodeling of Ca(2+) signaling in tumorigenesis: role of Ca(2+) transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C969-976.
5. Wang, X.T., Nagaba, Y., Cross, H.S., Wrba, F., Zhang, L., and Guggino, S.E. 2000. The mRNA of L-type calcium channel elevated in colon cancer: protein distribution in normal and cancerous colon. *Am J Pathol* 157:1549-1562.
6. Toyota, M., Ho, C., Ohe-Toyota, M., Baylin, S.B., and Issa, J.P. 1999. Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res* 59:4535-4541.
7. Fiske, J.L., Fomin, V.P., Brown, M.L., Duncan, R.L., and Sikes, R.A. 2006. Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25:493-500.
8. Kunzelmann, K. 2005. Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 205:159-173.

9. Bennett, E.S., Smith, B.A., and Harper, J.M. 2004. Voltage-gated Na⁺ channels confer invasive properties on human prostate cancer cells. *Pflugers Arch* 447:908-914.
10. Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M.F., and Prevarskaya, N. 2002. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:10824-10833.
11. Skryma, R., Van Coppenolle, F., Dufy-Barbe, L., Dufy, B., and Prevarskaya, N. 1999. Characterization of Ca(2+)-inhibited potassium channels in the LNCaP human prostate cancer cell line. *Receptors Channels* 6:241-253.
12. Spitzner, M., Ousingsawat, J., Scheidt, K., Kunzelmann, K., and Schreiber, R. 2007. Voltage-gated K⁺ channels support proliferation of colonic carcinoma cells. *Faseb J* 21:35-44.
13. Gackiere, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoi-Mariot, M.T., Mauroy, B., Prevarskaya, N., et al. 2008. CaV3.2 T-type Calcium Channels Are Involved in Calcium-dependent Secretion of Neuroendocrine Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem* 283:10162-10173.
14. Lerman, M.I., and Minna, J.D. 2000. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 60:6116-6133.
15. Ghosh, S., Ghosh, A., Maiti, G.P., Alam, N., Roy, A., Roy, B., Roychoudhury, S., and Panda, C.K. 2008. Alterations of 3p21.31 tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Correlation with progression and prognosis. *Int J Cancer* 123:2594-2604.
16. Wanajo, A., Sasaki, A., Nagasaki, H., Shimada, S., Otsubo, T., Owaki, S., Shimizu, Y., Eishi, Y., Kojima, K., Nakajima, Y., et al. 2008. Methylation of the calcium channel-related gene, CACNA2D3, is frequent and a poor prognostic factor in gastric cancer. *Gastroenterology* 135:580-590.
17. Mitra, R., Lee, J., Jo, J., Milani, M., McClintick, J.N., Edenberg, H.J., Kesler, K.A., Rieger, K.M., Badve, S., Cummings, O.W., et al. 2011. Prediction of postoperative recurrence-free survival in non-small cell lung cancer by using an internationally validated gene expression model. *Clin Cancer Res* 17:2934-2946.
18. Halatsch, M.E., Low, S., Mursch, K., Hielscher, T., Schmidt, U., Unterberg, A., Vougioukas, V.I., and Feuerhake, F. 2009. Candidate genes for sensitivity and resistance of human glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. Laboratory investigation. *J Neurosurg* 111:211-218.
19. Carboni, G.L., Gao, B., Nishizaki, M., Xu, K., Minna, J.D., Roth, J.A., and Ji, L. 2003. CACNA2D2-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity. *Oncogene* 22:615-626.
20. Chomczynski, P., and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
21. Zour, E., Lodhi, S.A., Nesbitt, R.U., Silbering, S.B., and Chaturvedi, P.R. 1992. Stability studies of gabapentin in aqueous solutions. *Pharm Res* 9:595-600.
22. Dooley, D.J., Taylor, C.P., Donevan, S., and Feltner, D. 2007. Ca²⁺ channel alpha2delta ligands: novel modulators of neurotransmission. *Trends Pharmacol Sci* 28:75-82.
23. Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A.T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A.C. 2007. Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 28:220-228.

24. da Costa Prando, E., Cavalli, L.R., and Rainho, C.A. 2011. Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines. *Epigenetics* 6:1413-1424.
25. Zhao, W., Wang, L., Han, H., Jin, K., Lin, N., Guo, T., Chen, Y., Cheng, H., Lu, F., Fang, W., et al. 2013. 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel alpha2delta1 subunit. *Cancer Cell* 23:541-556.
26. Negrini, S., Prada, I., D'Alessandro, R., and Meldolesi, J. 2013. REST: an oncogene or a tumor suppressor? *Trends Cell Biol.*
27. Pelosi, G., Fumagalli, C., Trubia, M., Sonzogni, A., Rekhman, N., Maisonneuve, P., Galetta, D., Spaggiari, L., Veronesi, G., Scarpa, A., et al. 2010. Dual role of RASSF1 as a tumor suppressor and an oncogene in neuroendocrine tumors of the lung. *Anticancer Res* 30:4269-4281.
28. Hobom, M., Dai, S., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F., and Klugbauer, N. 2000. Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel alpha2delta-2 subunit. *Eur J Neurosci* 12:1217-1226.
29. Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G., and Perez-Reyes, E. 1999. The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol* 519 Pt 1:35-45.
30. Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Hebllich, F., Wratten, J., Richards, M.W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K.M., Davies, A., et al. 2005. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11230-11235.
31. Eroglu, C., Allen, N.J., Susman, M.W., O'Rourke, N.A., Park, C.Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S.B., Annis, D.S., Huberman, A.D., et al. 2009. Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139:380-392.
32. Garcia, K., Nabhani, T., and Garcia, J. 2008. The calcium channel alpha2/delta1 subunit is involved in extracellular signalling. *J Physiol* 586:727-738.
33. Bornstein, P. 2009. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal* 3:189-200.

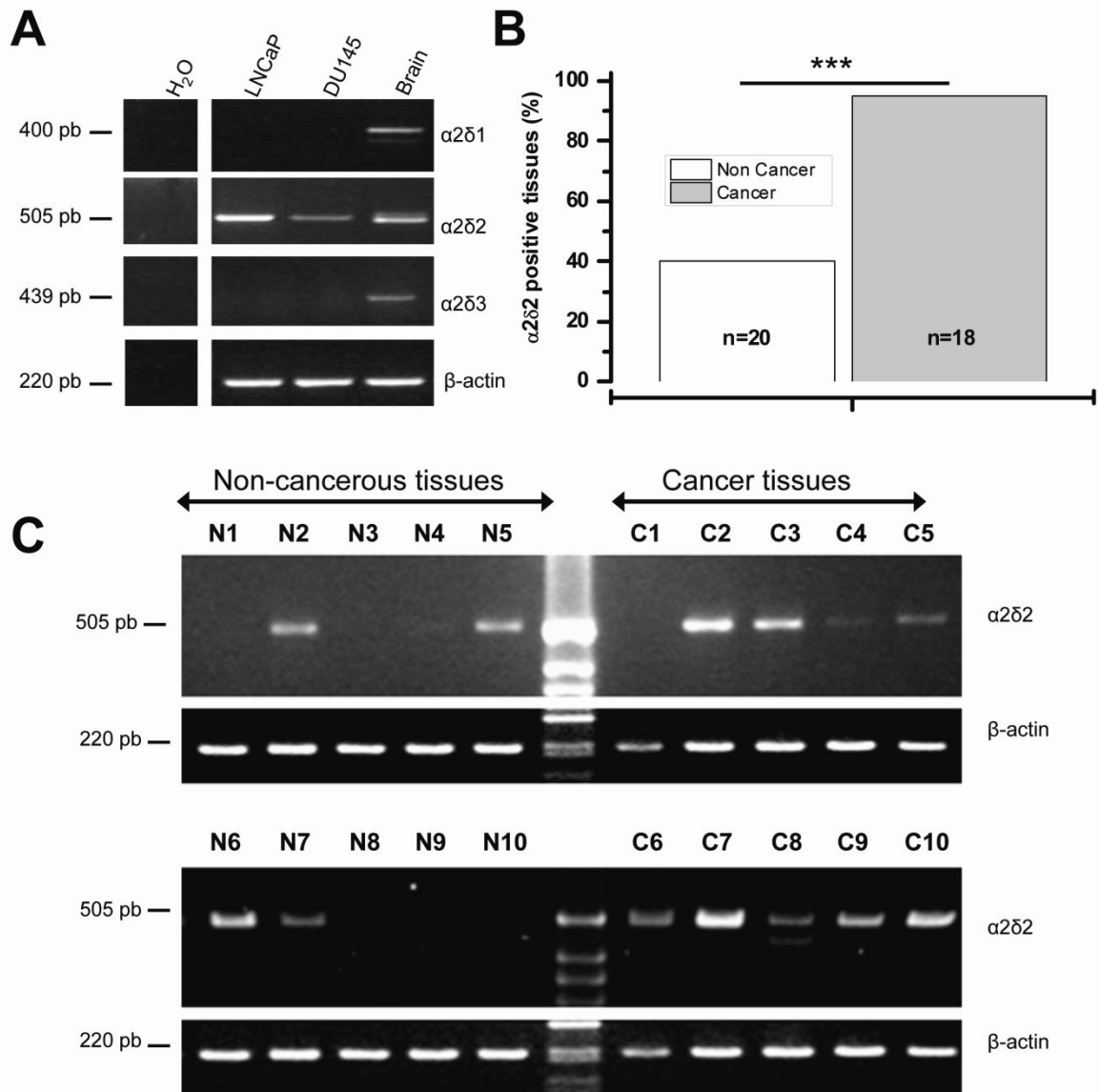


Figure 1: Expression of $\alpha 2\delta 2$ transcripts in prostate cells and tissues.

A) Prostate cancer LNCaP cell line screened by RT-PCR for the different members of the $\alpha 2\delta$ family. Only the $\alpha 2\delta 2$ transcript is detected in LNCaP cells at the expected size of 505 bp. **B)** Human prostate tissues were screened for the expression of $\alpha 2\delta 2$. Among the tested prostate samples (n=20 for non-cancer tissues, n=18 for cancer tissues), $\alpha 2\delta 2$ is more frequently expressed in cancer tissues. **C)** Examples of RT-PCR performed on non-cancer and cancer tissues (numbered from 1 to 10: N1 to N10 for normal and C1 to C10 for cancer).

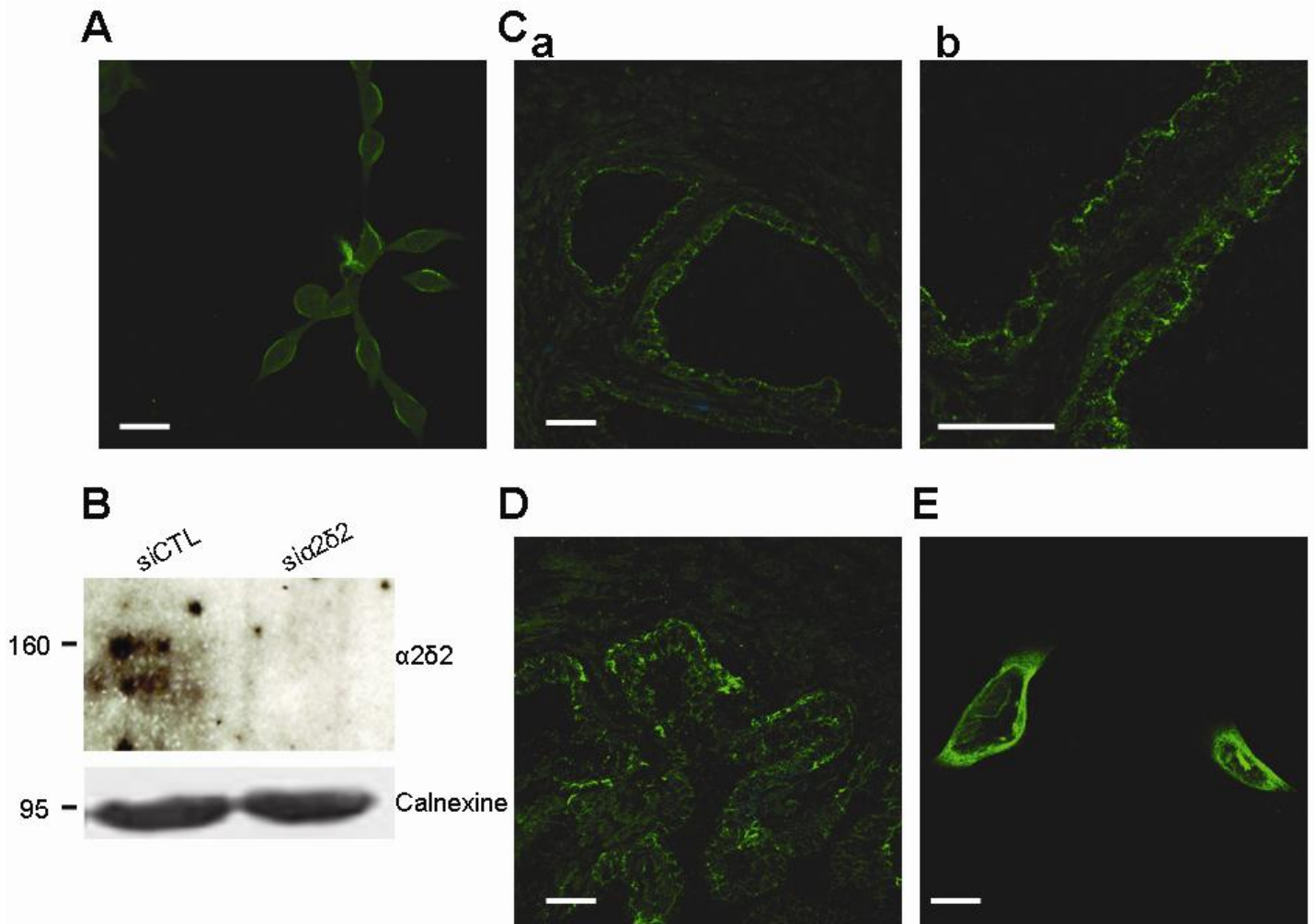


Figure 2: Expression of $\alpha 2\delta 2$ protein in prostate cells and tissues.

A) Confocal immunofluorescence experiments showing the expression of $\alpha 2\delta 2$ in LNCaP cells (*20 Objective). Staining is particularly pronounced at the cell periphery. **B)** Western-blot experiment showing that siRNA (50 nM-4 days) raised against $\alpha 2\delta 2$ effectively reduces the expression of $\alpha 2\delta 2$ in LNCaP cells, as compared to siCtl. $\alpha 2\delta 2$ protein is detected at the expected size of 160 kDa. **C)** Confocal immunofluorescence experiment showing the expression of $\alpha 2\delta 2$ in prostate hyperplastic tissues (**a** and **b**: different magnifications of the same field). **D)** Expression of $\alpha 2\delta 2$ in prostate cancer tissue. **E)** Expression of $\alpha 2\delta 2$ in prostate epithelial cancer cells in primary culture. Bar size: 40 μ M.

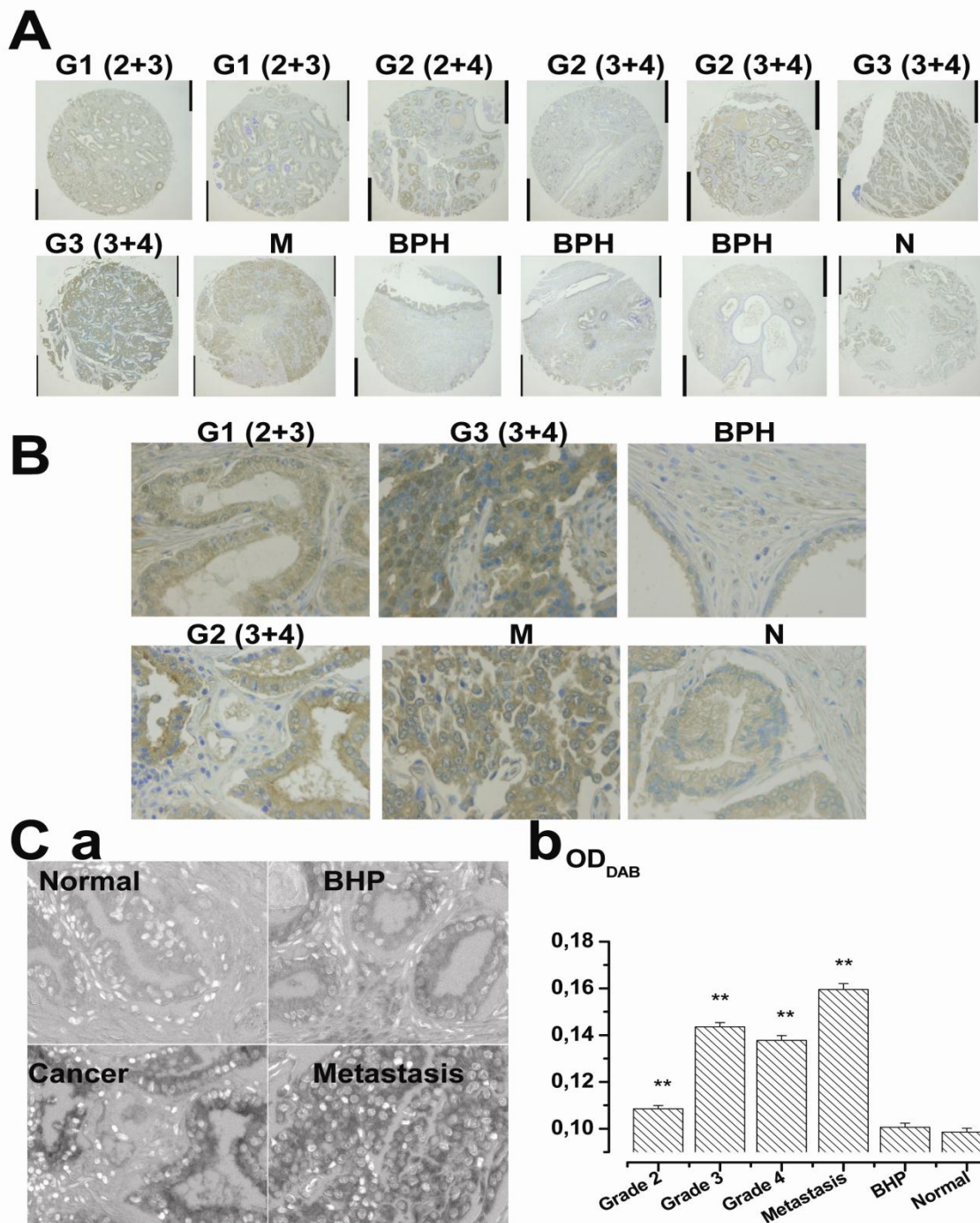


Figure 3: Immunohistochemical study of $\alpha 2\delta 2$ expression at different stages of prostate cancer.

A and B: Overview of prostate tissues showing different normal, hyperplastic and cancer tissues. (**A** : *5 Objective, **B** : *40 objective). Grade and Gleason Score are indicated on each picture. **M** : rectal metastasis, **BPH** : hyperplasia, **N** : normal prostate tissue. Immunohistochemical staining against $\alpha 2\delta 2$ was revealed using peroxidase-DAB reaction. **C**) Colour images were deconvoluted and intensity of cell staining was analysed and converted in optical density. **a**) As illustrated, OD is enhanced in cancer tissues in acini surrounding cells. **b**) Histogram showing the average OD for different cancer stages. The number of analysed cells for each bar was comprised between 143 and 882. OD was significantly increased in cancer tissues as compared to normal ones ($p < 0.01$, Dunnett test).

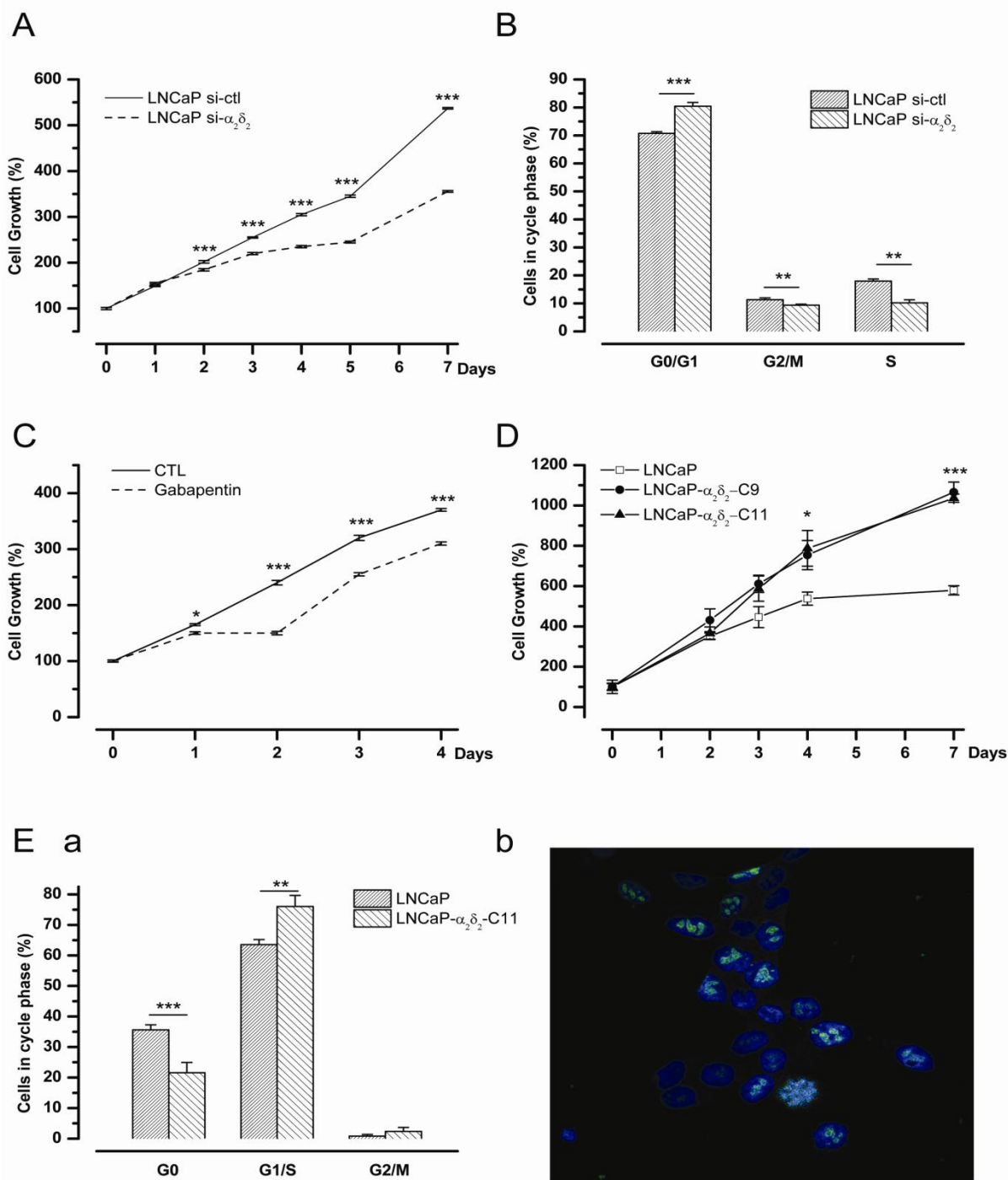


Figure 4: $\alpha_2\delta_2$ promotes cell proliferation in prostate cancer LNCaP cell lines.

A) A treatment with siRNA (50 nM) targeting $\alpha_2\delta_2$ (si- $\alpha_2\delta_2$) inhibits LNCaP cell growth as measured with MTS assay. Kinetic experiments show that inhibition by si- $\alpha_2\delta_2$ reaches its maximum (40%) 6 days after the onset of treatment. **B)** FACS analysis shows that treatments with si- $\alpha_2\delta_2$ increase the proportion of cells in G0/G1 phase while decreasing the proportion of cells in S and G2/M phases. **C)** Gabapentin (100 μ M), a ligand of $\alpha_2\delta_2$ reduces cell proliferation as measured by MTS assay. **D)** Kinetics of cell proliferation in two different clones of LNCaP cells overexpressing $\alpha_2\delta_2$ (LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ -C9 and LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ -C11). **E) a)** Bar representation of the proportion of LNCaP cells in G0, G1/S or G2/M phase as measured by Ki67 staining in LNCaP-ctl and LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ -C11 cells. **b)** Example of Ki67 immunostaining. The overexpression of $\alpha_2\delta_2$ reduces the number of cells in G0 phase while increasing the number of cells in G1/S phases.

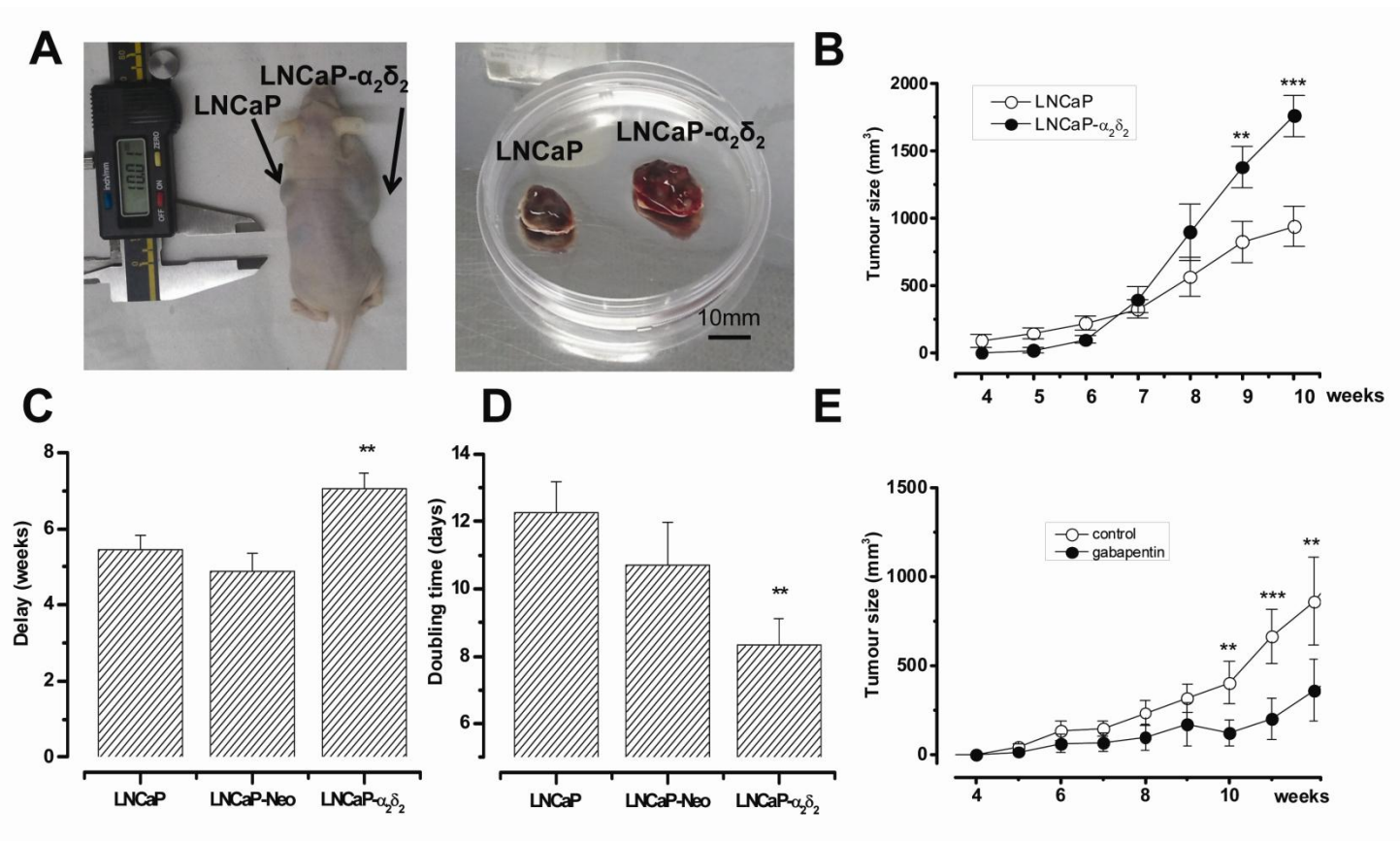


Figure 5: $\alpha 2\delta 2$ potentiates *in vivo* tumor growth.

A) Mice were injected on both flanks with either LNCaP, LNCaP-GFP or LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ cells. After sacrifice of the animals, tumors were extracted from the animals, weighed and prepared for RNA or protein extraction or immunohistochemistry. **B)** Kinetics of tumor growth in both control and $\alpha 2\delta 2$ tumors. **C)** Bar plot of the delay before the development of detectable tumors (more than 100 mm³) in LNCaP-control, LNCaP-Neo and LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors. **D)** Average doubling time was decreased in LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ tumors as compared to LNCaP-control and LNCaP-Neo tumors. **E)** Administration of Gabapentin in drinking water (400 mg/l) from the onset and during all the experiment decreased the average kinetic of LNCaP tumor development.

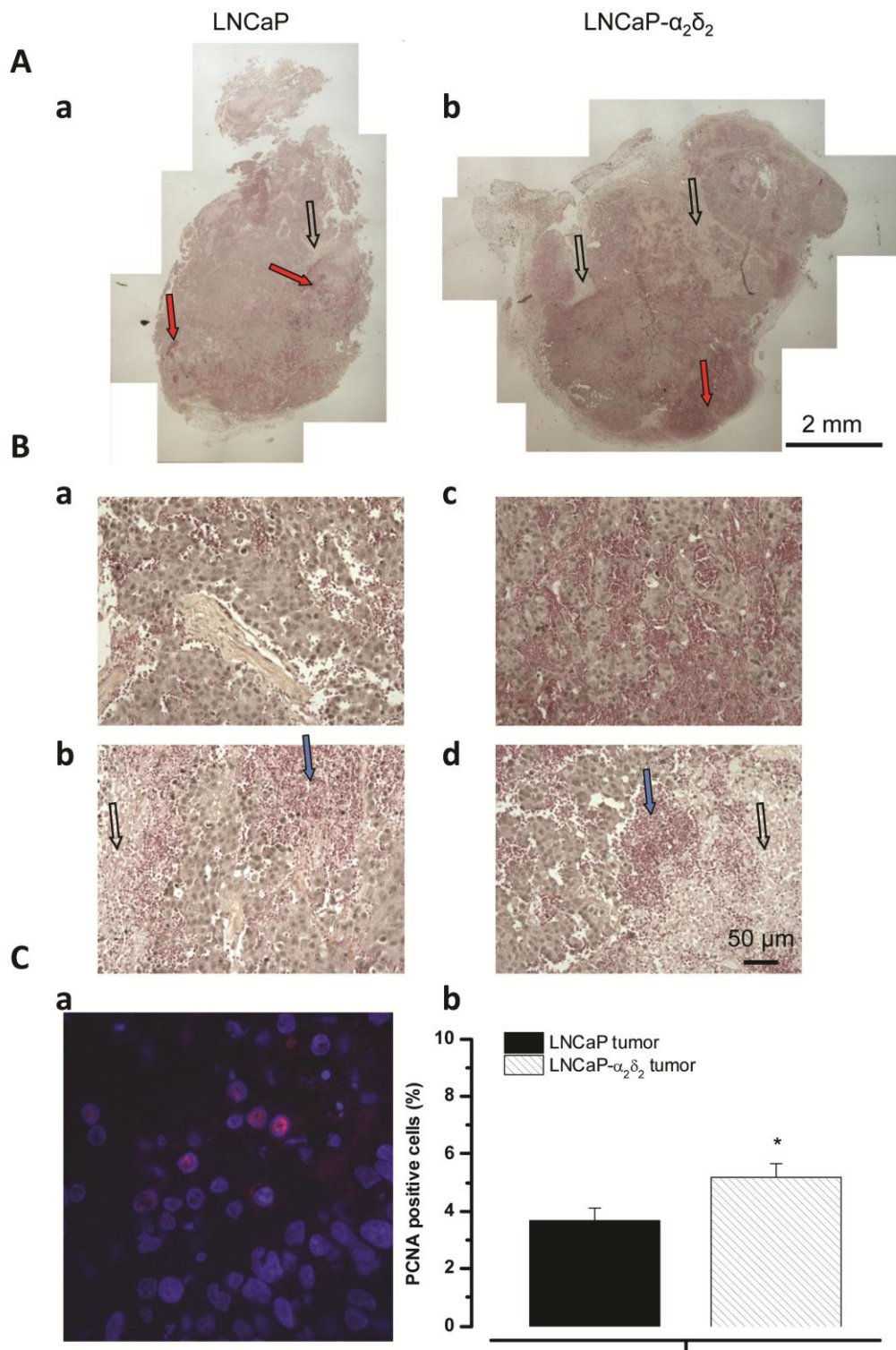


Figure 6: Histology of LNCaP tumors.

A) Low magnification view (*5) of a control LNCaP tumor (**a**) and a LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ tumor (**b**). **B)** Different views of a control LNCaP tumor (**a**) and an LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ tumor (**c**) at higher magnification (*20). Numerous foci of necrosis and inflammation or haemorrhages could be observed in tumors (**b**-LNCaP and **d**-LNCaP- $\alpha_2\delta_2$). **C)** PCNA immunofluorescence (**a**) and quantification of the percentage of PCNA positive nuclei normalized to the total number of nuclei (DAPI) (**b**). Red arrows: examples of haemorrhages and leakage of red blood cells. Blue arrows: inflammatory cells. Black arrows: necrosis sites.

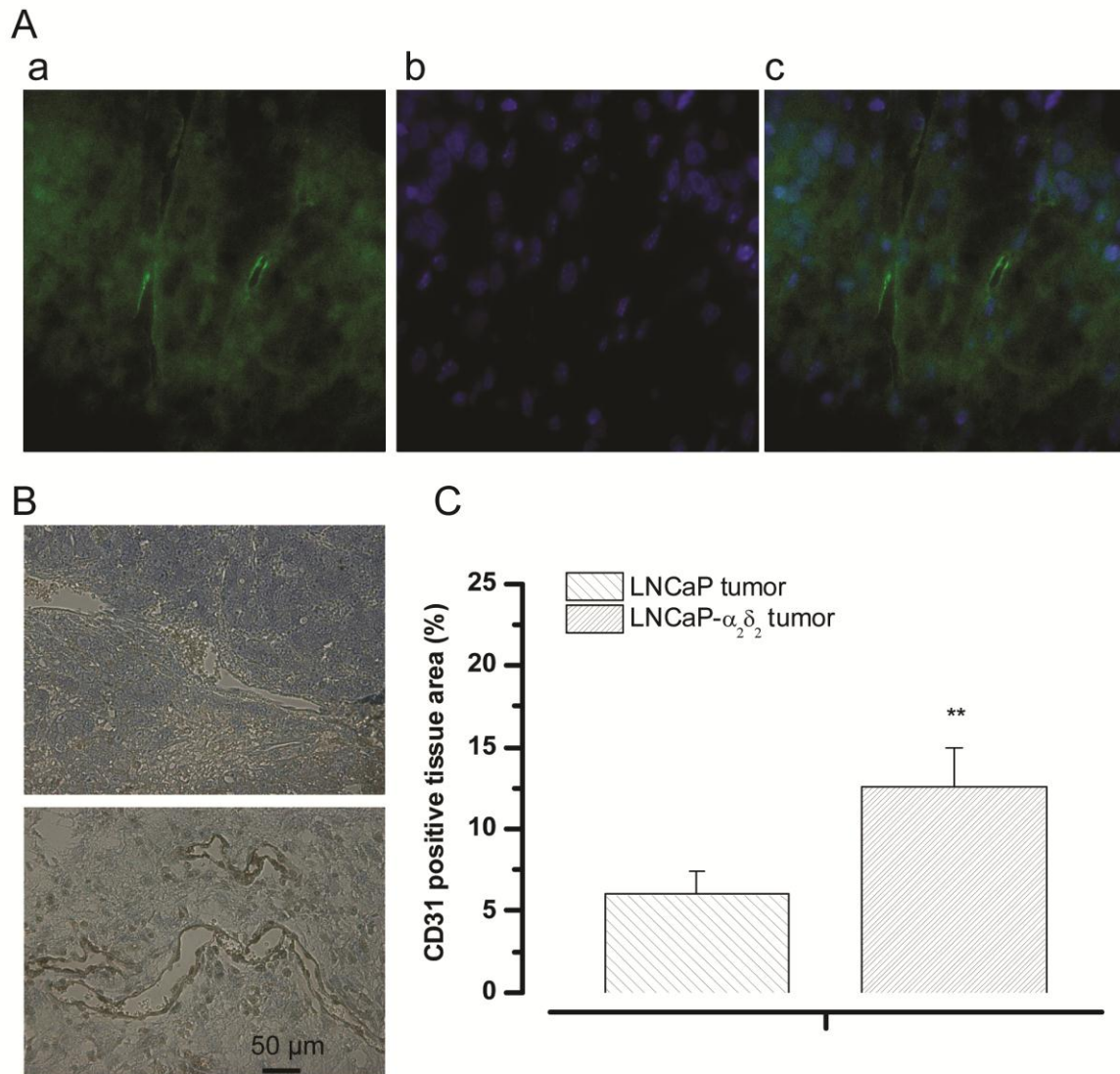


Figure 7: $\alpha_2\delta_2$ promotes blood vessel formation in xenografted LNCaP tumors.

A) Immunofluorescent identification of CD31 (**a**: $\alpha_2\delta_2$ (green), **b** : DAPI (blue), **c** : overlay of DAPI and $\alpha_2\delta_2$). **B)** Immunohistochemical (peroxydase/DAB) staining of CD31 (top panel : LNCaP tumor, bottom pane : LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ tumor). **C)** CD31 positive area in LNCaP and LNCaP- $\alpha_2\delta_2$ tumors.

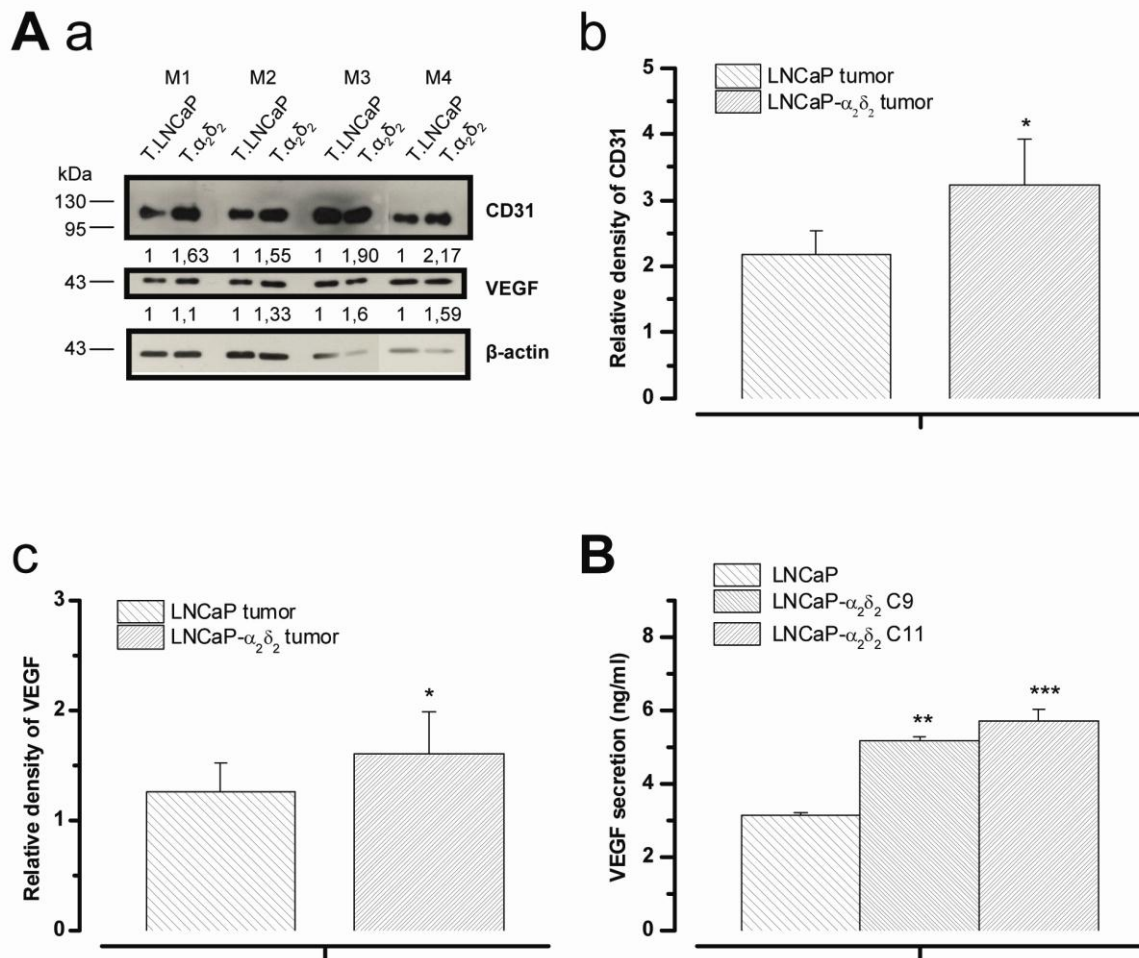


Figure 8: α₂δ₂ promotes angiogenesis through VEGF secretion.

A) a) examples of western blots of CD31 and VEGF in 8 different tumors (LNCaP tumors: T-LNCaP, LNCaP-α₂δ₂ tumors: T-α₂δ₂) coming from 4 different mice (Mx). **b)** Relative density of CD31 bands (normalized to β-actin) observed in western blots (all tumors: 10 tumors of each). **c)** Relative density of VEGF bands (normalized to β-actin) observed in western blots (all tumors: 10 samples of each tumor). **B)** VEGF secretion measured using ELISA assay in LNCaP cells and LNCaP cells overexpressing α₂δ₂ (clone C9 and C11). Overexpression of α₂δ₂ was associated with an increased secretion of VEGF.

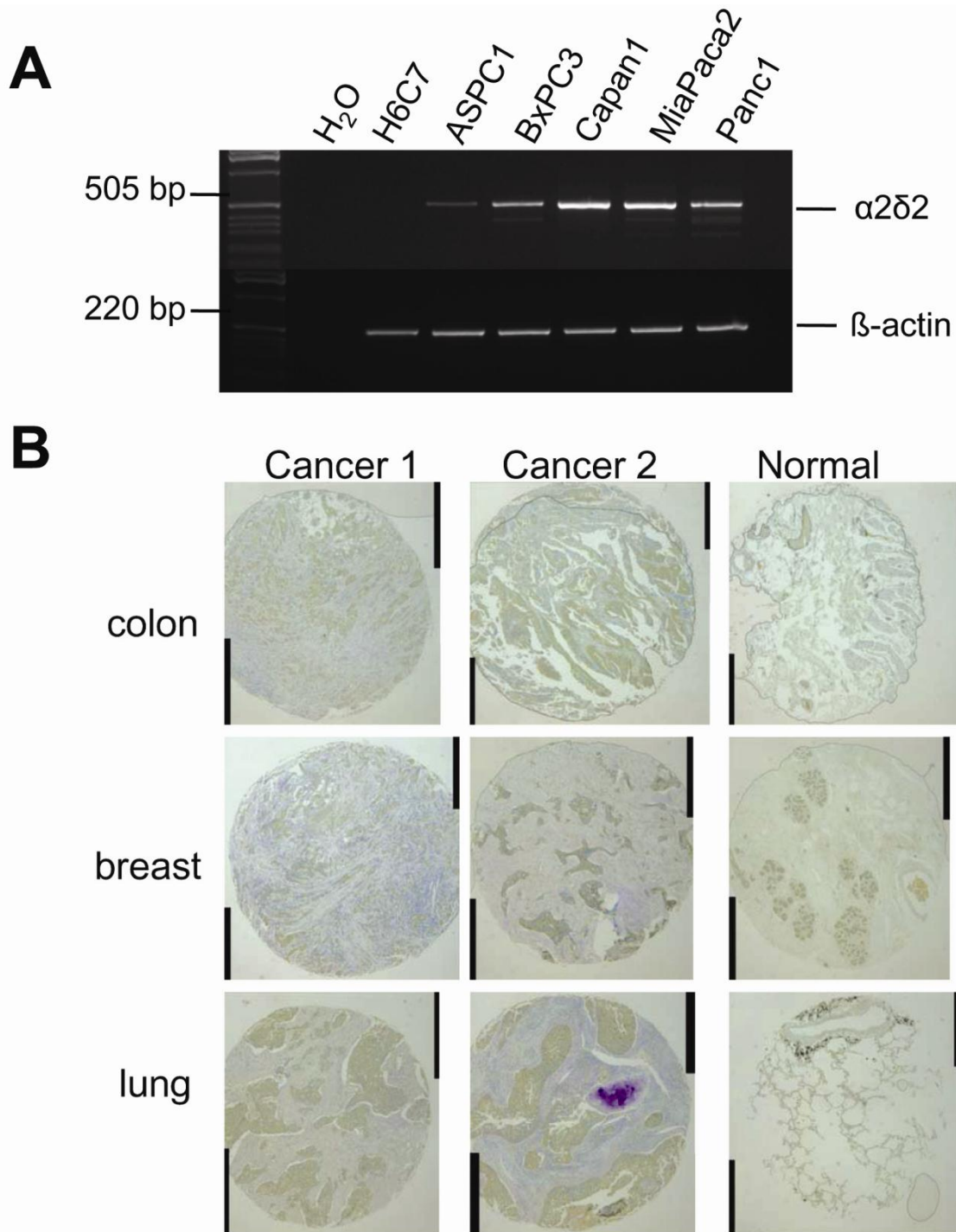


Figure 9: Expression of $\alpha 2\delta 2$ in non prostatic cancer tissues (breast, lung and colon).

A) RT-PCR carried out in 6 pancreatic cell lines, a human immortalized, nontumorigenic pancreatic ductal epithelial cell line, H6c7 and 5 tumorigenic carcinoma cell lines ASPC1, BxPC3, Capan1, MiaPaca2, Panc1. $\alpha 2\delta 2$ transcript was present only in carcinoma cell lines.

B) Immunohistochemical staining against $\alpha 2\delta 2$ was revealed using peroxidase-DAB reaction in breast, lung and colon cancer and normal tissues.

Article 4

"Role of T-type calcium channels in neuroendocrine differentiation"

Marine Warnier, Florian Gackière, Morad Roudbaraki and Pascal Mariot

In "T-type calcium channel in basic and clinical science" Springer, Schaffer, Stephen W.; Wu, Songwei; Li, Ming (Eds.) Sous presse

Les cellules neuroendocrines sont capables de libérer leurs produits de sécrétion dans le milieu extracellulaire en utilisant une voie calcium dépendante. De plus ces cellules sont caractérisées par des particularités morphologiques et moléculaires. En effet, celles-ci possèdent des expansions de type neurites et des granules de sécrétion à cœur dense qui contiennent des substances semblables aux neurohormones comme la calcitonine mais aussi des monoamines telles que la sérotonine (Sun et al., 2009). De plus, ces cellules ont la particularité d'exprimer des biomarqueurs spécifiques tels que la Neuron-Specific-Enolase (NSE), la synaptophysine et les chromogranines A et B (Abrahamsson, 1999). Dans la prostate humaine, les cellules neuroendocrines sont dispersées dans l'épithélium normal représentant jusqu'à 2% de la population cellulaire totale (Abrahamsson, 1999). Cependant, leur densité est augmentée dans les cancers hormono-indépendants, ceci étant associé à un mauvais pronostic. La présence de ces cellules dans les cancers prostatiques entraîne une diminution du taux de survie, avec seulement 35% de survie sur 2 ans, alors que ce taux est de 97 % lorsque les cellules neuroendocrines sont absentes des carcinomes prostatiques (Ranno et al., 2006). Une étude du laboratoire a montré que les cellules cancéreuses prostatiques neuroendocrines exprimaient le canal calcique de type T, $Ca_v3.2$ (Mariot et al., 2002). De plus, dans ces cellules, le canal $Ca_v3.2$ participe à la sécrétion de phosphatase acide prostatique (Gackiere et al., 2008). En revanche, si ce canal est surexprimé lors de la différenciation neuroendocrine, son rôle dans le processus de différenciation lui-même est mal connu. Une étude du laboratoire a ainsi montré que si le canal $Ca_v3.2$ participe à l'élongation des neurites, son activité n'est pas indispensable au processus de différenciation morphologique (Mariot et al., 2002). D'autre part, son rôle dans l'expression de marqueurs neuroendocrines n'est pas connu.

Dans ce travail, nous avons fait une revue de la littérature concernant l'importance des canaux calciques de type T dans le processus de différenciation neuroendocrine. Nous apportons d'autre part des informations complémentaires concernant le rôle de $Ca_v3.2$ dans la différenciation neuroendocrine des cellules prostatiques cancéreuses. Nous montrons par western-blot et immunofluorescence que l'expression des marqueurs de différenciation NSE et Chromogranine A augmente dans les clones de surexpression, LNCaP- $Ca_v3.2$. De la même manière, un traitement par siARN dirigé contre le canal $Ca_v3.2$ réduit l'expression de NSE dans les cellules différenciées (LNCaP-NE). De plus, la diminution du niveau d'expression du PSA observée dans les cellules LNCaP-NE est retrouvée dans les clones LNCaP- $Ca_v3.2$ (Données supplémentaires, Figure 29). Enfin, nous montrons que l'expression d' $\alpha2\delta2$ augmente lors de la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP (Données supplémentaires, Figure 30). Ces résultats suggèrent l'implication du canal $Ca_v3.2$ dans le processus de différenciation.

Role of T-type calcium channels in neuroendocrine differentiation

Marine Warnier, Florian Gackière, Morad Roudbaraki and Pascal Mariot

Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Inserm U1003, Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Université des Sciences et Technologies de Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Abstract

Neuroendocrine cells release their secretory products into the extracellular environment using a calcium-dependent pathway and are characterized by common morphological and molecular features. Indeed, these particular cells share the expression of specific biomarkers, neurite outgrowth or dense core secretory granules. In order to elucidate those signalling pathways leading to the differentiation into neuroendocrine cells from undifferentiated cells, the role of voltage-dependent calcium channels, central actors in the excitation-secretion coupling, has been comprehensively investigated. T-type calcium channels, comprising three different molecular isoforms, appear to be one of the important calcium channel families involved in the neuroendocrine differentiation process and may participate in the development of neuroendocrine tumours.

Introduction

Neuroendocrine (NE) cells produce and release (neuro)hormones, neuropeptides or monoamines in the extracellular milieu using a regulated pathway, in other words in response to a specific stimulus. The NE system includes specific organs, where cells are organized into secreting tissues (adrenals or pituitary for instance) and a diffuse system, where endocrine cells are scattered in an apparently disorganized pattern among non-secretory cells. This diffuse NE system (DNES) was originally identified in organs such as the lung or the gut. NE cells include both neuron-like cells and endocrine cells which are all characterized by common morphological and molecular features, like the expression of specific markers such as neuropeptides, granins, neuritic extension or dense core secretory granules. During their development, NE cells follow a differentiation pathway which, if faulty, may participate in the development of NE tumours (NET). It is therefore of particular importance to decipher the mechanisms involved in NE differentiation which are required to generate neurohormone-releasing cells.

1. Features of NE cells and NE differentiation.

From a historical point of view, the concept of NE cells derives from the seminal works of Heidenhain, Kulchitsky, Masson and Hamperl in the late 19th century and the early 20th century. These works demonstrated, from the ability of cells to be stained by silver salts (argentaaffinity or argyrophily), the existence of dispersed hormone-secreting cells in non-endocrine tissues such as the intestine (for a review see (DeLellis 2001)). Using histological techniques, Feyrter and Froelich (Feyrter 1938; Froelich 1949) identified the existence of many clear cells (Hellen Zellen) throughout the body and noticeably in the gut, leading to the concept of DNES. Among such miscellaneous sites, they were identified in the prostate in 1944, where they are dispersed in the normal epithelium, representing only about 0.5 to 2 % of the total cell population (Pretl 1944). Anton Pearse then defined NE cells as cells sharing the common ability to uptake and decarboxylate amine precursors, to convert these precursors into biogenic amines and neurotransmitters. From this property, Pearse (Pearse 1968) coined the APUD system (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). NE cells were all initially thought to originate only from neuroectoderm (neural crest) and were thus also termed paraneurons (Fujita et al. 1980). However, subsequent studies showed that some of them did not derive from the neural crest. These include pancreatic endocrine cells (Le Douarin 1988) or gastrointestinal enterochromaffin cells (Andrew 1974; Sidhu 1979), which originate from endodermal tissues.

NE cells are usually characterized by various functional, morphological and molecular features (for a review see (Day and Salzet 2002)). A NE cell is characterized in electron microscopy by the presence of electron-dense secretory granules containing peptidergic and aminergic neurohormones. NE cells possess the capability to rapidly release their neurohormones or neurotransmitters in response to specific stimuli, such as other hormones. In this context, the acquisition of cell excitability, characterized by action potentials and voltage-dependent ion channels, is an important step towards the acquisition of a regulated secretory pathway. Morphologically, the acquisition of an NE phenotype is usually accompanied by the lengthening of neuritic extensions. NE cells therefore share many features with neurons, but do not have specialized nerve terminals or axons. From a molecular point of view, NE cells express specific proteins that may also be expressed by neurons or even by non-neuronal cells. Among these NE markers are the members of the granin family, chromogranin A and B (CgA and CgB), secretogranin II, III and VII. These acidic soluble proteins are stored with neuropeptides and neurotransmitters in dense-core vesicles. Other markers of NE differentiation are the enzymes Prohormone Convertases PC1/3 and PC2, which process various protein precursors, including granins, into functional hormones (Seidah 2011). Like granins and neuropeptides, Prohormone Convertases are stored in dense-core vesicles where they exert their proteolytic activity. These enzymes have therefore been considered as good markers of NE phenotype or differentiation (Bergeron et al. 2000). These common markers, along with others (neuron-specific enolase (NSE), synaptophysin, S100), are used in pathology to identify NE tumours.

2. Activation of NE differentiation

2.1. Cell Models

NE differentiation leads to cell phenotypes sharing characteristic features of both developing neurons (neurite extension, neuronal markers, synaptic-like vesicles) and endocrine cells (secretory granules, neurohormones). Therefore, NE differentiation has been investigated using various cell models.

One of the most studied cell models for NE differentiation is the PC12 cell line, which is a valuable model for neurosecretion studies (Westerink and Ewing 2008). Like normal chromaffin cells, PC12 cells synthesize and release monoamines such as dopamine and noradrenaline, in a calcium-regulated manner. Upon stimulation for several days with Nerve Growth Factor (NGF), PC12 cells differentiate into neuronal-like cells (Greene and Tischler 1976). Morphological differentiation characterized by neuritic extension, is associated with

reduced or halted proliferation and with increased tyrosine hydroxylase activity. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) also leads to NE differentiation characterized by similar features (for a review see (Ravni et al. 2006)). Furthermore, NE differentiation can be induced in these cells by dexamethasone, a potent synthetic glucocorticoid, which induces the overexpression of tyrosine hydroxylase, leading to a chromaffin phenotype, potentiating calcium-dependent exocytosis through an increase in vesicle content and calcium channel coupling to release sites (Elhamdani et al. 2000).

The LNCaP prostate cancer cell line is also a model of choice for studying NE differentiation. The first study showing LNCaP cell differentiation towards a NE phenotype demonstrated that permeant analogues of cyclic AMP (cAMP) could promote neurite extension and the expression of NE markers, CgA, NSE and S100 protein (Bang et al. 1994). As in PC12 cells, NE differentiation was associated in LNCaP cells with an enhanced survival and a lower proliferation rate. NE differentiation was later shown to be induced in LNCaP cells by the depletion of steroid (Shen et al. 1997; Yuan et al. 2006), or by the addition of interleukins 1, 2 or 6 (Diaz et al. 1998; Mori et al. 1999) to the culture medium. Various neuropeptides also promote NE differentiation of LNCaP cells, such as Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) (Collado et al. 2004; Collado et al. 2005; Gutierrez-Canas et al. 2005), PACAP (Farini et al. 2003), melatonin (Sainz et al. 2005) or adrenomedullin (Berenguer et al. 2008).

LNCaP and PC12 cells thus share many common features that make them valuable and easy-to-use cell models for studying NE differentiation. Nonetheless, they are each characterized by specific differentiation patterns. For example, NGF, which is a good inducer of NE differentiation in PC12 cells, does not promote a neuronal phenotype in prostate cancer cells (Angelsen et al. 1998).

In addition to these two cell lines, a number of other cell models have been used to study an important aspect of neuronal differentiation, *i.e* neuritogenesis, notably neuroblastoma cell lines, retinoblastoma cell lines, embryonic stem cells or neurons (Hirooka et al. 2002; Kushmerick et al. 2001; Tojima et al. 2000).

2.2. Signalling pathways

This topic falls beyond the purpose of this review. Therefore, only the main signalling pathways common to LNCaP and PC12 cells will be rapidly described here. Some of the pathways leading to NE differentiation are depicted in Figure 1.

In both cell lines, the activation of a cAMP-dependent pathway is clearly shown to induce a neuronal phenotype. In LNCaP cells, the induction of a neuronal phenotype by stimuli raising

the cytosolic cAMP concentration clearly depends on cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Cox et al. 2000). cAMP-dependent pathway was later shown to involve the activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) pathway (Deeble et al. 2001), which then phosphorylates downstream targets like the cAMP responsive element binding protein (CREB) (Farini et al. 2003). The activation of the ERK1/2 pathway by heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) also induces NE differentiation of LNCaP cells (Kim et al. 2002). In PC12 cells, it has been shown that specific stimulation of EPAC (exchange proteins activated by cAMP) promotes neuritogenesis, whereas specific PKA activation leads to the ERK1/2 pathway and cell proliferation (Kiermayer et al. 2005). On the other hand, PACAP stimulates neurite outgrowth via ERK activation (Lazarovici et al. 1998) and NF- κ B pathway (Manecka et al. 2013). In addition, the activation by androgen removal of the PI3K-AKT-mTOR pathway may be essential to induce NE differentiation in LNCaP cells (Wu and Huang 2007), as is the case for neuritogenesis-induced NGF in PC12 cells (Jeon et al. 2010).

3. Alterations in calcium homeostasis

In addition to the signalling pathways described above, calcium ion has been proposed as a key messenger involved in NE differentiation. In LNCaP cells, it has been shown that VIP, a neuropeptide inducing the expression of NE markers such as NSE and CgA (Collado et al. 2004; Gutierrez-Canas et al. 2005), also rapidly increases cytosolic calcium levels, c-Fos proto-oncogen and VEGF mRNA expression. This is associated with VEGF secretion and neurite lengthening. All these effects were shown to be antagonized by chelating intracellular calcium using BAPTA-AM (Collado et al. 2005), which therefore clearly demonstrates that NE differentiation is a calcium-dependent process. It has also been shown in the same cells, that NE differentiation, induced by either steroid depletion or cytosolic cAMP elevation, is associated with a profound alteration of calcium homeostasis (Vanoverberghe et al. 2004). Indeed, NE differentiation is associated with reduced endoplasmic reticulum calcium store content, which is attributed to a decreased calreticulin (a calcium/storage binding protein) expression and SERCA2b-Calcium ATPase (Vanoverberghe et al. 2004). In addition, this has been correlated with a smaller capacitative calcium entry (Flourakis et al. 2010; Vanden Abeele et al. 2003; Vanoverberghe et al. 2012; Vanoverberghe et al. 2004) and to an increased resting cytosolic calcium concentration (Mariot et al. 2002; Monet et al. 2010).

In PC12 cells, NE differentiation is also associated with cytosolic calcium increases upon the application of the stimulus. For instance, PACAP promotes an elevation of the intracellular

calcium concentration, which is an essential step towards the acquisition of the NE phenotype. Selenoprotein T (SelT), a selenocystein, is an essential player in this calcium-dependent differentiation. Its expression is enhanced by PACAP (Grumolato et al. 2008) and this requires calcium entry. In addition, SelT is involved in calcium homeostasis since its overexpression increases the intracellular calcium concentration, whereas its knockdown reduces PACAP-induced calcium signals (Grumolato et al. 2008).

4. Expression of voltage-dependent calcium channels

Since NE cells are characterized by electrical excitability, voltage-dependent calcium channels have been considered as putative actors of the NE differentiation process. Voltage-dependent calcium channels are classified, based on their biophysical and pharmacological properties, as Low-Voltage Activated calcium channels (LVA or T-type calcium channels) and High-Voltage Activated calcium channels (HVA or L, N, P/Q, R- type calcium channels). On a molecular basis, ten different $\alpha 1$ pore subunits have been identified that present voltage-dependent calcium channel properties (Catterall 2011): Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4 (L-type channels), Cav2.1 (P/Q-channels), Cav2.2 (N-type), Cav2.3 (R-type), and Cav3.1, Cav3.2, Cav3.3 (T-type channels).

Regarding the expression levels of voltage-dependent calcium channels, their involvement in neuronal or NE differentiation has been investigated in various cell models displaying the initial steps of differentiation. LVA calcium channels have thus been shown, along with HVA calcium channels, to be differentially regulated during NE or neuronal differentiation. It has been shown in the literature that in many neuronal models, T-type calcium channels are expressed in the early stages of development and may participate in the differentiation process (Gu and Spitzer 1993; Holliday and Spitzer 1990). The involvement of calcium channels, notably T-type calcium channels, in neuronal development has been reviewed thoroughly elsewhere (Lory et al. 2006).

4.1. Neuroblastoma cell lines

In the neuroblastoma X glioma hybrid NG108-15 cell line, it was shown from electrophysiological experiments and pharmacological evidence (Lukyanetz 1998) that only T-type calcium channels are expressed in the undifferentiated state. Moreover, neuronal differentiation induced by prostaglandin and isobutylmethylxanthine (IBMX) is accompanied by an overexpression of T-type calcium channels and the neo-expression of other voltage-dependent calcium channels (L, N, Q-type channels). These results led to the hypothesis that

T-type calcium channels may be some of the channels involved in triggering neuronal differentiation (see below). SN56 cells, another hybrid cell line resulting from the fusion of neuroblastoma cells and septal neurons, express voltage-dependent calcium channels upon neuronal differentiation. In their undifferentiated state, SN56 cells mostly express T-type calcium channels (Kushmerick et al. 2001). From their biophysical kinetics properties and their pharmacological sensitivity to nickel, the authors suggested that T-type calcium currents were carried by Cav3.2 pore subunits. Upon differentiation induced by serum deprivation and cAMP, an increase in T-type calcium currents was observed within 2 to 4 days, together with a de novo expression of L, N, P/Q and R-type HVA calcium channels (Kushmerick et al. 2001). As in NG108-15 cells, it is therefore hypothesized that differentiation is dependent on T-type calcium channel activity in SN56 cells.

In another human neuroblastoma cell line B2(2)-M17, neuronal differentiation (evidenced by an increased expression of NSE, $\alpha 7$ -Ach nicotinic receptor and SNAP-25) induced by retinoic acid, leads to an increased voltage-dependent calcium entry upon KCl depolarization (Andres et al. 2013). Based on pharmacological demonstrations, this was mainly attributed to N, P/Q channels together with a slight participation of T-type calcium channels.

4.2. Retinoblastoma cells

In the human retinoblastoma Y-79 cell line, where both Cav3.1 and Cav3.2 are expressed in undifferentiated cells, there is an important reduction in mRNAs coding for both channels, along with a diminution of T-type calcium currents in cells undergoing neuronal differentiation (Hirooka et al. 2002). Down-regulation of Cav3.1 T-type channel activity and expression was further demonstrated to be due to a reduced activity of the promoters controlling its transcriptional expression (Bertolesi et al. 2003). A more recent study analysing the modifications in alternative splicing, showed that there is a considerable change in Cav3.1 splice variants occurring during neuronal differentiation (Bertolesi et al. 2006). Nevertheless, knocking-down the expression of Cav3.1 failed to alter differentiation kinetics or neurite formation. These results led the authors to suggest that Cav3.1 and Cav3.2 channels are not involved in the differentiation process itself, but that the alterations in splice variant specific expression may be relevant for establishing a mature differentiated state (Hirooka et al. 2002).

4.3. Embryonic stem cells

In embryonic stem (ES) cells, neuronal differentiation promotes electrical excitability and is associated with a maturation of voltage-dependent calcium channels (Arnhold et al. 2000). This differentiation can be induced by various neuropeptides including VIP or PACAP. Both peptides stimulate neurite outgrowth, NSE overexpression after 4-8 days treatment (Cazillis et al. 2004). This was associated with an enhancement of T-type calcium currents (Chafai et al. 2011). The increase in T-type calcium currents was correlated with a stronger expression of Cav3.3 protein as observed in western-blot experiments.

4.4. NE cell lines

In NE cell models, it has been shown in PC12 cells that NE differentiation is accompanied by an increased expression of both LVA (Garber et al. 1989) and HVA calcium channels (Sherwood et al. 1997) (Shitaka et al. 1996). Chronic application of various agents that induce NE differentiation, such as NGF or dexamethasone, leads to an increase in both the proportion of cells expressing LVA calcium currents and the average LVA calcium current density (Garber et al. 1989). NE differentiation induced by PACAP or NGF was associated with an increased density of voltage-dependent calcium currents, both of the LVA and the HVA types (Grumolato et al. 2003).

In NE pituitary lactosomatotrope GH3 cell line, further differentiation towards a lactotrope phenotype may be induced by treatment with NGF for several days. While a short treatment with NGF only up-regulated HVA calcium channels, a sustained NGF action (one to 5 days), occurring through a p75 receptor, led to up-regulated prolactin mRNA and protein levels, as well as to a delayed increase in T-type calcium currents (Lopez-Dominguez et al. 2006). These T-type calcium currents are possibly carried by Cav3.1 and/or Cav3.3 channels since they are the only LVA subunits expressed in GH3 cells (Mudado et al. 2004).

In the LNCaP prostate cancer cell line, previously shown to differentiate following cAMP stimuli (Bang et al. 1994), it was demonstrated that 3 to 4 days after the onset of NE differentiation, there was an increase in the magnitude of voltage-dependent calcium currents. This calcium current displayed all the characteristics of T-type calcium channels (Mariot et al. 2002). Indeed, they were characterized by a fast and voltage-dependent inactivation, a slow deactivation as well as being inhibited by low concentrations of NiCl₂, mibefradil, flunarizine and kurtoxin (Mariot et al. 2002),(Gackiere et al. 2008). The increase in T-type calcium currents took longer to occur than the lengthening of neuritic extension which developed within few hours during the early steps of differentiation. It was demonstrated by quantitative RT-PCR that the enhancement of T-type calcium currents depended on an overexpression of

Cav3.2 channels. A particular feature of LNCaP cells is that Cav3.2 calcium channels are the only voltage-dependent calcium channels expressed in both undifferentiated and differentiated conditions. Cav3.2 overexpression was associated with an increase in resting cytosolic calcium concentration, antagonized by T-type calcium channel inhibitors (Mariot et al. 2002). It was shown that T-type calcium channels, due to their combined inactivation and activation properties, participate in basal calcium entry at a resting membrane potential of -40 mV in LNCaP prostate cells (Gackiere et al. 2006).

5. Role of T-type calcium channels in NE differentiation

There has been some debate concerning the positive or adverse effects of intracellular calcium and voltage-dependent calcium channels on neuritic extension. Whilst some published works showed no role for voltage-dependent calcium channels in neurite extension induced by NGF (Lichvarova et al. 2012), most published works report a stimulation of neurite outgrowth by increased cytosolic calcium levels due to calcium entry through several channels.

Indeed, in many cell models, calcium is necessary for neurite outgrowth. For instance, it has recently been shown in PC12 cells that PACAP is able to induce neuritogenesis through a NF- κ B pathway. The authors demonstrated that PACAP-induced NE differentiation occurred through the activation of a calcium-dependent ERK1/2 MAP kinase pathway and the recruitment of cRel and p52 subunits of NF- κ B, leading to neuritogenesis and cell survival (Manecka et al. 2013). In that study, neuritogenesis and cRel recruitment were both inhibited by non-specific inhibitors of plasma membrane calcium channels and intracellular calcium channels responsible for endoplasmic reticulum calcium release. In PC12 cells, calcium homeostasis perturbation, for example induced by knocking-down the expression of plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA 2 and 3), leads to alterations in the process of morphological differentiation characterized by neuritic extension (Boczek et al. 2012).

T-type calcium channels have thus been investigated as putative key players of the differentiation process since, as described above, they are frequently expressed in either the early or late stages of NE/neuronal differentiation.

5.1. Role in the expression of molecular NE markers

To our knowledge, it has never been demonstrated that T-type calcium channel activity or expression promotes the expression of molecular NE markers such as chromogranins or NSE. We show here (Figure 2A and B-personal observations) that overexpressing Cav3.2 T-type calcium channels in LNCaP cells induces an increased expression of NSE and CgA. In

addition, NE differentiation induced by activating the PKA pathway (using a combined treatment with permeant cyclic AMP analogues and IBMX), leads to a stronger NSE expression which is antagonized by siRNA against Cav3.2 (Figure 2B). This shows that Cav3.2 channel expression is not only increased during NE differentiation process, but also that it plays a central role in some aspects of the differentiation process.

5.2. Role in neuritic extension

The role of T-type calcium channels in neurite formation has been investigated in embryonic neural progenitor cells (Louhivuori et al. 2013). From the inhibition of calcium signals induced mainly by T-type channels inhibitors (mibefradil, NNC-550396), it was concluded in this study that T-type calcium channels are expressed during the early stages of neuronal differentiation (one day). However, during the differentiation process, there was an increase in the density of HVA channels compared to LVA channels, such that at differentiation day 20, calcium signals were totally inhibited by nifedipine. The authors showed that inhibitors of LVA channels significantly decreased the number of active migrating neuron-like cells and neurite extensions, thereby demonstrating their involvement in neuritogenesis.

Early reports on neuroblastoma cells demonstrated that the expression of T-type currents always precedes neurite extension, thus suggesting that calcium entry through T-type calcium channels may participate in morphological neuronal differentiation (Silver and Bolsover 1991).

In the NG108-15 cell line, it was shown that cAMP-induced neuronal differentiation, characterized by neurite formation and an overexpression of L-type calcium channels, was dependent on T-type calcium channels activity. Indeed, the inhibition of T-type calcium channels using NiCl₂ or the down-regulation of the Cav3.2 pore subunit, led to a decrease in the number of cells with neurite, but did not change the average neurite length (Chemin et al. 2002). In addition, Cav3.2 T-type calcium channels were necessary players in HVA calcium channel expression during neuronal differentiation. This led the authors to propose that Cav3.2 T-type calcium channels are an early actor in the neuronal differentiation process.

In prostate cancer LNCaP cells, neurite formation induced by cAMP is faster (occurring in few hours) than Cav3.2 overexpression (occurring in few days), which could suggest that Cav3.2 overexpression may only be a consequence of the differentiation process. However, there is a significant expression of Cav3.2 channels and a significant T-type calcium current, in the undifferentiated state which could be responsible for the morphological differentiation process. We have indeed shown that neurite elongation during NE differentiation was

dependent on Cav3.2 calcium channels since their inhibition by low NiCl₂ concentrations reduced the average neurite length without hampering neurite formation. Therefore, if neurite formation is not dependent on Cav3.2 channels, their lengthening is modulated by T-type calcium channel activity (Mariot et al. 2002).

5.3. Role in hormone or neurohormone secretion

The central role of cytosolic calcium in the regulated pathway of secretion (and therefore in hormones, neurohormones and neurotransmitter release) has been demonstrated in many endocrine, NE or neuronal cells. The role of HVA channels in regulated exocytosis has been known for a long time, but attention has been paid more recently to LVA channels and their role in calcium-dependent secretion or neurotransmission has now been documented (Carbone et al. 2006).

Anterior NE pituitary cells express both LVA and HVA calcium channels (Lewis et al. 1988) and although HVA channels regulate hormone secretion, pharmacological experiments on perfused rat pituitaries have demonstrated that T-type calcium channels also participate in the secretion of hypophyseal hormones like TSH, in response to hypothalamic neuropeptides (Roussel et al. 1992). In addition, in NE pituitary cells, the expression of Cav3.1 is raised, whereas the expression of Cav3.2 and Cav3.3 is reduced in mice treated with 17 β -estradiol. This regulation of T-type calcium channel mRNA expression could be an important mechanism involved in the 17 β -estradiol regulation of pituitary secretion (Bosch et al. 2009). A strong link has been demonstrated for L-type calcium channels and exocytosis in many NE cell models. However, it has been shown in various NE cells, including rat pituitary melanotropes, that T-type calcium channels are as efficient as L-type ones in promoting exocytosis. In these cells, calcium ions “couple with equal strength to exocytosis regardless of the channel type involved” (Mansvelder and Kits 2000).

In prostate NE LNCaP cells, we have shown that a membrane depolarization, due to a stimulation of T-type calcium currents, induces a calcium-dependent exocytosis, as measured with FM1-43 dye. In addition, we showed that prostatic acid phosphatase (PAP) secretion was calcium-dependent in prostate cells and that this secretion was potentiated by NE differentiation. Furthermore, PAP secretion was reduced by low concentrations of NiCl₂, flunarizine or kurtoxin and by siRNAs targeting Cav3.2 channels. Cav3.2 expression and activity are therefore responsible for PAP secretion in NE prostate cancer cells (Gackiere et al. 2008).

In adult chromaffin cells, the expression of LVA channels is weak and HVA channels control to a large extent, the voltage-dependent calcium influx and thereby the catecholamine secretion (Artalejo et al. 1994). However, the expression of LVA channels is larger in embryonic chromaffin cells (Bournaud et al. 2001) than in adult cells. It therefore seems that during development, chromaffin cells lose the capacity to express LVA channels, which are progressively replaced by HVA channels. In adult cells, the Cav3.2 isoform is weakly expressed but is upregulated either by a treatment increasing cytosolic cAMP concentration (Novara et al. 2004), or by chronic hypoxia (Carabelli et al. 2007b). This cAMP effect was demonstrated as being mediated by a PKA-independent signalling pathway through the cAMP-receptor protein Epac ((cAMP-guanine nucleotide exchange factor) cAMP-GEF) (Novara et al. 2004). In addition, newly-formed Cav3.2 channels are as efficient as HVA channels in promoting low-threshold exocytosis and the release of catecholamine (Carabelli et al. 2007b; Giaccipoli et al. 2006) (Carabelli et al. 2007a). In mouse chromaffin cells *in situ*, a short-term stimulation with PACAP stimulates T-type calcium channel activity through a PKC-dependent recruitment of Cav3.2 channels to the plasma membrane (Hill et al. 2011). Cav3.2 channels may therefore be responsible for catecholamine secretion in acute stress situations.

It has thus been widely shown that LVA calcium channels control secretion and neurotransmission. This has been exposed in a recent review (Weiss and Zamponi 2013). However, the mechanisms involved in that function have as yet remained unclear. To promote a fast release of neuropeptides or neurotransmitters, HVA channels, for their part, are localized in the close vicinity of the vesicle-release machinery. It has been demonstrated that this co-localization is achieved using a specific interaction between HVA channels (Cav2.1 and Cav2.2) and SNARE proteins (syntaxin-1, SNAP-25 and synaptotagmin-1), through an interaction site called a synprint. It has recently been shown, that although T-type calcium channels lack this synprint interaction site, they closely associate with syntaxin-1A in central neurons (Weiss et al. 2012). This association between syntaxin-1A and Cav3.2 was also demonstrated in the same study to be essential for low-threshold exocytosis in chromaffin cells.

6. How do T-type calcium channels mediate NE differentiation? Putative signalling mechanisms.

The downstream events after calcium entry through T-type calcium channels have been little studied in the context of NE differentiation. Since T-type calcium channels have been shown

to be involved in secretion, it has been investigated whether their role in the induction of a NE phenotype could be related to the secretion of growth factors. As shown by one study (Chemin et al. 2004), neuritogenesis could be induced in NG108-15 cells using the conditioned media from Cav3.2 expressing NG108-15 cells. When the expression of Cav3.2 channels was knocked-down with siRNAs, the conditioned media from these siRNA-treated cells did not induce neurite outgrowth in NG108-15 cells, thus showing the involvement of T-type channels in a paracrine loop promoting neurite formation. However, the nature of the factors secreted by NG108-15 cells in response to T-type channels activity has not been elucidated.

In addition, T-type calcium channels may promote NE or neuronal differentiation through a stimulation of gene expression. It has been shown in NG108-15 cells that T-type calcium channels were responsible for the induction by hydrogen sulfide (NaHS) of a neuronal phenotype, characterized by the overexpression of L-type calcium channels and neuritogenesis (Nagasawa et al. 2009). This was essentially demonstrated using T-type calcium channel inhibitors, such as mibefradil or zinc chloride in a range of concentrations more specifically inhibiting Cav3.2 channels. In the same cell line, it was later demonstrated that NaHS promotes neuritic extension through a phosphorylation of Src kinase (Tarui et al. 2010). Indeed, PP2, a specific inhibitor of Src, antagonized the development of neurites induced by NaHS, while only reducing the one activated by permeant cAMP. In addition, Src phosphorylation by NaHS was significantly reduced by inhibitors of T-type calcium channels, mibefradil or ascorbate, showing that T-type calcium channels were upstream of Src in the pathway leading to a neuronal phenotype. It was shown in this study that Src phosphorylation was independent of CaMKinase II. Another study demonstrated that depolarization-induced calcium entry promoted NE differentiation of PC12 cells. This NE differentiation, which was characterized by neurite formation, GAP-43 and synapsin I overexpression, required the activation of a phospholipase D2–ErK-CREB pathway and Src phosphorylation by CaMKinase II (Banno et al. 2008). Such a pathway is similar to the one demonstrated in hippocampal neurons, where NCAM (neural cell adhesion molecules)-induced neurite formation is dependent on a T-type calcium channel (Kiryushko et al. 2006). In these cells, homophilic NCAM interaction, which promotes neurite formation, leads to a cytosolic calcium increase *via* T-type calcium channels, together with L-type and non-selective cation channels, and to the activation of an Src-dependent pathway, both events being necessary for the induction of differentiation.

7. Other calcium channels

Though T-type calcium channels are indeed involved in neuronal and NE differentiation as previously exemplified, other calcium channels are part of that process. In pheochromocytoma PC12 cells, L-type calcium channel stimulation, through 5-HT₃ receptor activation by serotonin, has been shown to potentiate the NGF-induced neurite outgrowth (Homma et al. 2006), due to an increased intracellular calcium concentration. Similarly, lysophosphatidylcholine promotes neurite outgrowth in an L-type channel dependent manner (Nakashima et al. 2003). In the same cells, NGF-induced neurite outgrowth is correlated with changes in the expression pattern of TRPC (Transient Receptor Potential Canonical) channels, TRPC1 being overexpressed and TRPC5 down-regulated (Kumar et al. 2012). Furthermore, TRPC1 stimulates, whereas TRPC5 inhibits neurite outgrowth (Heo et al. 2012; Kumar et al. 2012). A similar inhibitory action of TRPC5 was observed in hippocampal neurons, where the overexpression of dominant negative TRPC5 channels increased neurite length (Greka et al. 2003). In LNCaP prostate cancer cells, NE differentiation is associated not only with an upregulation of Cav3.2 (Mariot et al. 2002), but also with TRPV2 (TRP Vanilloid) overexpression (Monet et al. 2010) and with a down-regulation of Orail (Flourakis et al. 2010; Vanoverberghe et al. 2012). The overall calcium homeostasis is therefore deeply altered by treatments inducing NE differentiation, leading to an increased basal cytosolic concentration, reduced calcium-store content and reduced capacitative calcium entry.

8. NE differentiation in cancer progression- Perspectives on the general involvement of T-type calcium channels

NE tumours (NET) may arise from the proliferation of NE cells. These tumours develop in almost all tissues, including those where NE cells may not be present (DeLellis 2001). It must however, be noted that the digestive system is the most frequent site of development of NE tumours (66%) before the respiratory tract (31%) (Gustafsson et al. 2008). NET, although slow-growing, are often diagnosed after the tumour has metastasized and thus may entail a poor prognosis. Some tissues or organs may also be the site for the development of carcinoma that displays NE cell foci, which has led to the notion of cancers with NE differentiation. This is the case for prostate cancer, which is frequently characterized by NE differentiation (Abrahamsson 1999; Hansson and Abrahamsson 2003). In prostate cancer, NE differentiation is usually correlated with a poor prognosis (Sagnak et al. 2011), probably due to the fact that NE cells are androgeno-insensitive (Huang et al. 2006) and may thus participate in the androgen-independent growth of prostate cancer. In addition, these cells are resistant to

apoptosis (Vanoverberghe et al. 2004) and secrete numerous factors that may increase cell proliferation in their vicinity. In some forms of prostate carcinoma, NE cells are the main component of the tumours. These small-cell prostate carcinomas (SCPCa) are very aggressive forms of prostate cancer, where NE cells exhibit tumorigenic and highly proliferative activities (Oesterling et al. 1992; Yao et al. 2006). As shown recently, SCPCa cells may arise from NE carcinoma cells from a p53 inactivating mutation, a mutation conferring proliferative properties (Chen et al. 2012).

As reported in a number of cancers (for a review see (Panner and Wurster 2006), T-type calcium channels may participate in tumour growth. Their role in cell proliferation may be due to the fact that enhanced expression of T-type calcium channels (Cav3.1, Cav3.2 or Cav3.3) leads to an increased secretion of tumourigenic factors by NE cells. As we have previously shown, PAP synthesis and release are enhanced by Cav3.2 channels in LNCaP cells (Gackiere et al. 2008). In addition, it has been demonstrated that the secreted form of PAP may play an important role in the development of prostate tumour metastasis. Indeed, PAP expression is increased in prostate bone metastasis and PAP may participate in the osteoblastic phase of the metastasis development (Kirschenbaum et al. 2011). In addition, we have shown that the expression of Cav3.2 channels is correlated with the expression of serotonin (Gackiere et al. 2008), a neurotransmitter stimulating the proliferation and migration of prostate cancer cell lines (Dizeyi et al. 2011). Furthermore, we have shown that Cav3.2 expression correlates with CgA expression (Gackiere et al. 2008). The circulating level of CgA, an NE marker, is frequently increased in the advanced stages of the diseases. It has been demonstrated on prostate cancer cell lines that CgA accelerates cell proliferation and reduces cell apoptosis, thereby suggesting a role for CgA in prostate cancer development (Gong et al. 2007). Altogether, this suggests that Cav3.2 channels in NE prostate cancer cells may promote calcium entry, which in turn induces the secretion of mitogenic or tumorigenic factors. In addition, we have observed that Cav3.2 channels in prostate cancer LNCaP cells, favour cell growth, even in NE cells, since their overexpression, which increases NSE expression, also accelerates cell proliferation. In contrast, down-regulation of Cav3.2, which reduces NSE expression, or its blockade with various inhibitors, slows cell proliferation (Gackiere et al. 2013). This is in agreement with many articles that show the participation of T-type calcium channels in various aspects of cell growth, including cell proliferation or cell apoptosis (for a review see (Panner and Wurster 2006) or (Lory et al. 2006)). Since NE cells of the prostate may proliferate rapidly in some forms of prostate carcinomas (SCPCa), it will be of great interest to assess whether Cav3.2 channels, involved in both proliferation and NE

differentiation, in combination with a p53 inactivation, are indeed involved in the development of SCPCa.

9. Concluding remarks

LVA calcium channels have frequently been shown to be overexpressed during NE differentiation, as well as being involved in the development of a NE phenotype characterized by morphological (neurite extension) and molecular (NSE or CgA markers) features. Moreover, T-type calcium channels, along with other calcium channels, participate in the secretion of paracrine or endocrine factors, which in turn may promote the differentiation or the proliferation of target cells. In the context of NE tumours, most of the data available rely on cell line studies. It is of particular importance in the near future to carry out large studies on tissue arrays, in order to correlate the stage of the disease with the expression of the different T-type calcium channel isoforms.

References

- Andres D, Keyser BM, Petralli J, Benton B, Hubbard KS, McNutt PM, Ray R (2013) Morphological and functional differentiation in BE(2)-M17 human neuroblastoma cells by treatment with Trans-retinoic acid. *BMC Neurosci* 14: 49
- Angelsen A, Sandvik AK, Syversen U, Stridsberg M, Waldum HL (1998) NGF-beta, NE-cells and prostatic cancer cell lines. A study of neuroendocrine expression in the human prostatic cancer cell lines DU-145, PC-3, LNCaP, and TSU-pr1 following stimulation of the nerve growth factor-beta. *Scand J Urol Nephrol* 32: 7-13
- Arnhold S, Andressen C, Angelov DN, Vajna R, Volsen SG, Hescheler J, Addicks K (2000) Embryonic stem-cell derived neurones express a maturation dependent pattern of voltage-gated calcium channels and calcium-binding proteins. *Int J Dev Neurosci* 18: 201-212
- Artalejo CR, Adams ME, Fox AP (1994) Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367: 72-76
- Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, Ha MJ, Tsokos M, Sheahan MD, Nguyen P, et al. (1994) Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5330-5334.
- Bergeron F, Leduc R, Day R (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* 24: 1-22
- Bertolesi GE, Jollimore CA, Shi C, Elbaum L, Denovan-Wright EM, Barnes S, Kelly ME (2003) Regulation of alpha1G T-type calcium channel gene (CACNA1G) expression during neuronal differentiation. *Eur J Neurosci* 17: 1802-1810
- Boczek T, Lisek M, Kowalski A, Pikula S, Niewiarowska J, Wiktorska M, Zylinska L (2012) Downregulation of PMCA2 or PMCA3 reorganizes Ca(2+) handling systems in differentiating PC12 cells. *Cell Calcium* 52: 433-444
- Bournaud R, Hidalgo J, Yu H, Jaimovich E, Shimahara T (2001) Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J Physiol* 537: 35-44
- Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, Carbone E (2007a) Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca²⁺ -dependence. *Eur Biophys J* 36: 753-762
- Carabelli V, Marcantoni A, Comunanza V, de Luca A, Diaz J, Borges R, Carbone E (2007b) Chronic hypoxia up-regulates alpha1H T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol* 584: 149-165
- Carbone E, Giaccipoli A, Marcantoni A, Guido D, Carabelli V (2006) A new role for T-type channels in fast "low-threshold" exocytosis. *Cell Calcium* 40: 147-154
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a003947
- Cazillis M, Gonzalez BJ, Billardon C, Lombet A, Fraichard A, Samarut J, Gressens P, Vaudry H, Rostene W (2004) VIP and PACAP induce selective neuronal differentiation of mouse embryonic stem cells. *Eur J Neurosci* 19: 798-808
- Chemin J, Nargeot J, Lory P (2004) Ca(v)3.2 calcium channels control an autocrine mechanism that promotes neuroblastoma cell differentiation. *Neuroreport* 15: 671-675
- Collado B, Gutierrez-Canas I, Rodriguez-Henche N, Prieto JC, Carmena MJ (2004) Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Regul Pept* 119: 69-75
- Collado B, Sanchez MG, Diaz-Laviada I, Prieto JC, Carmena MJ (2005) Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces c-fos expression in LNCaP prostate cancer cells through a mechanism that involves Ca²⁺ signalling. Implications in angiogenesis and neuroendocrine differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1744: 224-233

- Cox ME, Deeble PD, Bissonette EA, Parsons SJ (2000) Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem* 275: 13812-13818.
- Day R, Salzet M (2002) The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinol Lett* 23: 447-451
- Deeble PD, Murphy DJ, Parsons SJ, Cox ME (2001) Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol Cell Biol* 21: 8471-8482
- DeLellis RA (2001) The neuroendocrine system and its tumors: an overview. *Am J Clin Pathol* 115 Suppl: S5-16
- Diaz M, Abdul M, Hoosein N (1998) Modulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer by interleukin-1 and -2. *Prostate Suppl* 8: 32-36
- Elhamedi A, Brown ME, Artalejo CR, Palfrey HC (2000) Enhancement of the dense-core vesicle secretory cycle by glucocorticoid differentiation of PC12 cells: characteristics of rapid exocytosis and endocytosis. *J Neurosci* 20: 2495-2503
- Farini D, Puglianiello A, Mammì C, Siracusa G, Moretti C (2003) Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* 144: 1631-1643
- Feyrter F (1938) Über diffuse endokrine epitheliale Organe. Leipzig, Germany: JA Barth.
- 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
- Froelich F (1949) Die "Helle Zelle" der Bronchialschleimhaut und ihre Beziehungen zum Problem der Chemorezeptoren Frankfurt Z Pathol 517-559
- Fujita T, Kobayashi S, Yui R (1980) Paraneuron concept and its current implications. *Adv Biochem Psychopharmacol* 25: 321-325
- Gackiere F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoi-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P (2008) CaV3.2 T-type Calcium Channels Are Involved in Calcium-dependent Secretion of Neuroendocrine Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem* 283: 10162-10173
- Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P (2006) A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 39: 357-366
- Gackiere F, Warnier M, Katsogiannou M, Derouiche S, Delcourt P, Dewailly E, Slomianny C, Humez S, Prevarskaya N, Roudbaraki M, Mariot P (2013) Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology Open*, BIO20135215; Advance Online Article August 2, doi:10.1242/bio.20135215
- Garber SS, Hoshi T, Aldrich RW (1989) Regulation of ionic currents in pheochromocytoma cells by nerve growth factor and dexamethasone. *J Neurosci* 9: 3976-3987.
- Giancippoli A, Novara M, de Luca A, Baldelli P, Marcantoni A, Carbone E, Carabelli V (2006) Low-threshold exocytosis induced by cAMP-recruited CaV3.2 (alpha1H) channels in rat chromaffin cells. *Biophys J* 90: 1830-1841
- Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73: 2424-2428
- Gu X, Spitzer NC (1993) Low-threshold Ca²⁺ current and its role in spontaneous elevations of intracellular Ca²⁺ in developing *Xenopus* neurons. *J Neurosci* 13: 4936-4948
- Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM (2008) Neuroendocrine tumors of the diffuse neuroendocrine system. *Curr Opin Oncol* 20: 1-12
- Gutierrez-Canas I, Juarraz MG, Collado B, Rodriguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, Carmena MJ (2005) Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate* 63: 44-55
- Hirooka K, Bertolesi GE, Kelly ME, Denovan-Wright EM, Sun X, Hamid J, Zamponi GW, Juhasz AE, Haynes LW, Barnes S (2002) T-Type calcium channel alpha1G and alpha1H subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J Neurophysiol* 88: 196-205
- Holliday J, Spitzer NC (1990) Spontaneous calcium influx and its roles in differentiation of spinal neurons in culture. *Dev Biol* 141: 13-23
- Jones SE, Palmer TM (2012) Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal* 24: 1504-1514
- Kirschenbaum A, Liu XH, Yao S, Leiter A, Levine AC (2011) Prostatic acid phosphatase is expressed in human prostate cancer bone metastases and promotes osteoblast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1237: 64-70
- Kiryushko D, Korshunova I, Berezin V, Bock E (2006) Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca²⁺ homeostasis. *Mol Biol Cell* 17: 2278-2286
- Kushmerick C, Romano-Silva MA, Gomez MV, Prado MA (2001) Changes in Ca(2+) channel expression upon differentiation of SN56 cholinergic cells. *Brain Res* 916: 199-210
- Le Douarin NM (1988) On the origin of pancreatic endocrine cells. *Cell* 53: 169-171
- Lewis DL, Goodman MB, St John PA, Barker JL (1988) Calcium currents and fura-2 signals in fluorescence-activated cell sorted lactotrophs and somatotrophs of rat anterior pituitary. *Endocrinology* 123: 611-621
- Lichvarova L, Jaskova K, Lacinova L (2012) NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of calcium entry through L-type calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 31: 473-478
- Lory P, Bidaud I, Chemin J (2006) T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* 40: 135-146
- Louhivuori LM, Louhivuori V, Wigren HK, Hakala E, Jansson LC, Nordstrom T, Castren ML, Akerman KE (2013) Role of low voltage activated calcium channels in neurogenesis and active migration of embryonic neural progenitor cells. *Stem Cells Dev* 22: 1206-1219
- Lukyanetz EA (1998) Diversity and properties of calcium channel types in NG108-15 hybrid cells. *Neuroscience* 87: 265-274
- Manecka DL, Mahmood SF, Grumolato L, Lihmann I, Anouar Y (2013) Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Promotes Both Survival and Neurogenesis in PC12 Cells Through Activation of Nuclear Factor kappa B (NF-kappaB) Pathway* INVOLVEMENT OF EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASE (ERK), CALCIUM AND c-REL". *J Biol Chem*

- Mansvelder HD, Kits KS (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: 327-339.
- Mariot P, Vanoverbergh K, Lalevee N, Rossier MF, Prevarskaya N (2002) Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277: 10824-10833
- Mori S, Murakami-Mori K, Bonavida B (1999) Interleukin-6 induces G1 arrest through induction of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor, and neuron-like morphology in LNCaP prostate tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 609-614
- Mudado MA, Rodrigues AL, Prado VF, Beirao PS, Cruz JS (2004) CaV 3.1 and CaV 3.3 account for T-type Ca²⁺ current in GH3 cells. *Braz J Med Biol Res* 37: 929-935
- Nagasawa K, Tarui T, Yoshida S, Sekiguchi F, Matsunami M, Ohi A, Fukami K, Ichida S, Nishikawa H, Kawabata A (2009) Hydrogen sulfide evokes neurite outgrowth and expression of high-voltage-activated Ca²⁺ currents in NG108-15 cells: involvement of T-type Ca²⁺ channels. *J Neurochem* 108: 676-684
- Oesterling JE, Haurer CG, Farrow GM (1992) Small cell anaplastic carcinoma of the prostate: a clinical, pathological and immunohistological study of 27 patients. *J Urol* 147: 804-807
- Panner A, Wurster RD (2006) T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* 40: 253-259
- Pearse AG (1968) Common cytochemical and ultrastructural characteristics of cells producing polypeptide hormones (the APUD series) and their relevance to thyroid and ultimobranchial C cells and calcitonin. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 170: 71-80
- Pretl K (1944) Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdruse. *Virchows Archiv*: 392-404
- Ravni A, Bourgault S, Lebon A, Chan P, Galas L, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez B, Eiden LE, Vaudry D (2006) The neurotrophic effects of PACAP in PC12 cells: control by multiple transduction pathways. *J Neurochem* 98: 321-329
- Roussel JP, Mateu G, Astier H (1992) Blockade of potassium or calcium channels provokes modifications in TRH-induced TSH release from rat perfused pituitaries. *Endocr Regul* 26: 163-170
- Sagnak L, Topaloglu H, Ozok U, Ersoy H (2011) Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 9: 73-80
- Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Leon J, Manchester L, Reiter RJ (2005) Melatonin reduces prostate cancer cell growth leading to neuroendocrine differentiation via a receptor and PKA independent mechanism. *Prostate* 63: 29-43
- Seidah NG (2011) What lies ahead for the proprotein convertases? *Ann N Y Acad Sci* 1220: 149-161
- Shen R, Dorai T, Szabo M, Katz AE, Olsson CA, Buttyan R (1997) Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urol Oncol* 3: 67-75
- Sherwood NT, Lesser SS, Lo DC (1997) Neurotrophin regulation of ionic currents and cell size depends on cell context. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5917-5922.
- Shitaka Y, Matsuki N, Saito H, Katsuki H (1996) Basic fibroblast growth factor increases functional L-type Ca²⁺ channels in fetal rat hippocampal neurons: implications for neurite morphogenesis in vitro. *J Neurosci* 16: 6476-6489.
- Silver RA, Bolsover SR (1991) Expression of T-type calcium current precedes neurite extension in neuroblastoma cells. *J Physiol (Paris)* 85: 79-83
- Tarui T, Fukami K, Nagasawa K, Yoshida S, Sekiguchi F, Kawabata A (2010) Involvement of Src kinase in T-type calcium channel-dependent neuronal differentiation of NG108-15 cells by hydrogen sulfide. *J Neurochem* 114: 512-519
- Tojima T, Yamane Y, Takahashi M, Ito E (2000) Acquisition of neuronal proteins during differentiation of NG108-15 cells. *Neurosci Res* 37: 153-161
- Vanoverbergh K, Lehen'kyi V, Thebault S, Raphael M, Vanden Abeele F, Slomianny C, Mariot P, Prevarskaya N (2012) Cytoskeleton reorganization as an alternative mechanism of store-operated calcium entry control in neuroendocrine-differentiated cells. *PLoS One* 7: e45615
- Vanoverbergh 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: 321-330
- Weiss N, Zamponi GW (2013) Control of low-threshold exocytosis by T-type calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828: 1579-1586
- Westerink RH, Ewing AG (2008) The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 273-285
- Wu C, Huang J (2007) Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *J Biol Chem* 282: 3571-3583
- Yao JL, Madeb R, Bourne P, Lei J, Yang X, Tickoo S, Liu Z, Tan D, Cheng L, Hatem F, Huang J, Anthony di Sant'Agnese P (2006) Small cell carcinoma of the prostate: an immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 30: 705-712
- Yuan TC, Veeramani S, Lin FF, Kondrikou D, Zelivianski S, Igawa T, Karan D, Batra SK, Lin MF (2006) Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer* 13: 151-167
- Yuan TC, Veeramani S, Lin MF (2007) Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* 14: 531-547
- Zhang XQ, Kondrikov D, Yuan TC, Lin FF, Hansen J, Lin MF (2003) Receptor protein tyrosine phosphatase alpha signaling is involved in androgen depletion-induced neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene* 22: 6704-6716

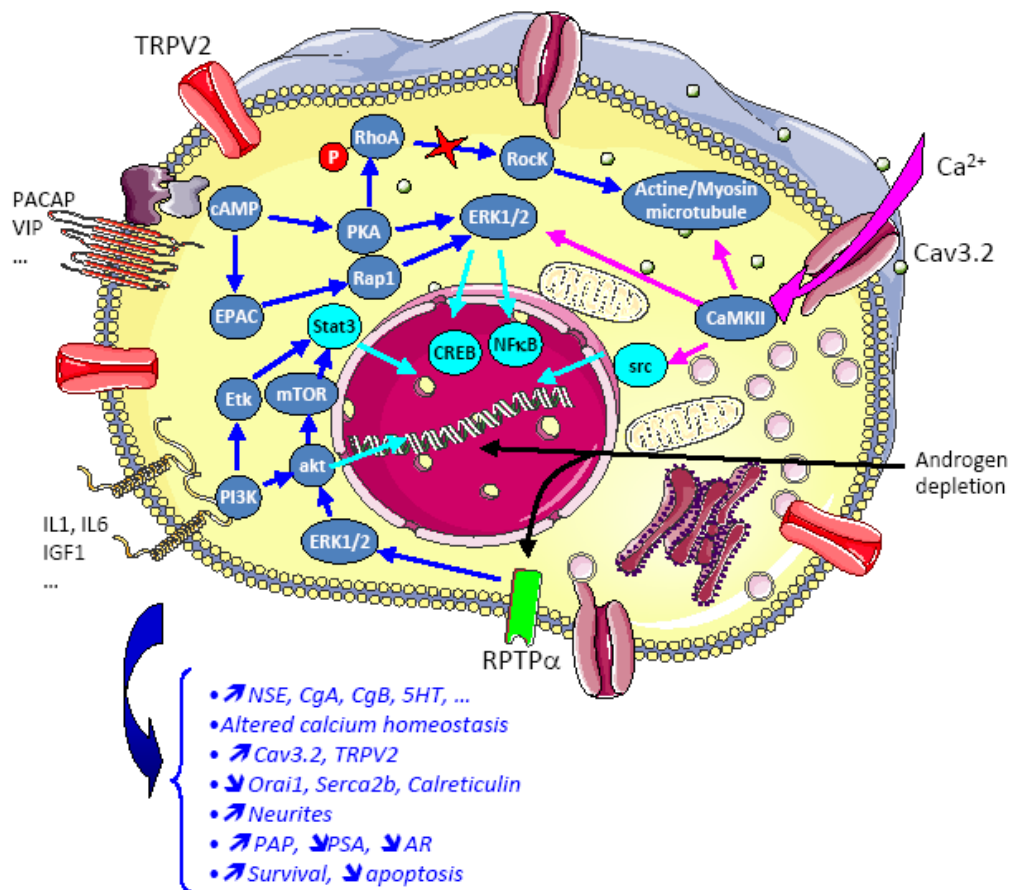


Figure 1: Overview of the transduction pathways leading to NE differentiation in LNCaP cells.

NE differentiation can be induced in LNCaP cells by peptides activating G-protein Coupled Receptors (GPCR) (PACAP, VIP, bombesin...), tyrosine kinase receptors (NGF, IGF1, IL1, IL6...) or androgen depletion through an increased expression of Receptor Protein Tyrosine Phosphatase Alpha (RPTPα) (Zhang et al. 2003). PKA/ERK/CREB (Cox et al. 2000), PI3K/Akt/mTOR (Wu and Huang 2007), PI3K/Etk/Stat3 pathways activate NE differentiation characterized by the features described below (for a review see (Yuan et al. 2007)). Phosphorylation of RhoA by PKA leads to its inactivation, to Rho kinase (Rock) inhibition and to neurite extension (Jones and Palmer 2012).

Calcium entry through Cav3.2 channels may increase cytosolic calcium concentration, thus leading to activation of CaMkinase II and further activation of Src, leading to gene expression. CaMkinase II stimulation may also promote the cytoskeleton reorganization necessary for morphological differentiation.

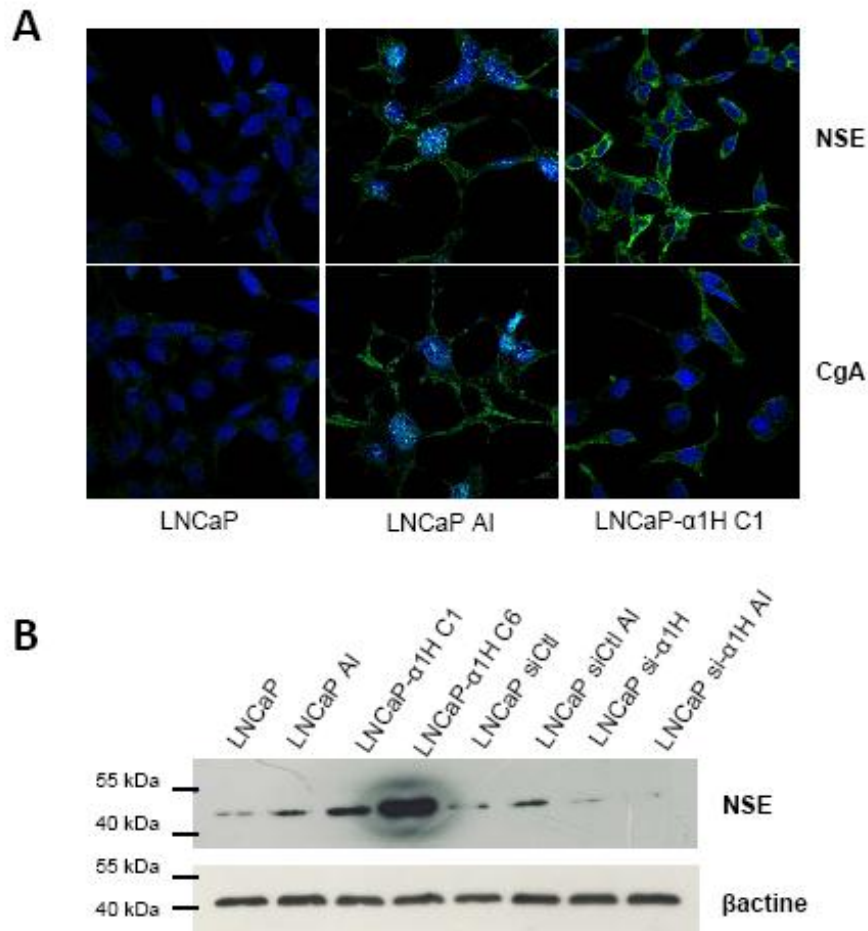


Figure 2: Cav3.2 channels enhance the expression of NE markers in LNCaP.

A: Immunofluorescence studies using NSE and CgA specific antibodies (dilution 1/50e, DAKO, France) on LNCaP cells. The cells were treated with a permeant analogue of cyclic AMP (dibutyryl cyclic AMP, 1 mM) and isobutylmethylxanthine (IBMX 100 μ M) for 4 days to induce NE differentiation (LNCaP-AI). NSE and CgA staining (in green) were increased by the activation of PKA pathway or the overexpression of Cav3.2 channels (LNCaP- α 1H C1). Nuclei are stained in blue using DAPI.

B: Western-Blot experiments performed on LNCaP-Ctl, LNCaP-AI, LNCaP- α 1H (2 clones: C1 and C6) and the same cells with siRNA treatment. Cells were transfected overnight with control siRNA (siCtl 50 nM) or siRNA targeting Cav3.2 (si α 1H 50 nM - see (Gackiere et al. 2008) for siRNA sequences). The cells were harvested 4 days after transfection and a Western Blot experiment was performed using the same antibody as immunofluorescence studies (except for β -actin, dilution 1/2000e, Sigma).

Données supplémentaires :

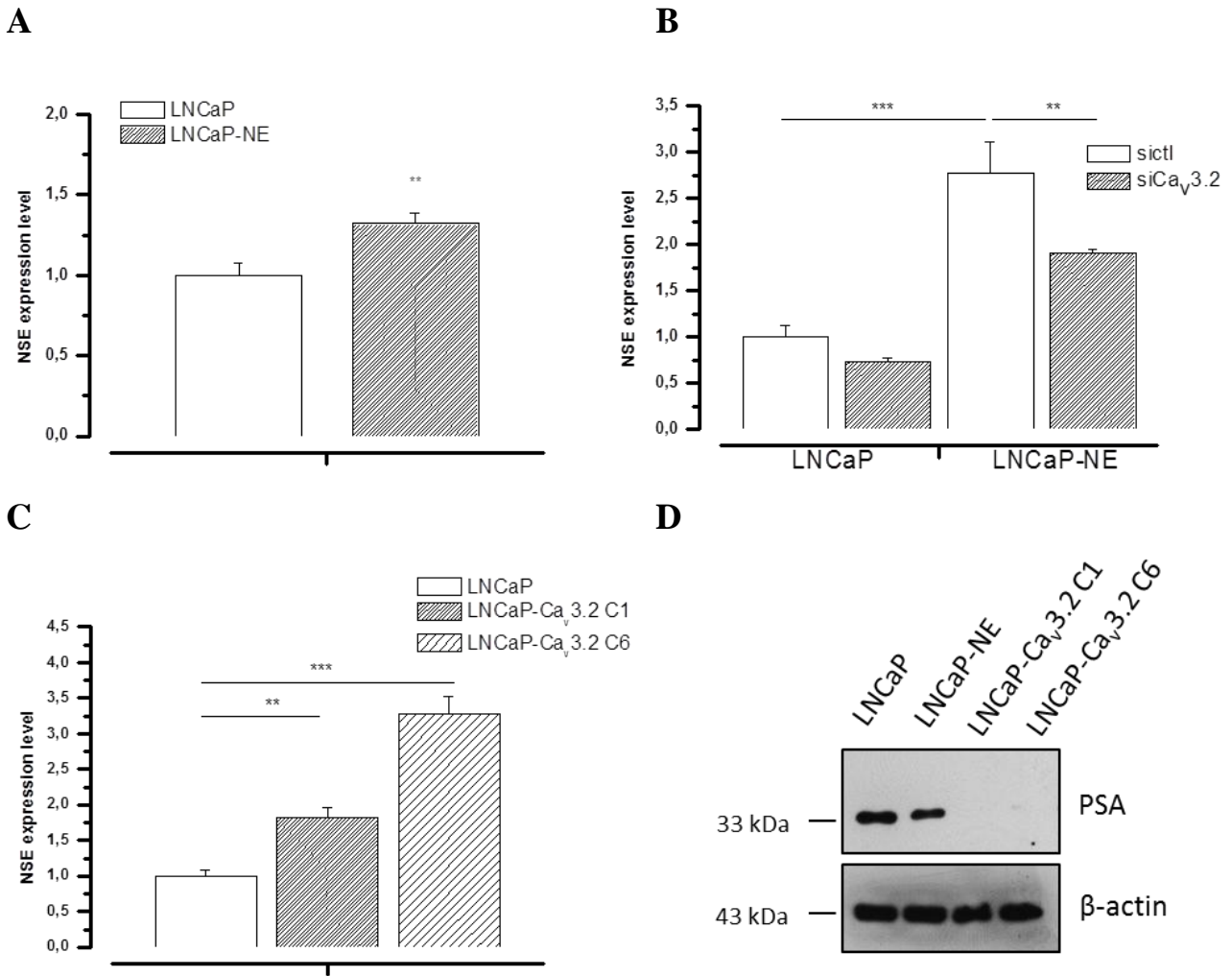


Figure 29 : Implication de Ca_v3.2 dans la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP. (A) Analyse du niveau d'expression du marqueur de différenciation neuroendocrine, NSE par qPCR dans les cellules LNCaP, dans les cellules LNCaP dont la différenciation endocrine a été induite par 4 jours de traitements AMPc/IBMX (LNCaP-NE) et dans les clones de surexpression LNCaP-Ca_v3.2 (C), Expression de NSE par qPCR après un traitement siCa_v3.2 (50 nM) pendant 4 jours (B). (D) Expression de PSA dans les cellules LNCaP, LNCaP-NE et dans les clones LNCaP-Ca_v3.2 mesurée par western-blot.

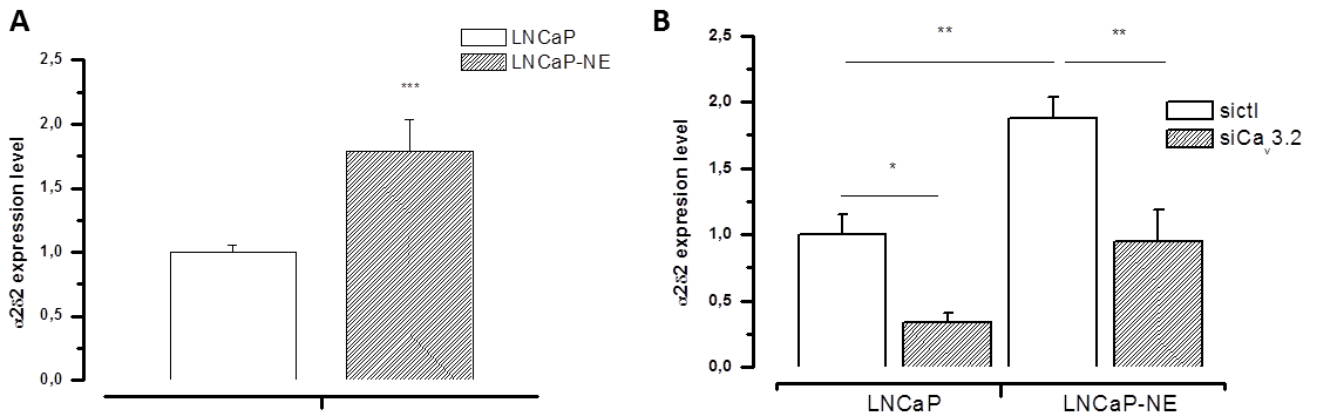


Figure 30 : Expression d' $\alpha 2\delta 2$ lors de la différenciation neuroendocrine.(A) Analyse par qPCR du niveau d' expression d' $\alpha 2\delta 2$ dans les cellules LNCaP et LNCaP différenciées (LNCaP-NE) après 4 jours de traitement. (B) Analyse du niveau d'expression d' $\alpha 2\delta 2$ en présence de siCa_v3.2 dans les cellules LNCaP et LNCaP différenciées après un traitement siCa_v3.2 (50 nM) de 4 jours. Les valeurs sont normalisées au niveau d'expression de l'ARNr 18s.

DISCUSSION/PERSPECTIVES

Différentes études montrent que les canaux de type T sont impliqués dans les processus cancéreux tels que la prolifération, en particulier le cycle cellulaire, la différenciation, la migration et l'invasion (Lory et al., 2006). De plus, l'expression de ces canaux augmente dans de nombreux cancers (Panner and Wurster, 2006), dont celui de la prostate. En effet, la différenciation neuroendocrine des cellules prostatiques est accompagnée d'une surexpression du canal $Ca_v3.2$ (Mariot et al., 2002). De plus, dans les cellules différenciées, ce canal intervient dans la sécrétion de PAP, marqueur du cancer de la prostate, et de facteurs mitogènes, qui pourraient alors être favorables à la prolifération des cellules avoisinantes (Gackière et al., 2008). C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés à la régulation du canal $Ca_v3.2$ par des protéines partenaires et au(x) rôle(s) de ces dernières dans la cancérogenèse prostatique.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc étudié l'association du canal $Ca_v3.2$ avec un canal potassique, BK, puis la régulation du canal calcique à bas seuil $Ca_v3.2$ par des sous-unités accessoires connues pour moduler l'activité et l'adressage des canaux calciques voltage-dépendants à haut seuil. Dans ce cadre, nous nous sommes en particulier intéressés à la sous-unité $\alpha2\delta2$ dans les cancers prostatiques. Ces études nous ont permis de rédiger trois articles et une revue. De plus, certains résultats font l'objet d'un dépôt de brevet.

Dans un premier article (Gackière et al., 2013), nous avons démontré que les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes LNCaP expriment un canal potassique BK à grande conductance à la fois calcium et voltage-dépendant. Nous avons mis en évidence un couplage entre le canal BK et le canal $Ca_v3.2$. Nous avons montré que l'entrée de calcium provoquée par le fonctionnement du canal $Ca_v3.2$ favorise l'activation pour le voltage du canal BK en induisant un décalage de son seuil d'activation de -10 mV à -40 mV. Enfin, nous avons démontré que ces deux canaux appartiennent à un même complexe protéique et participent à la prolifération des cellules LNCaP.

Dans une seconde étude, nous avons cherché à savoir si les cellules prostatiques exprimaient des sous-unités accessoires potentiellement régulatrices des canaux calciques de type T. Ainsi, nous avons mis en évidence dans les lignées et les tissus cancéreux prostatiques, l'expression de trois sous-unités accessoires : $\beta4$, $\gamma4$ et $\alpha2\delta2$. Nos résultats montrent que les protéines $Ca_v3.2$ et $\alpha2\delta2$ peuvent s'associer dans un même complexe. De plus, nous avons établi que la protéine $\alpha2\delta2$ régule l'activité du canal calcique $Ca_v3.2$ dans les clones de surexpression LNCaP- $Ca_v3.2$. Cependant, la protéine $\alpha2\delta2$ ne semble pas réguler le canal $Ca_v3.2$ endogène. Enfin, $Ca_v3.2$ et $\alpha2\delta2$ contribuent toutes deux à la prolifération des cellules LNCaP, *via* des

voies de signalisation qui semblent différentes. En effet, la prolifération induite par la surexpression d' $\alpha 2\delta 2$ fait intervenir la voie NFAT contrairement à la croissance cellulaire activée par $Ca_v3.2$. D'autre part, les sécrétions de PAP et VEGF sont régulées de manière opposées par $Ca_v3.2$ et $\alpha 2\delta 2$, ce qui suggère qu' $\alpha 2\delta 2$ possède un rôle supplémentaire de celui de régulateur de canal calcique voltage-dépendant.

Par conséquent, dans une troisième étude, nous avons porté notre attention sur l'implication de la protéine $\alpha 2\delta 2$ dans la cancérogenèse prostatique. Dans un premier temps, nous avons montré que cette protéine est exprimée plus fréquemment dans les tissus cancéreux prostatiques que dans les tissus sains, mais aussi que son expression augmente avec l'évolution du cancer de la prostate. De plus, nous avons montré par des études *in vivo* qu' $\alpha 2\delta 2$ favorise la croissance tumorale. Par ailleurs, un traitement continu de gabapentine, un ligand d' $\alpha 2\delta 2$ (Marais et al., 2001), ralentit le développement tumoral. Ces résultats nous ont permis de suggérer qu' $\alpha 2\delta 2$ possède un pouvoir oncogénique dans le cancer de la prostate.

Enfin, dans notre dernière étude, nous nous sommes intéressés au rôle de $Ca_v3.2$ dans la différenciation neuroendocrine. Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence qu'un traitement induisant la différenciation neuroendocrine augmente l'expression de ce canal (Mariot et al., 2002). Notre but était de déterminer si l'augmentation du niveau d'expression de $Ca_v3.2$ est uniquement une conséquence du processus de différenciation, ou si le canal lui-même participe à la différenciation neuroendocrine. Nos résultats nous indiquent que $Ca_v3.2$ induit la différenciation neuroendocrine dans les cellules prostatiques. En effet, la surexpression de ce canal permet d'observer une augmentation de l'expression du marqueur de différenciation NSE de manière similaire à celle provoquée par un traitement induisant la différenciation neuroendocrine (analogues perméants d'AMPC). De plus, la diminution d'expression de $Ca_v3.2$, par un traitement siARN, réduit l'expression de NSE dans les cellules différenciées (LNCaP-NE). Nous avons également montré que la diminution d'expression de PSA dans les cellules LNCaP-NE peut être mimée par une surexpression de $Ca_v3.2$.

En outre, nos résultats complémentaires montrent que l'expression d' $\alpha 2\delta 2$ augmente dans les cellules différenciées, LNCaP-NE. Ces résultats suggèrent donc que le complexe protéique $Ca_v3.2/\alpha 2\delta 2$ participe à la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP.

Un complexe protéique fonctionnel

De nombreuses études ont montré que les canaux calciques voltage-dépendants pouvaient s'associer avec différentes protéines, dont les canaux potassiques et les sous-unités accessoires ($\alpha_2\delta$, β et γ) (Rehak et al., 2013) (Thompson et al., 2011) (Hansen et al., 2004).

Une récente étude montre que le canal potassique BK est responsable d'un important courant potassique calcium et voltage-dépendant dans les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP (Yan and Aldrich, 2010). Notre première étude (article 1) confirme l'expression et l'activité fonctionnelle des canaux BK dans les cellules LNCaP. De plus, nous avons montré que ce courant de type BK est le courant voltage-dépendant majoritaire et est responsable du potentiel de repos des cellules LNCaP. Nos données suggèrent que ces canaux peuvent s'ouvrir au potentiel de repos (environ -40 mV) même dans des conditions de faibles concentrations de calcium cytosolique. L'étude menée par Yan et Aldrich en 2010 montre que l'association du canal BK avec la sous-unité régulatrice LRRC26 permet au canal BK d'être activé pour des potentiels proches du potentiel de repos dans les cellules LNCaP (Yan and Aldrich, 2010). Ainsi, LRRC26 est capable de diminuer le seuil d'activation du canal BK. De la même manière, nous avons montré que le canal $Ca_v3.2$ est capable lui aussi de modifier le seuil d'activation du canal potassique. L'identification de LRRC26 a été réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) et spectrométrie de masse après immunoprécipitation du canal BK dans les cellules LNCaP. La protéine LRRC26 possède une structure caractérisée par des domaines extracellulaires riches en leucine (LRR pour Leucine Rich Repeat) (Yan and Aldrich, 2012). C'est une protéine de 35 kDa avec un seul domaine transmembranaire, une région C-terminale cytoplasmique et une région N-terminale servant de peptide signal clivée lorsque la protéine est mature. Ce peptide est essentiel pour l'exposition extracellulaire du domaine LRR de cette protéine. Des études fonctionnelles sur des mutants de LRRC26 indiquent que la majeure partie de la protéine est requise pour sa fonction de protéine régulatrice tandis que la région transmembranaire est nécessaire à son association avec le canal BK (Yan and Aldrich, 2010). LRRC26 a été initialement identifié en tant que marqueur potentiel du cancer de la prostate où elle est fortement exprimée (Egland et al., 2006). L'expression du canal potassique BK est, elle aussi, corrélée positivement au cancer de la prostate (Bloch et al., 2007), suggérant l'implication de ce complexe dans la cancérogenèse prostatique et en particulier dans la prolifération. Cependant, une étude récente a montré que le niveau d'expression de la protéine LRRC26 augmente dans les cellules cancéreuses de stade androgéno-dépendant (cellules LNCaP) et diminue dans les cellules

cancéreuses de stade avancé (cellules PC3). De plus, la diminution d'expression de cette protéine diminue la croissance tumorale et les métastases (Liu et al., 2012).

Le canal calcique voltage-dépendant $Ca_v3.2$, exprimé dans les cellules LNCaP, génère un faible courant calcique et a la particularité d'être responsable d'un courant de fenêtre pour des potentiels proches de -40 mV, voisin du potentiel de repos (Mariot et al., 2002). Dans le premier article, nous montrons par des études d'électrophysiologie, d'imagerie confocale et d'immunoprécipitation l'existence d'un couplage fonctionnel entre BK et $Ca_v3.2$ dans les cellules LNCaP. L'activation du canal BK par le canal $Ca_v3.2$ est observée dans les cellules exprimant $Ca_v3.2$ de manière endogène et potentialisée dans les cellules surexprimant $Ca_v3.2$. Le canal $Ca_v3.2$, en générant un faible courant, provoque une entrée locale de calcium sous la membrane plasmique, permettant l'activation des canaux BK situés à proximité. Ainsi, le canal $Ca_v3.2$ activé permet au canal BK d'être ouvert à des potentiels de membrane plus négatifs (-40 mV) que lorsque le canal calcique est absent ou inactivé (-10 mV). Nous avons également montré par immunofluorescence et par co-immunoprécipitation que ces 2 canaux appartenaient à un même complexe protéique. L'interaction entre BK et $Ca_v3.2$ pourrait se faire de manière directe comme l'ont suggéré récemment Rehak et collaborateurs *via* le segment transmembranaire S0 du canal BK (Rehak et al., 2013), ou indirecte par l'intermédiaire d'une autre protéine appartenant à ce même complexe. Par exemple, une étude a montré que le canal BK pouvait interagir directement avec une sous-unité régulatrice de type $\beta 1$ des canaux calciques voltage-dépendants (Zou et al., 2008). Ces auteurs ont montré que le domaine Guanylate Cyclase de la sous-unité $\beta 1$ interagissait avec la région « Ca^{2+} bowl » de BK affectant la sensibilité du canal au calcium. Ainsi, la sous-unité $\beta 1$ ralentit les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal BK. De plus, la sous-unité β est également capable de s'associer aux canaux calciques voltage-dépendants. En effet, les sous-unités β peuvent interagir avec les canaux Ca_v et augmenter leur adressage et leur activité (Buraei and Yang, 2010). Il a été montré que la sous-unité β interagissait avec le domaine AID des canaux calciques HVA (Buraei and Yang, 2010) Le domaine AID est très bien conservé pour les canaux à haut seuil, mais peu conservée chez les canaux de type T. Cependant, une étude a montré que malgré une séquence différente du domaine AID classique, les sous-unités β peuvent interagir avec les domaines AID des canaux de type $Ca_v3.3$ avec une faible affinité (Bae et al., 2010). Cependant, l'interaction des canaux calciques de type T avec les sous-unités β pourrait se faire *via* d'autres domaines. En effet, il a été montré que $\beta 2$ pouvait interagir avec une région proche de l'extrémité C-terminale du canal $Ca_v2.3$ (Qin et al., 1997) et $\beta 4$ avec l'extrémité C-terminale de $Ca_v2.1$ (Walker et al., 1998). Par conséquent, cette sous-unité

pourrait être le lien physique entre le canal BK et le canal $Ca_v3.2$. La protéine β régulerait à la fois l'activité du canal calcique en jouant sur l'amplitude du courant et l'activité du canal potassique en modulant sa sensibilité au calcium. Dans le tissu prostatique, cette sous-unité β pourrait correspondre à $\beta4$. En effet, dans une seconde étude, nous avons identifié l'expression de plusieurs sous-unités régulatrices des canaux calciques voltage-dépendants dans le tissu prostatique sain et cancéreux. Parmi celles-ci, nous avons identifié, les sous-unités $\beta4$, $\gamma4$ et $\alpha2\delta2$. Il serait intéressant d'étudier par des études d'imagerie confocale et de coimmunoprécipitation, la localisation dans le tissu cancéreux et l'association de ces trois protéines, BK, $Ca_v3.2$ et $\beta4$ dans les lignées cancéreuses prostatiques. Pour tenter de mettre en évidence l'existence d'une interaction directe entre ces 3 protéines, une approche par « pull down » sera utilisée par la suite. De plus, grâce à l'utilisation de siARN, il sera alors possible d'étudier l'effet de la sous-unité $\beta4$ sur les courants calciques et potassiques par des études d'électrophysiologie.

Nous avons montré par des études d'immunohistochimie que les protéines $\beta4$, $\gamma4$ et $\alpha2\delta2$ sont exprimées dans les cellules épithéliales des acini prostatiques (article 2). A l'heure actuelle, aucune donnée publiée ne montre d'association directe du canal $Ca_v3.2$ avec l'une de ces sous-unités. Par des études d'immunoprécipitation, nous avons mis en évidence l'association du canal $Ca_v3.2$ et de la sous-unité $\alpha2\delta2$ au sein d'un même complexe protéique (article 2). Afin d'étudier si l'interaction entre ces deux protéines est directe, nous réaliserons une étude par Pull Down. De manière complémentaire, l'utilisation de mutant d' $\alpha2\delta2$, en cours de réalisation, permettra d'identifier les domaines impliqués dans cette interaction. En effet, des mutants de délétion des domaines VWA, MIDAS et Cache d' $\alpha2\delta2$ seront comparés lors d'expériences de coimmunoprécipitation avec $Ca_v3.2$. Dans le but de confirmer l'association de ces protéines sur des coupes de tissus, nous mettrons au point la technique de PLA (Proximity Ligation Assay). Afin de poursuivre cette étude, nous réaliserons une coimmunoprécipitation avec les autres sous-unités accessoires, à savoir $\beta4$ et $\gamma4$. De plus, il est connu que les sous-unités β interviennent dans l'adressage des canaux calciques à haut seuil à la membrane plasmique (Buraei and Yang, 2010). Qu'en est-il dans notre modèle d'étude ? $\beta4$ intervient-elle dans l'expression membranaire du canal $Ca_v3.2$? Pour répondre à cela, nous réaliserons une biotinylation sur les cellules LNCaP afin d'étudier l'expression membranaire de $Ca_v3.2$ et présence et en absence de $\beta4$. De plus, des études par siARN et par surexpression seront réalisées afin de mettre en évidence le rôle de $\beta4$ et $\gamma4$ sur l'expression du canal $Ca_v3.2$ ou encore d' $\alpha2\delta2$. Enfin, les sous-unités $\beta4$ et $\gamma4$ appartiennent-elles à ce complexe protéique ? Pour répondre à cette question, des études par co-immunoprécipitation

et PLA seront effectuées, et la co-localisation éventuelle du canal $Ca_v3.2$ avec ces sous-unités sera vérifiée par imagerie confocale.

Des études ont mis en évidence que l'activité des canaux T était augmentée par les sous-unités $\alpha2\delta$. Ainsi, il a été montré que les sous unités $\alpha2\delta1$ ou $\alpha2\delta2$ sont capables d'augmenter respectivement l'activité des canaux $Ca_v3.2$ et $Ca_v3.1$ dans des modèles de surexpression (Gao et al., 2000) (Dubel et al., 2004). Suite à la mise en évidence de l'association de $Ca_v3.2$ et $\alpha2\delta2$, nous avons montré sur le modèle cellulaire LNCaP- $Ca_v3.2$ que la suppression ou la diminution d'expression de la protéine $\alpha2\delta2$ endogène par approche siARN diminue de manière importante le courant calcique de type T. Cependant, aucune donnée à l'heure actuelle n'explique de façon précise comment cette sous-unité peut moduler l'activité du canal. Deux études établissent que le domaine VWA d' $\alpha2\delta$ est essentiel au mécanisme de régulation de l'activité du canal (Hoppa et al., 2012) (Canti et al., 2005). Par conséquent, à l'aide des différents mutants d' $\alpha2\delta2$ (délétions des domaines importants de la protéine) nous pourrions déterminer le domaine impliqué dans cette régulation d'activité par des études d'électrophysiologie. Enfin, comme je l'ai expliqué précédemment, nous mènerons une étude par une approche « pull down » afin d'étudier s'il y a une interaction directe entre le canal $Ca_v3.2$ et $\alpha2\delta2$.

Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de régulation par $\alpha2\delta2$ du canal $Ca_v3.2$ endogène. Une seule étude récente montre une régulation du canal $Ca_v3.2$ par la sous-unité $\alpha2\delta1$ de manière endogène, dans les ostéocytes (Thompson et al., 2011). Ceci pourrait s'expliquer par l'existence dans les cellules LNCaP d'une isoforme de $Ca_v3.2$ différente de la forme normale utilisée dans nos modèles de surexpression. En effet, plusieurs études ont mis en évidence différentes isoformes dans canaux calciques de type T (Ohkubo et al., 2005) (Zhong et al., 2006). Par exemple l'analyse de la séquence codante de $Ca_v3.2$ exprimée dans le cerveau possède 12 à 14 sites d'épissages alternatifs (Zhong et al., 2006). De même, les canaux $Ca_v3.2$ retrouvés dans l'utérus et les testicules possèdent des formes épissées dans la boucles entre les domaines III et IV (Jagannathan et al., 2002) (Ohkubo et al., 2005). Enfin, il a été montré que dans certain cas, l'épissage conduit à la génération de protéines avec des propriétés biophysiques différentes (Jagannathan et al., 2002). Nous étudierons donc si une forme alternative du canal $Ca_v3.2$ est exprimée dans les cellules LNCaP, et ceci afin de la cloner et de comparer sa séquence à celle des différentes formes connues.

Par ailleurs, l'activité du canal $Ca_v3.2$ peut être modulée par d'autres mécanismes tels que la phosphorylation (Huc et al., 2009) ou l'association avec d'autres protéines telles que la calcineurine (Huang et al., 2013) ou les protéines G (DePuy et al., 2006). Par conséquent, par

spectrométrie de masse, il serait intéressant de déterminer si d'autres protéines participent à ce complexe. De plus, parmi ces protéines, certaines sont-elles capables de réguler l'activité ou l'expression des canaux BK et Ca_v3.2 ? Enfin, la sous-unité régulatrice du canal BK, LRRC26, exerce-t-elle un rôle sur ce complexe en modulant par exemple l'interaction Ca_v3.2/BK ? Pour cela, une approche par siARN permettra d'étudier le rôle de LRRC26 et des différentes protéines identifiées comme appartenant au complexe, sur l'expression et l'activité des canaux BK et Ca_v3.2 notamment.

Ces résultats laissent donc supposer qu'il existe un complexe protéique potentiellement composé des protéines Ca_v3.2, BK, α 2 δ 2, β 4, γ 4 et LRRC26 entre autres qui régulent finement et précisément l'expression et l'activité des canaux de type T.

Complexe protéique et prolifération

Les canaux calciques voltage-dépendants de type T interviennent dans le développement et la prolifération des cellules saines (Lory et al., 2006). Cependant, de nombreuses études ont montré l'implication de ces canaux calciques dans la prolifération et la progression de différents cancers (Panner and Wurster, 2006). En effet, les canaux T sont notamment exprimés dans les tumeurs du sein, du cerveau, du colon, de l'estomac et de la prostate (Panner and Wurster, 2006) et dans certains cas favorisent leur développement. De même, l'implication du canal BK dans la prolifération a fait l'objet de plusieurs études sur différents modèles cellulaires, avec un rôle controversé. Par exemple, dans l'ostéosarcome, son inhibition par des siARN diminue la tumorigenèse *in vivo* (Cambien et al., 2008). Toutefois, dans le cancer du sein, son expression est corrélée à différentes phases de cycle cellulaire mais son inhibition ne provoque aucune perturbation de la prolifération cellulaire (Ouadid-Ahidouch et al., 2004). Concernant le cancer de la prostate, une équipe suggère que le canal BK puisse participer au passage vers l'androgéno-indépendance (Bloch et al., 2007). En effet, l'inhibition du canal diminue la prolifération des cellules PC3, cellules androgéno-indépendantes. Cependant, nous avons montré par des analyses du cycle cellulaire, par un test de survie et par l'expression de Ki67 que le couplage Ca_v3.2/BK participe à la prolifération des cellules cancéreuses androgéno-dépendantes LNCaP. En effet, les siARN et les inhibiteurs spécifiques de ces canaux diminuent le nombre de cellules en phase S et le nombre de cellules exprimant Ki67. Oeggerli et collaborateurs montrent que l'œstradiol induit la prolifération des cellules cancéreuses mammaires *via* l'activation de BK (Oeggerli et al., 2012). Ces données laissent penser que BK participe également à la prolifération hormono-dépendante des cellules tumorales. Par ailleurs, nous n'avons observé aucun effet additif lors

de l'inhibition de BK et Ca_v3.2 par des agents pharmacologiques sur la prolifération, suggérant que ces deux canaux participent à la même voie de signalisation.

En outre, BK, comme Ca_v3.2, participe à la sécrétion de PAP dans les cellules tumorales prostatiques. A partir de ces données, on peut penser que BK et Ca_v3.2 activent directement la prolifération *via* une voie de signalisation impliquant le Ca²⁺. Ces canaux peuvent aussi participer à la sécrétion de facteurs favorisant la prolifération. En effet, une étude du laboratoire a montré que le canal Ca_v3.2 participe à la sécrétion de PAP dans les cellules LNCaP (Gackiere et al., 2008). Plus généralement, il a été montré que les canaux T peuvent augmenter les sécrétions autocrines/paracrines des cellules dans lesquelles ces canaux sont fortement exprimés (Chemin et al., 2004). Ainsi, le complexe BK/Ca_v3.2 pourrait participer à la croissance cellulaire *via* la sécrétion de facteurs mitogènes. Par la suite, il serait donc intéressant d'étudier en utilisant des siARN et des inhibiteurs spécifiques, la sécrétion de différents facteurs de croissance dans les cellules exprimant ou non les canaux BK et Ca_v3.2.

Dans une seconde étude, nous avons confirmé l'implication de Ca_v3.2 dans la prolifération et nous avons mis en évidence, pour la première fois, l'implication de la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ dans la prolifération. En effet, la diminution d'expression de ces deux protéines par des siARN réduit la croissance des cellules LNCaP. De même, les différents clones de surexpression, LNCaP-Ca_v3.2 et LNCaP- $\alpha 2\delta 2$, ont une croissance plus importante par rapport aux cellules contrôles. Cependant, les effets de ces deux protéines ne s'additionnent pas, suggérant, comme pour le canal BK, l'implication de la même voie de signalisation. Ces résultats indiquent donc que le complexe formé de ces différentes protéines intervient dans une voie de signalisation, certainement Ca²⁺ dépendante, aboutissant à une augmentation de la prolifération cellulaire. Cependant, de manière surprenante, seuls les clones LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ augmentent l'activité NFAT, activité diminuée dans les clones LNCaP-Ca_v3.2. Cette diminution d'activité observée dans les clones LNCaP-Ca_v3.2 pourrait s'expliquer par une potentielle liaison du canal Ca_v3.2 avec la calcineurine. En effet, une étude récente montre que la calcineurine se lie au canal Ca_v3.2 *via* ses domaines de liaison à NFAT de manière calcium-dépendante (Huang et al., 2013). Cette liaison diminue alors l'activité NFAT des cellules. Ainsi, le fait de surexprimer le canal pourrait augmenter le nombre de liaisons Ca_v3.2/calcineurine, laissant moins de calcineurine disponible pour activer la voie NFAT. Ceci suggère alors qu'une autre voie que la voie NFAT peut être impliquée dans la prolifération induite par le canal Ca_v3.2. Parmi ces autres voies potentielles, les voies CREB et ERK semblent les plus probables.

En effet, le microdomaine calcique créé par l'entrée de calcium *via* le canal de type T pourrait activer la CaMKII, comme cela a été montré pour le canal calcique voltage-dépendant de type L (Wheeler et al., 2008). La CaMKII migre ensuite dans le noyau afin d'activer CREB, qui permet alors la transcription de gènes impliqués dans la prolifération. De plus, une étude montre que la surexpression de CaMKII augmente la sécrétion de PAP et favorise la croissance des cellules LNCaP (Rokhlin et al., 2007). Par ailleurs, une étude récente suggère que la prolifération induite par Ca_v3.2 passe par la voie ERK (Extracellular signal-regulated kinases) (Cove-Smith et al., 2013). En effet, les auteurs montrent que l'inhibition de Ca_v3.2 diminue la croissance cellulaire des cellules rénales qui s'accompagne d'une diminution du niveau de phosphorylation d'ERK. Ainsi, l'influx calcique est capable de stimuler la voie signalisation d'ERK *via* la PKC ou la CaMKII ou à travers l'activation éventuelle de ras *via* la calmoduline (Agell et al., 2002). Afin d'identifier la voie de signalisation impliquée dans la prolifération induite par Ca_v3.2 et BK, nous étudierons l'expression et la localisation de CaMKII dans les cellules exprimant ou non Ca_v3.2 et BK. De plus, nous étudierons les niveaux de phosphorylation de CREB et ERK afin de visualiser leur activation.

En outre, avec l'étude des sécrétions de PAP et de VEGF, nous avons montré un rôle opposé des protéines Ca_v3.2 et $\alpha 2\delta 2$ sur la sécrétion. En effet, Ca_v3.2 favorise la sécrétion de PAP et diminue celle de VEGF. Pour sa part, la surexpression d' $\alpha 2\delta 2$ inhibe la sécrétion de PAP et stimule la sécrétion de VEGF. Ces données, ajoutées à celles concernant l'activité NFAT, suggèrent qu' $\alpha 2\delta 2$ puisse avoir un rôle indépendant du canal Ca_v3.2 sur la sécrétion et la prolifération impliquant la voie NFAT.

Ces divergences peuvent provenir de l'association de Ca_v3.2 avec d'autres protéines partenaires en présence ou absence de la sous-unité $\alpha 2\delta 2$. Pour poursuivre cette étude, il serait intéressant donc de vérifier l'association d' $\alpha 2\delta 2$ avec Ca_v3.2 en présence ou absence des sous-unités accessoires $\beta 4$ et $\gamma 4$. Il serait également intéressant d'aborder dans ce contexte l'intervention de ces dernières dans la croissance cellulaire et dans la sécrétion de facteurs. Les effets sur la prolifération seront réalisés par des études de survie cellulaire grâce au kit MTS/PMS et la répartition des cellules dans le cycle cellulaire sera également abordée. Les études sur la sécrétion se feront notamment sur VEGF et PAP. De plus, certaines études suggèrent que les sous-unités β sont des régulateurs de la transcription (Zhang et al., 2010) (Tadmouri et al., 2012). Ainsi, on pourrait imaginer que *via* leur association avec les protéines Ca_v3.2 ou BK, ces sous-unités $\beta 4$ puissent transmettre l'information au noyau et activer indirectement la transcription de gènes impliqués dans la prolifération. La localisation de $\beta 4$ dans le noyau sera alors étudiée ainsi que la fixation éventuelle de cette dernière sur des

séquences promotrices des gènes par Chip (Chromosome immunoprécipitation) suivie de séquençage.

$\alpha 2\delta 2$, inducteur de tumorigenèse

Selon certaines études, le gène CACNA2D2 codant pour la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ pourrait être un potentiel gène suppresseur de tumeur (Lerman and Minna, 2000). En effet, la région chromosomique 3p21, région comprenant plusieurs gènes dont CACNA2D2, est délétée ou hyperméthylée dans les cancers du poumon, du rein, du sein ou du pancréas. De plus, $\alpha 2\delta 2$ favorise l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires NSCLC (Non-small-cell-lung-carcinoma) et réduit la croissance tumorale de ces cellules dans les souris *nude* (Carboni et al., 2003). Cependant, plus récemment, une étude a montré que la sous-unité $\alpha 2\delta 2$ est surexprimée dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires comparées aux lignées mammaires normales (da Costa Prando et al., 2011). Dans ce contexte, nous avons montré par immunohistochimie qu' $\alpha 2\delta 2$ est exprimée de manière plus importante dans les tissus cancéreux de plusieurs organes tels que la prostate, le colon, le poumon, le sein et le pancréas par rapport aux tissus sains. De plus, son expression est plus fréquente dans les tissus prostatiques cancéreux par rapport aux tissus sains et elle augmente avec le grade du cancer. Ces données suggèrent donc que CACNA2D2 peut être à la fois un gène suppresseur de tumeur et un oncogène en fonction des tissus et des conditions probablement dépendants des protéines partenaires exprimées. Cette propriété a déjà été démontrée pour le gène REST (Repressor Element-1 (RE-1) Silencing Transcription Factor) qui est à la fois oncogénique dans les cellules neurales et suppresseur de tumeur dans les tissus mammaires et pulmonaires (Negrini et al., 2013). Le gène RASFF1 (RAS-association domain family 1) possède lui aussi cette particularité dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires en fonction de l'isoforme exprimée (Pelosi et al., 2010). Ce gène code pour 8 transcrits (RASFF1A-H) contrôlés par 2 promoteurs. Les protéines issues de ce gène sont similaires aux protéines effectrices ras. Pelosi et collaborateurs ont mis en évidence la double fonction du gène RASFF1 dans les tumeurs neuroendocrines pulmonaires comme gène suppresseur de tumeur pour les isoformes RASFF1A/E et comme oncogène pour l'isoforme RASFF1C (Pelosi et al., 2010). De manière intéressante, le gène RASFF1 est situé sur le locus chromosomique 3p21, comme CACNA2D2.

Par des études *in vitro* et *in vivo*, nous avons montré que la surexpression d' $\alpha 2\delta 2$ accélère la prolifération cellulaire et augmente la prise et la croissance tumorales prostatiques. De plus, cette surexpression induit une augmentation de la concentration calcique intracellulaire et de

l'activité NFAT. Cette augmentation d'activité NFAT peut s'expliquer par une association de cette sous-unité avec un canal calcique autre que le canal $Ca_v3.2$. En effet, comme il a été démontré pour la sous-unité γ qui peut s'associer au récepteur AMPA (Diaz, 2010), il est possible que la sous-unité $\alpha2\delta2$ s'associe à un autre canal favorisant l'entrée calcique. Cette entrée de calcium activerait la voie NFAT qui peut alors jouer sur la transcription de gènes impliqués dans la prolifération. Une autre voie de transduction possible est la voie du récepteur aux androgènes, dont l'expression augmente dans les clones LNCaP- $\alpha2\delta2$. Ainsi, l'effet d' $\alpha2\delta2$ sur la prolifération pourrait passer par la voie d'activation du récepteur aux androgènes.

De plus, nous avons montré qu'un ligand d' $\alpha2\delta2$, la gabapentine, diminue le développement tumoral en inhibant l'effet prolifératif induit par la surexpression d' $\alpha2\delta2$. La présence d'une large partie extracellulaire contenant des régions connues pour être impliquées dans les interactions protéines/protéines, comme le domaine VWA, suggère qu' $\alpha2\delta2$ puisse servir de récepteur aux ligands extracellulaires. En plus de ses ligands, la gabapentine et la prégabaline, une étude a montré qu' $\alpha2\delta1$ pouvait fixer la thrombospondine (TSP1 et 2) (Eroglu et al., 2009). Cette famille de glycoprotéines extracellulaires est composée de 5 membres (TSP1 à 5). TSP1, la plus étudiée, est connue pour son implication dans l'adhésion cellulaire, la migration, la dynamique du cytosquelette et surtout dans l'angiogenèse. TSP1 et TSP2 ont fait l'objet de nombreuses études dans le cancer de la prostate. A l'heure actuelle, TSP1 est l'un des plus importants facteurs anti-angiogénique du cancer de la prostate (Miyata and Sakai, 2013). Cependant, il a été suggéré que TSP1 puisse participer également à la migration cellulaire (Firlej et al., 2011). De plus, son expression et sa fonction peuvent changer en fonction de l'androgéno-dépendance du cancer. En effet, le niveau d'expression de TSP1 est faible dans les cellules androgéno-dépendantes LNCaP et important dans les cellules PC3 (Firlej et al., 2011). Cependant, une étude récente montre que l'expression de TSP2 diminue dans les tissus cancéreux prostatiques comparés aux tissus sains (Matos et al., 2013). Cette diminution d'expression peut alors favoriser la progression du cancer, TSP2 étant associé à une réduction de l'angiogenèse. Dans notre étude, nous avons montré par des études d'immunohistologie que la surexpression d' $\alpha2\delta2$, en plus d'augmenter la croissance tumorale, favorise l'angiogenèse. En effet, nous avons observé une augmentation du nombre de vaisseaux et de l'expression de CD31 et VEGF dans les tumeurs issues des clones LNCaP- $\alpha2\delta2$ par rapport aux tumeurs contrôles. Par la suite, il serait donc intéressant d'étudier l'expression et la sécrétion de la TSP dans les différents clones de surexpression.

Nos résultats concernant la différenciation neuroendocrine prostatique montrent une augmentation de l'expression des transcrits $\alpha 2\delta 2$ (article 4) et VEGF (Figure 31) après différenciation des cellules LNCaP. Nous montrons également que la sécrétion de VEGF est augmentée dans les cellules différenciées, cellules qui surexpriment le canal $Ca_v3.2$ (Figure 31). Cependant, de manière surprenante, la sécrétion de VEGF diminue dans les clones de surexpression LNCaP- $Ca_v3.2$ (article 2).

Il existe 6 isoformes de VEGF (121 à 206 AA), toutes sécrétées. VEGF₁₂₁ est la seule forme totalement libre de VEGF tandis que les autres peuvent se fixer à la membrane plasmique ou à la MEC. Les cellules neuroendocrines expriment davantage VEGF₁₂₁ et VEGF₁₆₅ (Figure31). Une étude sur des coupes histologiques issues de différents patients montre que la quantité de cellules neuroendocrines prostatiques exprimant VEGF est associée au nombre de vaisseaux et au grade cancéreux (Borre et al., 2000). Ainsi, ces données peuvent être corrélées à l'expression de la protéine $\alpha 2\delta 2$. En effet, comme nos résultats le montrent, $\alpha 2\delta 2$ est impliqué dans l'angiogenèse et son expression augmente également avec le grade du cancer.

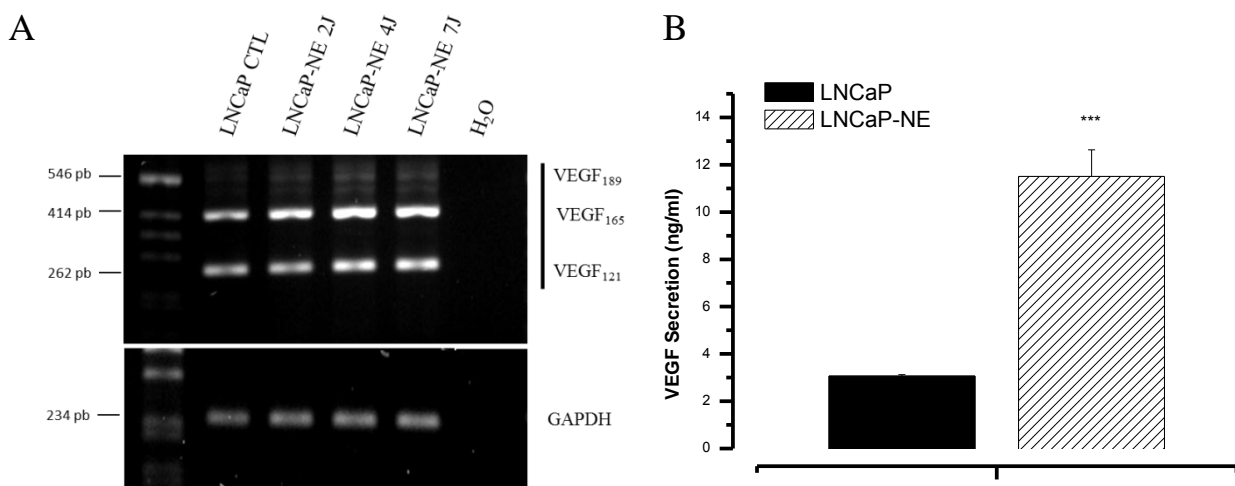


Figure 31 : Expression et sécrétion de VEGF par les cellules LNCaP neuroendocrines. Expression par PCR de VEGF (A) dans les cellules LNCaP-NE après 2, 4 et 7 jours de traitement AMPc (1 mM) IBMX (100 μ M). (B) Sécrétion de VEGF par les cellules LNCaP-NE (4J) après 24h d'incubation.

L'augmentation de la croissance tumorale induite par la surexpression d' $\alpha 2\delta 2$ peut également s'expliquer par un rôle sur l'adhésion. Comme je l'ai développé précédemment, la TSP est impliquée dans l'adhésion cellulaire. Cependant, la protéine $\alpha 2\delta 2$ seule pourrait intervenir sur l'adhésion cellulaire *via* son domaine VWA dans lequel on retrouve le motif MIDAS. Nos résultats montrent que le clone LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ adhère plus rapidement au support que les cellules LNCaP après trypsinisation (Figure32).

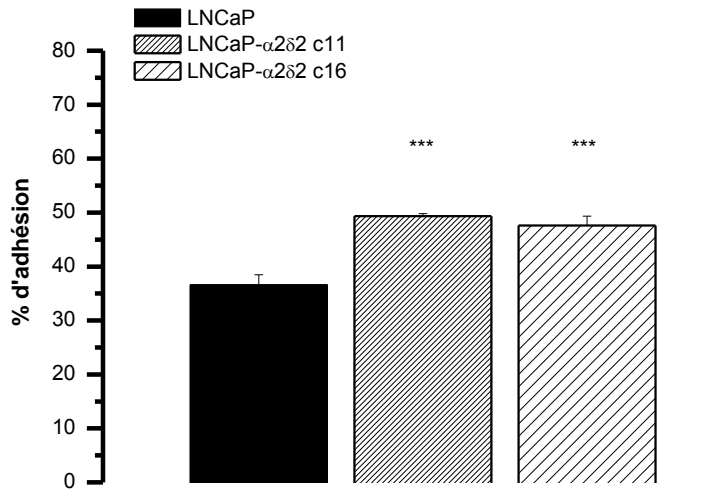


Figure 32 : Implication d' α 2 δ 2 dans l'adhésion cellulaire. La mesure de l'adhésion cellulaire est réalisée 3h après trypsinisation grâce au kit MTS/PMS. La quantité de cellules adhérentes est ramenée au nombre total de cellules.

De plus, la gabapentine, un ligand d' α 2 δ 2, diminue la croissance cellulaire *in vitro* et la prise tumorale *in vivo* des tumeurs LNCaP. Par sa fixation, proche du domaine VWA, la gabapentine pourrait gêner l'adhésion des cellules sur la matrice extracellulaire ou encore avoir un effet sur une voie de transduction impliquant α 2 δ 2. Afin de poursuivre cette étude, il serait intéressant de comparer l'effet des différentes mutations d' α 2 δ 2 sur la croissance tumorale, l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire.

α 2 δ 2, un marqueur diagnostique du cancer de la prostate ?

Les recherches concernant le cancer de prostate se penchent également sur l'établissement de nouveaux marqueurs pronostique et diagnostique. La mesure du taux sanguin de PSA reste à l'heure actuelle le meilleur test diagnostique du cancer de la prostate. Cependant, ce test est souvent associé à un grand nombre de faux positifs et de faux négatifs (Greene et al., 2009) (Thompson et al., 2004). De plus, la Haute Autorité de la Santé recommande de ne plus utiliser le test PSA de manière systématique chez les patients de plus de 50 ans n'ayant pas de symptômes de pathologies prostatiques (HAS, 2012).

Nos résultats ont mis en évidence l'expression de la sous-unité α 2 δ 2 des canaux calciques voltage-dépendants dans les tissus sains, cancéreux et lignées cancéreuses prostatiques. Une étude menée par Gao et collaborateurs avait montré en 2000 que le gène CACNA2D2 codant pour cette protéine était fortement exprimé dans les poumons, les testicules, le cœur, le cerveau et faiblement par la prostate et le muscle squelettique (Gao et al., 2000). Grâce à une approche d'immunofluorescence, nous avons montré qu' α 2 δ 2 est exprimée dans le tissu prostatique cancéreux au niveau des cellules épithéliales des acini. De plus, une analyse par

PCR sur différents échantillons issus d'individus sains et cancéreux a montré que l'expression d' $\alpha 2\delta 2$ est plus fréquente dans les tissus cancéreux.

Nous avons mené une étude plus large sur des « tissus array » issus de patients atteints de cancer de la prostate à différents grades. Nous avons mis en évidence, par immunohistochimie, une expression plus importante d' $\alpha 2\delta 2$ dans le tissu cancéreux, expression qui semble augmenter avec le grade des cancers prostatiques. Cette étude va à l'encontre des différentes études montrant une délétion du gène CACNA2D2 dans les cancers du poumon, du rein et du sein (Lerman and Minna, 2000). Notre étude propose alors qu' $\alpha 2\delta 2$ puisse être un marqueur diagnostique du cancer de la prostate puisque son niveau d'expression augmente avec l'évolution de ce cancer. Notre protéine d'intérêt est composée de la protéine $\alpha 2$ exclusivement extracellulaire associée par des ponts disulfures à la protéine $\delta 2$. Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser $\alpha 2\delta 2$ en tant que biomarqueur, nous avons cherché à savoir si $\alpha 2\delta 2$ pouvait être libéré dans le milieu de culture. Nous avons donc réalisé une précipitation des protéines du milieu de culture puis un western-blot. Ceci nous a permis de mettre en évidence l'expression d' $\alpha 2\delta 2$ dans le milieu de culture des cellules LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ (Figure 33) après 6 jours d'incubation

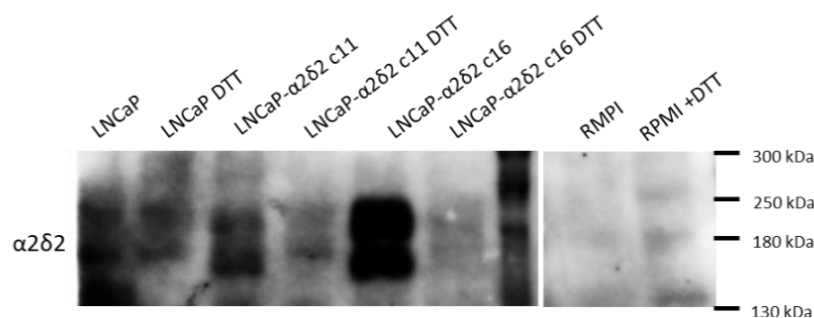


Figure 33 : Sécrétion d' $\alpha 2\delta 2$ par les cellules LNCaP- $\alpha 2\delta 2$. Expression d' $\alpha 2\delta 2$ est mesurée dans le milieu de culture des cellules LNCaP, des 2 clones de surexpression LNCaP- $\alpha 2\delta 2$ c11-c16 et dans le milieu de culture seul avec (30 minutes d'incubation) et sans DTT (10 mM) (6 jours d'incubation). Dans nos conditions, DTT n'induit pas la libération d'une quantité détectable d' $\alpha 2\delta 2$ des membranes plasmiques

De plus, cette sous-unité est légèrement détectable dans le milieu de culture des cellules LNCaP. On peut émettre l'hypothèse qu' $\alpha 2\delta 2$ est libéré de différentes manières dans le milieu de culture:

- par production d'exosomes ou prostasomes qui correspondent à des petites vésicules membranaires extracellulaires (100 nm de diamètre) libérées par exocytose à partir des corps multivésiculaires des cellules épithéliales. Ces exosomes, retrouvés dans l'urine ou le liquide séminal, contiennent un grand nombre de protéines dont l'identité a été partiellement étudiée (Utleg et al., 2003). Ainsi, ces prostasomes contiennent des protéines membranaires de type

GLUT5 (Glucose Transporter 5), VAT-1 (synaptic vesicle membrane protein homologue) ou SCA2 (synaptic carrier associated membrane protein- une protéine à groupement GPI) ou encore l'antigène CD81. D'autre part, ces prostasomes qui sont normalement libérés dans le liquide séminal peuvent se retrouver dans le plasma sanguin au cours du développement de cancers prostatiques (Tavoosidana et al., 2011). Ainsi, il est envisageable que $\alpha 2\delta 2$ soit libéré dans le liquide séminal ou le plasma sanguin par ces prostasomes et puisse être dosé dans d'autres liquides biologiques que l'urine.

- par hydrolyse des ponts disulfures. Il est connu que les ponts disulfures peuvent être clivés dans l'environnement extracellulaire par différentes enzymes telles que la disulfure isomérase et la phosphoglycerate kinase (Hogg, 2003). De plus, ces enzymes sont présentes dans l'espace extracellulaire des cellules épithéliales prostatiques et leur expression augmente avec le développement tumoral.

- par hydrolyse du groupement GPI qui permet l'ancrage d' $\alpha 2\delta 2$ à la membrane. Certaines enzymes telles que les phospholipases C et D sont capables de libérer les protéines ancrées à la membrane plasmique en clivant leur domaine GPI. Ainsi, les métalloprotéines MMP1, 2, 9 et 13 hydrolysent les groupements GPI de la protéine EphrinA1, ligand des récepteurs à tyrosine kinase, et la libèrent dans le milieu extracellulaire (Beauchamp et al., 2012). L'importance de ce mécanisme dans le développement tumoral peut être soulignée par la surexpression des MMP dans la majorité des cancers invasifs.

Nos résultats ne nous permettent pas de conclure sur la présence d' $\alpha 2$ ou $\alpha 2\delta 2$ dans le milieu de culture. En effet, il est difficile de distinguer la partie $\alpha 2$ de la protéine $\alpha 2\delta 2$ à cause d'une forte glycosylation de la protéine et du faible poids moléculaire de $\delta 2$ (20 kDa). L'utilisation d'un anticorps ciblant la partie $\delta 2$ depuis peu sur le marché permettra de distinguer plus précisément les différentes parties de la protéine exprimées à la membrane des cellules et/ou libérées dans le milieu extracellulaire. Ainsi, la protéine $\alpha 2\delta 2$ pourrait être clivée *in vivo* et libérée dans les fluides biologiques comme les urines et le sperme. Ainsi, une augmentation de son expression pourrait alors être détectée chez les individus atteints d'un cancer prostatique. Il serait donc très intéressant de mettre en évidence la présence de la protéine $\alpha 2\delta 2$ dans les urines ou le sperme issus de patients atteints d'un cancer prostatique.

Différentiation neuroendocrine

Il a été montré que l'expression et l'activité des canaux calciques de type T, $Ca_v3.2$, augmentent au cours de la différenciation neuroendocrine (Mariot et al., 2002) et ont un rôle central dans la sécrétion (de PAP notamment) (Gackiere et al., 2008). Cependant, une

question importante concernant ces canaux reste sans réponse : ces canaux participent-ils à la différenciation neuroendocrine ?

Il a été montré que le blocage des canaux $Ca_v3.2$ par le Ni^{2+} ralentit le processus d'élongation des neurites sans l'inhiber (Mariot et al., 2002). De plus, nous avons montré que l'expression de NSE (marqueur de différenciation) augmente dans les cellules surexprimant $Ca_v3.2$ (LNCaP- $Ca_v3.2$). A l'inverse, l'expression de ce marqueur diminue dans les cellules LNCaP-NE lors d'un traitement si $Ca_v3.2$. Ces résultats suggèrent que $Ca_v3.2$, canal impliqué dans la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques, participe également à la différenciation neuroendocrine. L'implication d'une même protéine dans ces deux processus (prolifération et différenciation) a déjà été montrée. En effet, Farini et collaborateurs ont montré que PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide) induit la différenciation neuroendocrine et stimule la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques (Farini et al., 2003). Ainsi, $Ca_v3.2$ pourrait, selon les signaux de transduction qui l'active et donc selon la voie de signalisation impliquée, induire la prolifération ou la différenciation.

Par ailleurs, il est connu qu'une privation d'androgènes induit la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques. Cette différenciation est accompagnée d'une diminution d'expression du PSA dans ces cellules (Yuan et al., 2006). Nous avons observé ce phénomène dans les cellules différenciées LNCaP-NE. De plus, nous avons montré pour la première fois que la surexpression de $Ca_v3.2$ provoque une perte d'expression du PSA (résultats complémentaires Figure 29). Ces données, ajoutées à celles décrites précédemment, nous permettent d'affirmer que le niveau d'expression de PSA est inversement corrélé à celui de NSE. Ceci confirme bien le rôle de $Ca_v3.2$ dans le phénomène de différenciation neuroendocrine.

De plus, nous avons montré que la différenciation neuroendocrine est accompagnée d'une augmentation d'expression de la sous-unité $\alpha2\delta2$. Nos résultats montrent une légère augmentation du niveau d'expression du canal BK lors de la différenciation neuroendocrine (Figure 34). Cependant, ce résultat mérite d'être confirmé en PCR quantitative. L'expression d'un autre canal calcique est augmentée lors de la différenciation neuroendocrine, le canal TRPV2 (Monet et al., 2010). Ce canal est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques agressives, PC3 et DU145. Son expression apparaît dans les cellules LNCaP avec des traitements qui induisent la différenciation neuroendocrine (Monet et al., 2010). De plus, cette étude montre que le phénotype neuroendocrine est dépendant de la présence de ce canal puisque son inhibition aboutit à une diminution du taux d'expression de NSE. Par la suite, il

serait donc intéressant d'étudier l'existence d'une association par coimmunoprécipitation entre le canal $Ca_v3.2$ et TRPV2 dans les cellules LNCaP différenciées.

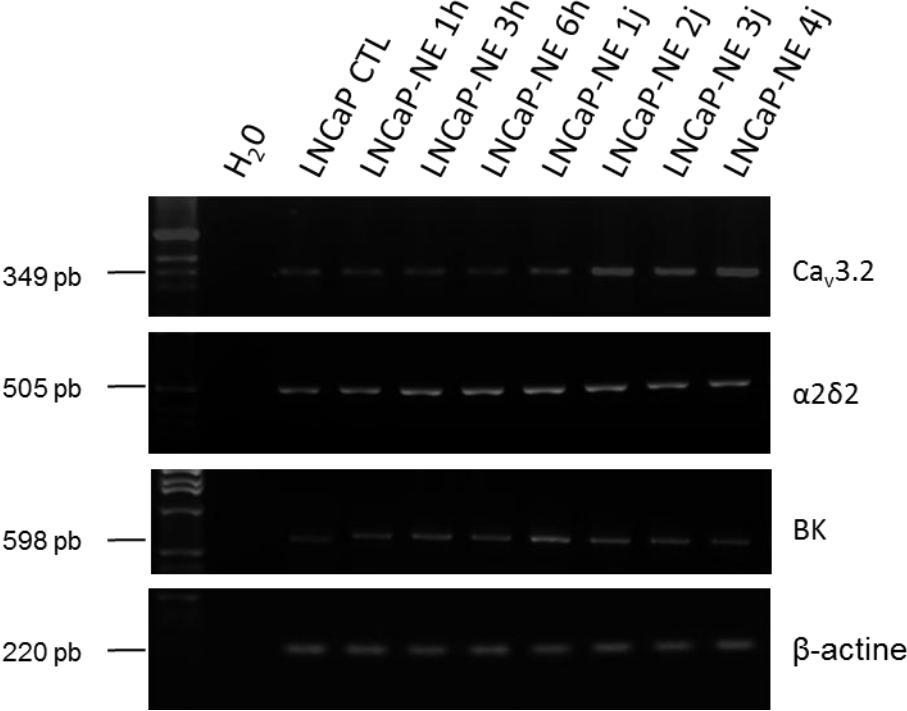


Figure 34 : Expression par PCR de $Ca_v3.2$, $\alpha2\delta2$ et BK lors de la différenciation neuroendocrine

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié l'implication du canal calcique de type T, $Ca_v3.2$ et de ses protéines partenaires dans les processus impliqués dans la cancérogenèse prostatique, en particulier la prolifération, la différenciation et la sécrétion.

Ces travaux ont permis d'élargir les connaissances sur l'activité, la régulation et le rôle des canaux de type T dans les cellules cancéreuses prostatiques. En effet, les canaux $Ca_v3.2$ sont à la base d'un complexe protéique fonctionnel associant le canal potassique BK mais aussi les sous-unités régulatrices de type β_4 , γ_4 et $\alpha_{2\delta 2}$ dans les cellules LNCaP. Ces canaux participent à la croissance cellulaire, à la sécrétion de PAP et à la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques.

En outre, nos travaux ont permis d'identifier une nouvelle protéine, $\alpha_{2\delta 2}$, impliquée dans le cancer de la prostate. Cette protéine possède une double fonction, elle est à la fois sous-unité régulatrice du canal $Ca_v3.2$ mais également une protéine oncogénique. Cette protéine favorise le développement tumoral, en particulier l'angiogenèse et son expression augmente avec la progression du cancer prostatique. De façon intéressante, la fixation d'un agent pharmacologique, la gabapentine, sur cette sous-unité inhibe le développement tumoral. Ainsi, la protéine $\alpha_{2\delta 2}$ pourrait constituer un marqueur diagnostique et une cible potentielle dans les traitements des cancers prostatiques.

Finalement, l'ensemble de ce travail ouvre des perspectives thérapeutiques. En effet, actuellement il existe différents médicaments ayant pour cible les canaux T (mibefradil, utilisé comme antihypertenseur, dont la commercialisation s'est arrêtée en 1998) et $\alpha_{2\delta 2}$ (gabapentine et prégabaline). Ainsi, le complexe identifié dans cette étude pourrait constituer une cible pharmacologique pour traiter les cancers prostatiques. De plus, une analyse plus approfondie de l'expression d' $\alpha_{2\delta 2}$ au cours de l'évolution de la maladie pourrait confirmer son utilité comme potentiel marqueur pronostique ou diagnostique.

PUBLICATIONS
ET
COMMUNICATIONS
PERSONNELLES

Publications :

Gackière F*, **Warnier* M**, Katsogiannou M, Derouiche S, Delcourt P, Dewailly E, Slomianny C, Humez S, Prevarskaya N, Roudbaraki M and Mariot P. Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology Open* 2013 2:941-951; *Advance Online Article August 2, 2013, doi:10.1242/bio.20135215*

Derouiche S, **Warnier M**, Mariot P, Gosset P, Mauroy B, Bonnal JL, Slomianny C, Delcourt P, Prevarskaya N, Roudbaraki M. Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signaling. *Springerplus*. 2013 Dec;2(1):54. Epub 2013 Feb 15.

Warnier M, Gackière F, Roudbaraki M, and Mariot P. Role of T-type calcium channels in neuroendocrine differentiation. In “T-type calcium channel in basic and clinical science” Springer, Schaffer, Stephen W.; Wu, Songwei; Li, Ming (Eds.) Sous presse

Derouiche S, **Warnier M**, Mariot P, Vancauwenberghe E, Gosset P, Mauroy B, Bonnal J.L, Slomianny C, Delcourt P, Prevarskaya N and Roudbaraki M. Antibacterial agent Triclosan prevents apoptosis *via* a modification of calcium signalling in human prostate cancer cells *British Journal of Pharmacology*, en revision

Derouiche S, Mariot P, **Warnier M**, Bidaux G, Vancauwenberghe E, Gosset P, Mauroy B, Bonnal J.L, Slomianny C, Delcourt P, Lepage G, Prevarskaya N and Roudbaraki M. Activation of TRPA1 Channel by Antibacterial Agent Triclosan Induces VEGF Secretion in Human Prostate Cancer Stromal Cells. *Cancer Prevention Research*, soumis

Warnier M, Roudbaraki M, Derouiche S, Bokhobza A, Delcourt P, Prevarskaya N, and Mariot P. $\alpha 2\delta 2$ subunits regulate prostate cell proliferation and cell secretion independently of Cav3.2 voltage-dependent calcium channels in prostate cancer cells. En préparation

Warnier M, Roudbaraki M, Derouiche S, Delcourt P, Dewailly E, Prevarskaya N and Mariot P. $\alpha 2\delta 2$ (CACNA2D2) subunits induce tumorigenesis in mice xenografts through a stimulation of cell proliferation and angiogenesis. En préparation

Brevet :

Méthode de détection in vitro d'un cancer de la prostate et/ou d'une métastase prostatique chez un sujet en déterminant le niveau d'expression du gène CACNA2D2 dans un échantillon biologique. **Warnier M**, Roudbaraki M, Prevarskaya N et Mariot P. Dépôt de brevet en cours.

Communication orale :

Rôle du canal calcique de type T, CaV3.2 et de son partenaire $\alpha 2\delta 2$ dans le développement des cancers prostatiques. **Warnier M**, Roudbaraki M et Mariot P. Journée cancérologie de Lille. Mai 2012

Communications affichées :

Implication of the $\alpha 2\delta 2$ regulatory subunit of voltage-dependent calcium channels in human prostate carcinogenesis. **Warnier M**, Derouiche S, Delcourt P, Prevarskaya N, Roudbaraki R and Mariot P. 24ème colloque annuel Canaux ioniques île d'Oléron 15-18 septembre 2013.

Implication of $\alpha 2\delta 2$, a putative regulatory subunit of Cav3.2 T-type calcium channels, in human prostate carcinogenesis **Warnier M**, Roudbaraki M, Derouiche S, Prevarskaya N and Mariot P. Journée André Verbert Lille Septembre 2012

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul, M., and Hoosein, N. (2002). Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep* 9, 961-964.
- Abdul, M., Santo, A., and Hoosein, N. (2003). Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res* 23, 3347-3351.
- Abrahamsson, P. A. (1999). Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* 6, 503-519.
- Adelman, J. P., Maylie, J., and Sah, P. (2012). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels: form and function. *Annu Rev Physiol* 74, 245-269.
- Agell, N., Bachs, O., Rocamora, N., and Villalonga, P. (2002). Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca^{2+} , and calmodulin. *Cell Signal* 14, 649-654.
- Ahmann, F. R., and Schifman, R. B. (1987). Prospective comparison between serum monoclonal prostate specific antigen and acid phosphatase measurements in metastatic prostatic cancer. *J Urol* 137, 431-434.
- Aizawa, H., Hu, S. C., Bobb, K., Balakrishnan, K., Ince, G., Gurevich, I., Cowan, M., and Ghosh, A. (2004). Dendrite development regulated by CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science* 303, 197-202.
- Akaike, N., Kanaide, H., Kuga, T., Nakamura, M., Sadoshima, J., and Tomoike, H. (1989). Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *J Physiol* 416, 141-160.
- Alberti, C. (2010). Neuroendocrine differentiation in prostate carcinoma: focusing on its pathophysiologic mechanisms and pathological features. *G Chir* 31, 568-574.
- Alonso, M. T., and Garcia-Sancho, J. (2011). Nuclear Ca^{2+} signalling. *Cell Calcium* 49, 280-289.
- Altier, C., Garcia-Caballero, A., Simms, B., You, H., Chen, L., Walcher, J., Tedford, H. W., Hermosilla, T., and Zamponi, G. W. (2011). The Cavbeta subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* 14, 173-180.
- Ammon, J., Karstens, J. H., and Rathert, P. (1977). [TNM-system orientated radiological therapy in prostatic carcinoma (author's transl)]. *Urologe A* 16, 73-82.
- Anderson, D., Rehak, R., Hameed, S., Mehaffey, W. H., Zamponi, G. W., and Turner, R. W. (2010). Regulation of the KV4.2 complex by CaV3.1 calcium channels. *Channels (Austin)* 4, 163-167.
- Arikkath, J., and Campbell, K. P. (2003). Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13, 298-307.
- Aronowitz, J. N., and Rivard, M. J. (2013). The phylogeny of permanent prostate brachytherapy. *J Contemp Brachytherapy* 5, 89-92.
- Artibani, W. (2012). Landmarks in prostate cancer diagnosis: the biomarkers. *BJU Int* 110 Suppl 1, 8-13.
- Attar, R. M., Takimoto, C. H., and Gottardis, M. M. (2009). Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res* 15, 3251-3255.
- Augustine, G. J. (2001). How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr Opin Neurobiol* 11, 320-326.
- Bading, H. (2000). Transcription-dependent neuronal plasticity the nuclear calcium hypothesis. *Eur J Biochem* 267, 5280-5283.

- Bae, J., Suh, E. J., and Lee, C. (2010). Interaction of T-type calcium channel Ca(V)_{3.3} with the beta-subunit. *Mol Cells* *30*, 185-191.
- Baillargeon, J., Pollock, B. H., Kristal, A. R., Bradshaw, P., Hernandez, J., Basler, J., Higgins, B., Lynch, S., Rozanski, T., Troyer, D., and Thompson, I. (2005). The association of body mass index and prostate-specific antigen in a population-based study. *Cancer* *103*, 1092-1095.
- Bang, Y. J., Pirnia, F., Fang, W. G., Kang, W. K., Sartor, O., Whitesell, L., Ha, M. J., Tsokos, M., Sheahan, M. D., Nguyen, P., *et al.* (1994). Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 5330-5334.
- Bansal, D., Bhansali, A., Kapil, G., Undela, K., and Tiwari, P. (2013). Type 2 diabetes and risk of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Prostate Cancer Prostatic Dis* *16*, 151-158.
- Barclay, J., Balaguero, N., Mione, M., Ackerman, S. L., Letts, V. A., Brodbeck, J., Canti, C., Meir, A., Page, K. M., Kusumi, K., *et al.* (2001). Ducky mouse phenotype of epilepsy and ataxia is associated with mutations in the *Cacna2d2* gene and decreased calcium channel current in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* *21*, 6095-6104.
- Barranco, W. T., and Eckhart, C. D. (2006). Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells. *Br J Cancer* *94*, 884-890.
- Barron, D. A., and Rowley, D. R. (2012). The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer* *19*, R187-204.
- Beauchamp, A., Lively, M. O., Mintz, A., Gibo, D., Wykosky, J., and Debinski, W. (2012). EphrinA1 is released in three forms from cancer cells by matrix metalloproteases. *Mol Cell Biol* *32*, 3253-3264.
- Beaumont, V., Llobet, A., and Lagnado, L. (2005). Expansion of calcium microdomains regulates fast exocytosis at a ribbon synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 10700-10705.
- Bech-Hansen, N. T., Naylor, M. J., Maybaum, T. A., Pearce, W. G., Koop, B., Fishman, G. A., Mets, M., Musarella, M. A., and Boycott, K. M. (1998). Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* *19*, 264-267.
- Becker, C., Piironen, T., Pettersson, K., Hugosson, J., and Lilja, H. (2000). Clinical value of human glandular kallikrein 2 and free and total prostate-specific antigen in serum from a population of men with prostate-specific antigen levels 3.0 ng/mL or greater. *Urology* *55*, 694-699.
- Bellezza, I., Bracarda, S., Caserta, C., and Minelli, A. (2006). Targeting of EGFR tyrosine kinase by ZD1839 ("Iressa") in androgen-responsive prostate cancer in vitro. *Mol Genet Metab* *88*, 114-122.
- Bennett, D. L., Bootman, M. D., Berridge, M. J., and Cheek, T. R. (1998). Ca²⁺ entry into PC12 cells initiated by ryanodine receptors or inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Biochem J* *329* (Pt 2), 349-357.
- Berggren, P. O., Yang, S. N., Murakami, M., Efanov, A. M., Uhles, S., Kohler, M., Moede, T., Fernstrom, A., Appelskog, I. B., Aspinwall, C. A., *et al.* (2004). Removal of Ca²⁺ channel beta3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell* *119*, 273-284.
- Berkefeld, H., Fakler, B., and Schulte, U. (2010). Ca²⁺-activated K⁺ channels: from protein complexes to function. *Physiol Rev* *90*, 1437-1459.

- Berkefeld, H., Sailer, C. A., Bildl, W., Rohde, V., Thumfart, J. O., Eble, S., Klugbauer, N., Reisinger, E., Bischofberger, J., Oliver, D., *et al.* (2006). BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science* 314, 615-620.
- Bernardi, P., and Rasola, A. (2007). Calcium and cell death: the mitochondrial connection. *Subcell Biochem* 45, 481-506.
- Bernstein, G. M., and Jones, O. T. (2007). Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: role of the alpha2/delta subunit. *Cell Calcium* 41, 27-40.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bertolesi, G. E., Shi, C., Elbaum, L., Jollimore, C., Rozenberg, G., Barnes, S., and Kelly, M. E. (2002). The Ca(2+) channel antagonists mibefradil and pimozide inhibit cell growth via different cytotoxic mechanisms. *Mol Pharmacol* 62, 210-219.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y., and De Waard, M. (2000). The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177-190.
- Biel, M., and Michalakakis, S. (2009). Cyclic nucleotide-gated channels. *Handb Exp Pharmacol*, 111-136.
- Biel, M., Ruth, P., Bosse, E., Hullin, R., Stuhmer, W., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1990). Primary structure and functional expression of a high voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett* 269, 409-412.
- Blaheta, R. A., Hailer, N. P., Brude, N., Wittig, B., Oppermann, E., Leckel, K., Harder, S., Scholz, M., Weber, S., Encke, A., and Markus, B. H. (1998). Novel mode of action of the calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): potent immunosuppression by inhibition of T-cell infiltration through allogeneic endothelium. *Immunology* 94, 213-220.
- Bloch, M., Ousingsawat, J., Simon, R., Schraml, P., Gasser, T. C., Mihatsch, M. J., Kunzelmann, K., and Bubendorf, L. (2007). KCNMA1 gene amplification promotes tumor cell proliferation in human prostate cancer. *Oncogene* 26, 2525-2534.
- Bloodgood, B. L., and Sabatini, B. L. (2007). Nonlinear regulation of unitary synaptic signals by CaV(2.3) voltage-sensitive calcium channels located in dendritic spines. *Neuron* 53, 249-260.
- Bonkhoff, H. (1998). Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *Prostate Suppl* 8, 18-22.
- Bonkhoff, H. (2001). Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 12 Suppl 2, S141-144.
- Bonkhoff, H., Stein, U., and Remberger, K. (1995). Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Hum Pathol* 26, 167-170.
- Bonkhoff, H., Wernert, N., Dhom, G., and Remberger, K. (1991). Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate* 19, 91-98.
- Bootman, M. D., and Berridge, M. J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* 83, 675-678.

- Bootman, M. D., Lipp, P., and Berridge, M. J. (2001). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci* 114, 2213-2222.
- Borre, M., Nerstrom, B., and Overgaard, J. (2000). Association between immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-expressing neuroendocrine-differentiated tumor cells, and outcome in prostate cancer patients subjected to watchful waiting. *Clin Cancer Res* 6, 1882-1890.
- Bourdoumis, A., Papatsoris, A. G., Chrisofos, M., Efstathiou, E., Skolarikos, A., and Deliveliotis, C. (2010). The novel prostate cancer antigen 3 (PCA3) biomarker. *Int Braz J Urol* 36, 665-668; discussion 669.
- Bourinet, E., Soong, T. W., Stea, A., and Snutch, T. P. (1996). Determinants of the G protein-dependent opioid modulation of neuronal calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1486-1491.
- Breckenridge, D. G., Germain, M., Mathai, J. P., Nguyen, M., and Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22, 8608-8618.
- Brodbeck, J., Davies, A., Courtney, J. M., Meir, A., Balaguero, N., Canti, C., Moss, F. J., Page, K. M., Pratt, W. S., Hunt, S. P., *et al.* (2002). The ducky mutation in *Cacna2d2* results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function. *J Biol Chem* 277, 7684-7693.
- Bruggemann, A., Stuhmer, W., and Pardo, L. A. (1997). Mitosis-promoting factor-mediated suppression of a cloned delayed rectifier potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 537-542.
- Budde, T., Meuth, S., and Pape, H. C. (2002). Calcium-dependent inactivation of neuronal calcium channels. *Nat Rev Neurosci* 3, 873-883.
- Bultynck, G., Vermassen, E., Szlufcik, K., De Smet, P., Fissore, R. A., Callewaert, G., Missiaen, L., De Smedt, H., and Parys, J. B. (2003). Calcineurin and intracellular Ca²⁺-release channels: regulation or association? *Biochem Biophys Res Commun* 311, 1181-1193.
- Bunker, C. H., Patrick, A. L., Maharaj, G., Keenan, H. A., Ramnarine, S., Belle, A., Richard, J. R., and Dhir, R. (2002). Prostate cancer risk is three-fold higher among men, aged 50-64, of African descent compared with men of Asian-Indian descent in Trinidad and Tobago. *Ethn Dis* 12, S3-30-33.
- Burarei, Z., and Yang, J. (2010). The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev* 90, 1461-1506.
- 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, 5975-5979.
- Buxbaum, J. D., Choi, E. K., Luo, Y., Lilliehook, C., Crowley, A. C., Merriam, D. E., and Wasco, W. (1998). Calsenilin: a calcium-binding protein that interacts with the presenilins and regulates the levels of a presenilin fragment. *Nat Med* 4, 1177-1181.
- Cabrespine, A., Guy, L., Chollet, P., Debiton, E., and Bay, J. O. (2004). [Molecular mechanisms involved in hormone resistance of prostate cancer]. *Bull Cancer* 91, 747-757.
- Calderon-Rivera, A., Andrade, A., Hernandez-Hernandez, O., Gonzalez-Ramirez, R., Sandoval, A., Rivera, M., Gomora, J. C., and Felix, R. (2012). Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca(2+) channel alpha(2)delta-1 auxiliary subunit. *Cell Calcium* 51, 22-30.

- Calvert, R. C., Shabbir, M., Thompson, C. S., Mikhailidis, D. P., Morgan, R. J., and Burnstock, G. (2004). Immunocytochemical and pharmacological characterisation of P2-purinoceptor-mediated cell growth and death in PC-3 hormone refractory prostate cancer cells. *Anticancer Res* 24, 2853-2859.
- Cambien, B., Rezzonico, R., Vitale, S., Rouzaire-Dubois, B., Dubois, J. M., Barthel, R., Karimjee, B. S., Mograbi, B., Schmid-Alliana, A., and Schmid-Antomarchi, H. (2008). Silencing of hSlo potassium channels in human osteosarcoma cells promotes tumorigenesis. *Int J Cancer* 123, 365-371.
- Campbell, V., Berrow, N. S., Fitzgerald, E. M., Brickley, K., and Dolphin, A. C. (1995). Inhibition of the interaction of G protein G(o) with calcium channels by the calcium channel beta-subunit in rat neurones. *J Physiol* 485 (Pt 2), 365-372.
- Campos-Toimil, M., Bagrij, T., Edwardson, J. M., and Thomas, P. (2002). Two modes of secretion in pancreatic acinar cells: involvement of phosphatidylinositol 3-kinase and regulation by capacitative Ca(2+) entry. *Curr Biol* 12, 211-215.
- Canti, C., Davies, A., Berrow, N. S., Butcher, A. J., Page, K. M., and Dolphin, A. C. (2001). Evidence for two concentration-dependent processes for beta-subunit effects on alpha1B calcium channels. *Biophys J* 81, 1439-1451.
- Canti, C., Nieto-Rostro, M., Foucault, I., Heblich, F., Wratten, J., Richards, M. W., Hendrich, J., Douglas, L., Page, K. M., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2005). The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of alpha2delta subunits is key to trafficking voltage-gated Ca2+ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11230-11235.
- Carboni, G. L., Gao, B., Nishizaki, M., Xu, K., Minna, J. D., Roth, J. A., and Ji, L. (2003). CACNA2D2-mediated apoptosis in NSCLC cells is associated with alterations of the intracellular calcium signaling and disruption of mitochondria membrane integrity. *Oncogene* 22, 615-626.
- Carrion, A. M., Link, W. A., Ledo, F., Mellstrom, B., and Naranjo, J. R. (1999). DREAM is a Ca2+-regulated transcriptional repressor. *Nature* 398, 80-84.
- Castro, M., Grau, L., Puerta, P., Gimenez, L., Venditti, J., Quadrelli, S., and Sanchez-Carbayo, M. (2010). Multiplexed methylation profiles of tumor suppressor genes and clinical outcome in lung cancer. *J Transl Med* 8, 86.
- Catalona, W. J., Smith, D. S., Ratliff, T. L., Dodds, K. M., Coplen, D. E., Yuan, J. J., Petros, J. A., and Andriole, G. L. (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 324, 1156-1161.
- Catterall, W. A. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16, 521-555.
- Center, M. M., Jemal, A., Lortet-Tieulent, J., Ward, E., Ferlay, J., Brawley, O., and Bray, F. (2012). International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol* 61, 1079-1092.
- Chemin, J., Nargeot, J., and Lory, P. (2004). Ca(v)3.2 calcium channels control an autocrine mechanism that promotes neuroblastoma cell differentiation. *Neuroreport* 15, 671-675.
- 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, 33-39.
- Chen, Y. C., Page, J. H., Chen, R., and Giovannucci, E. (2008). Family history of prostate and breast cancer and the risk of prostate cancer in the PSA era. *Prostate* 68, 1582-1591.

- Cheng, L., Montironi, R., Bostwick, D. G., Lopez-Beltran, A., and Berney, D. M. (2012). Staging of prostate cancer. *Histopathology* *60*, 87-117.
- Chigurupati, S., Venkataraman, R., Barrera, D., Naganathan, A., Madan, M., Paul, L., Pattisapu, J. V., Kyriazis, G. A., Sugaya, K., Bushnev, S., *et al.* (2010). Receptor channel TRPC6 is a key mediator of Notch-driven glioblastoma growth and invasiveness. *Cancer Res* *70*, 418-427.
- Chin, D., and Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* *10*, 322-328.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- Chopin, L. K., and Herington, A. C. (2001). A potential autocrine pathway for growth hormone releasing hormone (GHRH) and its receptor in human prostate cancer cell lines. *Prostate* *49*, 116-121.
- Chu, P. J., Robertson, H. M., and Best, P. M. (2001). Calcium channel gamma subunits provide insights into the evolution of this gene family. *Gene* *280*, 37-48.
- Chuang, T. D., Chen, S. J., Lin, F. F., Veeramani, S., Kumar, S., Batra, S. K., Tu, Y., and Lin, M. F. (2010). Human prostatic acid phosphatase, an authentic tyrosine phosphatase, dephosphorylates ErbB-2 and regulates prostate cancer cell growth. *J Biol Chem* *285*, 23598-23606.
- Clementi, E., Riccio, M., Sciorati, C., Nistico, G., and Meldolesi, J. (1996). The type 2 ryanodine receptor of neurosecretory PC12 cells is activated by cyclic ADP-ribose. Role of the nitric oxide/cGMP pathway. *J Biol Chem* *271*, 17739-17745.
- Coetzee, W. A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M. S., Ozaita, A., Pountney, D., *et al.* (1999). Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann N Y Acad Sci* *868*, 233-285.
- Coiret, G., Borowiec, A. S., Mariot, P., Ouadid-Ahidouch, H., and Matifat, F. (2007). The antiestrogen tamoxifen activates BK channels and stimulates proliferation of MCF-7 breast cancer cells. *Mol Pharmacol* *71*, 843-851.
- Colbran, R. J. (2004). Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* *378*, 1-16.
- Cole, R. L., Lechner, S. M., Williams, M. E., Prodanovich, P., Bleicher, L., Varney, M. A., and Gu, G. (2005). Differential distribution of voltage-gated calcium channel alpha-2 delta (alpha2delta) subunit mRNA-containing cells in the rat central nervous system and the dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* *491*, 246-269.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., and Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* *65*, 10946-10951.
- Colloca, G., and Venturino, A. (2011). The evolving role of familial history for prostate cancer. *Acta Oncol* *50*, 14-24.
- Cornet, V., Bichet, D., Sandoz, G., Marty, I., Brocard, J., Bourinet, E., Mori, Y., Villaz, M., and De Waard, M. (2002). Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci* *16*, 883-895.
- Cove-Smith, A., Mulgrew, C. J., Rudyk, O., Dutt, N., McLatchie, L. M., Shattock, M. J., and Hendry, B. M. (2013). Anti-proliferative actions of T-type calcium channel inhibition in Thy1 nephritis. *Am J Pathol* *183*, 391-401.

- Cox, M. E., Deeble, P. D., Bissonette, E. A., and Parsons, S. J. (2000). Activated 3',5'-cyclic AMP-dependent protein kinase is sufficient to induce neuroendocrine-like differentiation of the LNCaP prostate tumor cell line. *J Biol Chem* 275, 13812-13818.
- Cox, M. E., Deeble, P. D., Lakhani, S., and Parsons, S. J. (1999). Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer Res* 59, 3821-3830.
- Crabtree, G. R. (2001). Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *J Biol Chem* 276, 2313-2316.
- Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M., and Perez-Reyes, E. (1998). Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83, 103-109.
- Crociani, O., Guasti, L., Balzi, M., Becchetti, A., Wanke, E., Olivotto, M., Wymore, R. S., and Arcangeli, A. (2003). Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells. *J Biol Chem* 278, 2947-2955.
- Crouzet, S., Murat, F. J., Pasticier, G., Cassier, P., Chapelon, J. Y., and Gelet, A. (2010). High intensity focused ultrasound (HIFU) for prostate cancer: current clinical status, outcomes and future perspectives. *Int J Hyperthermia* 26, 796-803.
- Cruse, G., Singh, S. R., Duffy, S. M., Doe, C., Saunders, R., Brightling, C. E., and Bradding, P. (2011). Functional KCa3.1 K⁺ channels are required for human fibrocyte migration. *J Allergy Clin Immunol* 128, 1303-1309 e1302.
- Cueni, L., Canepari, M., Lujan, R., Emmenegger, Y., Watanabe, M., Bond, C. T., Franken, P., Adelman, J. P., and Luthi, A. (2008). T-type Ca²⁺ channels, SK2 channels and SERCAs gate sleep-related oscillations in thalamic dendrites. *Nat Neurosci* 11, 683-692.
- Culig, Z., Hobisch, A., Cronauer, M. V., Radmayr, C., Trapman, J., Hittmair, A., Bartsch, G., and Klocker, H. (1994). Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res* 54, 5474-5478.
- Curtis, B. M., and Catterall, W. A. (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23, 2113-2118.
- D'Antonio, K. B., Toubaji, A., Albadine, R., Mondul, A. M., Platz, E. A., Netto, G. J., and Getzenberg, R. H. (2010). Extracellular matrix associated protein CYR61 is linked to prostate cancer development. *J Urol* 183, 1604-1610.
- da Costa Prando, E., Cavalli, L. R., and Rainho, C. A. (2011). Evidence of epigenetic regulation of the tumor suppressor gene cluster flanking RASSF1 in breast cancer cell lines. *Epigenetics* 6, 1413-1424.
- Danila, D. C., Fleisher, M., and Scher, H. I. (2011). Circulating tumor cells as biomarkers in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 17, 3903-3912.
- Danila, D. C., Heller, G., Gignac, G. A., Gonzalez-Espinoza, R., Anand, A., Tanaka, E., Lilja, H., Schwartz, L., Larson, S., Fleisher, M., and Scher, H. I. (2007). Circulating tumor cell number and prognosis in progressive castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13, 7053-7058.
- Das, A., Pushparaj, C., Bahi, N., Sorolla, A., Herreros, J., Pamplona, R., Vilella, R., Matias-Guiu, X., Marti, R. M., and Canti, C. (2012). Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 25, 200-212.

- Davies, A., Douglas, L., Hendrich, J., Wratten, J., Tran Van Minh, A., Foucault, I., Koch, D., Pratt, W. S., Saibil, H. R., and Dolphin, A. C. (2006). The calcium channel alpha2delta-2 subunit partitions with CaV2.1 into lipid rafts in cerebellum: implications for localization and function. *J Neurosci* 26, 8748-8757.
- Davies, A., Kadurin, I., Alvarez-Laviada, A., Douglas, L., Nieto-Rostro, M., Bauer, C. S., Pratt, W. S., and Dolphin, A. C. (2010). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1654-1659.
- Day, M. L., Winston, N., McConnell, J. L., Cook, D., and Johnson, M. H. (2001). tiK+ toK+: an embryonic clock? *Reprod Fertil Dev* 13, 69-79.
- Day, R., and Salzet, M. (2002). The neuroendocrine phenotype, cellular plasticity, and the search for genetic switches: redefining the diffuse neuroendocrine system. *Neuro Endocrinol Lett* 23, 447-451.
- de Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., Doyle, G. V., Terstappen, L. W., Pienta, K. J., and Raghavan, D. (2008). Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6302-6309.
- De Jongh, K. S., Warner, C., and Catterall, W. A. (1990). Subunits of purified calcium channels. Alpha 2 and delta are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 265, 14738-14741.
- De Koninck, P., and Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science* 279, 227-230.
- De Marzo, A. M., Meeker, A. K., Epstein, J. I., and Coffey, D. S. (1998). Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol* 153, 911-919.
- De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., and Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 256-269.
- De Nunzio, C., Aronson, W., Freedland, S. J., Giovannucci, E., and Parsons, J. K. (2012). The correlation between metabolic syndrome and prostatic diseases. *Eur Urol* 61, 560-570.
- De Waard, M., Pragnell, M., and Campbell, K. P. (1994). Ca²⁺ channel regulation by a conserved beta subunit domain. *Neuron* 13, 495-503.
- Deeble, P. D., Murphy, D. J., Parsons, S. J., and Cox, M. E. (2001). Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Mol Cell Biol* 21, 8471-8482.
- DePuy, S. D., Yao, J., Hu, C., McIntire, W., Bidaud, I., Lory, P., Rastinejad, F., Gonzalez, C., Garrison, J. C., and Barrett, P. Q. (2006). The molecular basis for T-type Ca²⁺ channel inhibition by G protein beta2gamma2 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14590-14595.
- Diaz-Lezama, N., Hernandez-Elvira, M., Sandoval, A., Monroy, A., Felix, R., and Monjaraz, E. (2010). Ghrelin inhibits proliferation and increases T-type Ca²⁺ channel expression in PC-3 human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 403, 24-29.
- Diaz, E. (2010). Regulation of AMPA receptors by transmembrane accessory proteins. *Eur J Neurosci* 32, 261-268.

- Ding, X., He, Z., Zhou, K., Cheng, J., Yao, H., Lu, D., Cai, R., Jin, Y., Dong, B., Xu, Y., and Wang, Y. (2010). Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. *J Natl Cancer Inst* *102*, 1052-1068.
- Discacciati, A., Orsini, N., and Wolk, A. (2012). Body mass index and incidence of localized and advanced prostate cancer--a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol* *23*, 1665-1671.
- Dlugosz, A. A., and Yuspa, S. H. (1993). Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J Cell Biol* *120*, 217-225.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., and Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* *386*, 855-858.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K., and Lewis, R. S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* *392*, 933-936.
- Dolphin, A. C. (2006). A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* *147 Suppl 1*, S56-62.
- Dolphin, A. C. (2012). Calcium channel auxiliary alpha2delta and beta subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* *13*, 542-555.
- Dolphin, A. C. (2013). The alpha2delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* *1828*, 1541-1549.
- Dolphin, A. C., Wyatt, C. N., Richards, J., Beattie, R. E., Craig, P., Lee, J. H., Cribbs, L. L., Volsen, S. G., and Perez-Reyes, E. (1999). The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G. *J Physiol* *519 Pt 1*, 35-45.
- Dubel, S. J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E., and Nargeot, J. (2004). Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem* *279*, 29263-29269.
- Dubel, S. J., Starr, T. V., Hell, J., Ahlijanian, M. K., Enyeart, J. J., Catterall, W. A., and Snutch, T. P. (1992). Molecular cloning of the alpha-1 subunit of an omega-conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5058-5062.
- Dyachok, O., Idevall-Hagren, O., Sagetorp, J., Tian, G., Wuttke, A., Arriemerlou, C., Akusjarvi, G., Gylfe, E., and Tengholm, A. (2008). Glucose-induced cyclic AMP oscillations regulate pulsatile insulin secretion. *Cell Metab* *8*, 26-37.
- Edgerton, J. R., and Reinhart, P. H. (2003). Distinct contributions of small and large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels to rat Purkinje neuron function. *J Physiol* *548*, 53-69.
- Edwards, J., and Bartlett, J. M. (2005). The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int* *95*, 1327-1335.
- Egland, K. A., Liu, X. F., Squires, S., Nagata, S., Man, Y. G., Bera, T. K., Onda, M., Vincent, J. J., Strausberg, R. L., Lee, B., and Pastan, I. (2006). High expression of a cytokeratin-associated protein in many cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 5929-5934.

- Ekhterae, D., Platoshyn, O., Krick, S., Yu, Y., McDaniel, S. S., and Yuan, J. X. (2001). Bcl-2 decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C157-165.
- Eller, P., Berjukov, S., Wanner, S., Huber, I., Hering, S., Knaus, H. G., Toth, G., Kimball, S. D., and Striessnig, J. (2000). High affinity interaction of mibefradil with voltage-gated calcium and sodium channels. *Br J Pharmacol* 130, 669-677.
- Entschladen, F., and Zanker, K. S. (2000). Locomotion of tumor cells: a molecular comparison to migrating pre- and postmitotic leukocytes. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 671-681.
- Eroglu, C., Allen, N. J., Susman, M. W., O'Rourke, N. A., Park, C. Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S. B., Annis, D. S., Huberman, A. D., *et al.* (2009). Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380-392.
- Ertel, E. A., Campbell, K. P., Harpold, M. M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T. P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., *et al.* (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.
- Etminan, M., Takkouche, B., and Caamano-Isorna, F. (2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 340-345.
- Faber, E. S. (2010). Functional interplay between NMDA receptors, SK channels and voltage-gated Ca²⁺ channels regulates synaptic excitability in the medial prefrontal cortex. *J Physiol* 588, 1281-1292.
- Faber, E. S., Delaney, A. J., and Sah, P. (2005). SK channels regulate excitatory synaptic transmission and plasticity in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* 8, 635-641.
- Faber, E. S., and Sah, P. (2003). Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* 9, 181-194.
- Fabian, A., Barok, M., Vereb, G., and Szollosi, J. (2009). Die hard: are cancer stem cells the Bruce Willises of tumor biology? *Cytometry A* 75, 67-74.
- Farini, D., Puglianiello, A., Mammi, C., Siracusa, G., and Moretti, C. (2003). Dual effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on prostate tumor LNCaP cells: short- and long-term exposure affect proliferation and neuroendocrine differentiation. *Endocrinology* 144, 1631-1643.
- Fatt, P., and Katz, B. (1953). The effect of inhibitory nerve impulses on a crustacean muscle fibre. *J Physiol* 121, 374-389.
- Felix, R., Gurnett, C. A., De Waard, M., and Campbell, K. P. (1997). Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 17, 6884-6891.
- Ferlay, J., Parkin, D. M., and Steliarova-Foucher, E. (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 46, 765-781.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer* 49, 1374-1403.

- Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S. H., Garcia, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., and Sudhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* *410*, 41-49.
- Ferron, L., Davies, A., Page, K. M., Cox, D. J., Leroy, J., Waithe, D., Butcher, A. J., Sellaturay, P., Bolsover, S., Pratt, W. S., *et al.* (2008). The stargazin-related protein gamma 7 interacts with the mRNA-binding protein heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 and regulates the stability of specific mRNAs, including CaV2.2. *J Neurosci* *28*, 10604-10617.
- Field, M. J., Cox, P. J., Stott, E., Melrose, H., Offord, J., Su, T. Z., Bramwell, S., Corradini, L., England, S., Winks, J., *et al.* (2006). Identification of the alpha2-delta-1 subunit of voltage-dependent calcium channels as a molecular target for pain mediating the analgesic actions of pregabalin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 17537-17542.
- Firlej, V., Mathieu, J. R., Gilbert, C., Lemonnier, L., Nakhle, J., Gallou-Kabani, C., Guarmit, B., Morin, A., Prevarskaya, N., Delongchamps, N. B., and Cabon, F. (2011). Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res* *71*, 7649-7658.
- Fiske, J. L., Fomin, V. P., Brown, M. L., Duncan, R. L., and Sikes, R. A. (2006). Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer Metastasis Rev* *25*, 493-500.
- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V., and Bonkhoff, H. (2003). Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* *22*, 7858-7861.
- Fleshner, N. E., and Lawrentschuk, N. (2009). Risk of developing prostate cancer in the future: overview of prognostic biomarkers. *Urology* *73*, S21-27.
- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphael, M., Vandenberghe, M., Abeele, F. V., Roudbaraki, M., Lepage, G., Mauroy, B., Romanin, C., *et al.* (2010). Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* *1*, e75.
- Fowler, J. E., Jr., Bigler, S. A., Kilambi, N. K., and Land, S. A. (1999). Relationships between prostate-specific antigen and prostate volume in black and white men with benign prostate biopsies. *Urology* *53*, 1175-1178.
- Fox, A. P., Nowycky, M. C., and Tsien, R. W. (1987). Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J Physiol* *394*, 149-172.
- Frank, N. Y., Schatton, T., and Frank, M. H. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* *120*, 41-50.
- Fujimoto, N., Mizokami, A., Harada, S., and Matsumoto, T. (2001). Different expression of androgen receptor coactivators in human prostate. *Urology* *58*, 289-294.
- Fujita, T., Kobayashi, S., and Yui, R. (1980). Paraneuron concept and its current implications. *Adv Biochem Psychopharmacol* *25*, 321-325.
- Gackiere, F., Bidaux, G., Delcourt, P., Van Coppenolle, F., Katsogiannou, M., Dewailly, E., Bavencoffe, A., Van Chuoi-Mariot, M. T., Mauroy, B., Prevarskaya, N., and Mariot, P. (2008). CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* *283*, 10162-10173.
- Gackière, F., Warnier, M., Katsogiannou, M., Derouiche, S., Delcourt, P., Dewailly, E., Slomianny, C., Humez, S., Prevarskaya, N., Roudbaraki, R., and Mariot, P. (2013). Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-

dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology Open* 2, 941-951.

Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A., Saad, M., Forgacs, E., Latif, F., Wei, M. H., Lerman, M., Lee, J. H., Perez-Reyes, E., *et al.* (2000). Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *J Biol Chem* 275, 12237-12242.

Gardos, G. (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 30, 653-654.

Gee, N. S., Brown, J. P., Dissanayake, V. U., Offord, J., Thurlow, R., and Woodruff, G. N. (1996). The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the alpha2delta subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 271, 5768-5776.

Genazzani, A. A., Carafoli, E., and Guerini, D. (1999). Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5797-5801.

Gennigens, C., Menetrier-Caux, C., and Droz, J. P. (2006). Insulin-Like Growth Factor (IGF) family and prostate cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 58, 124-145.

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

Ghatta, S., Nimmagadda, D., Xu, X., and O'Rourke, S. T. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther* 110, 103-116.

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, 4611-4616.

Glina, S., Rivero, M. A., Morales, A., and Morgentaler, A. (2010). Studies on prostatic cancer I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate by Charles Huggins and Clarence V. Hodges. *J Sex Med* 7, 640-644.

Gluck, G., Mihai, M., Stoica, R., Andrei, R., and Sinescu, I. (2012). Prostate cancer with neuroendocrine differentiation--case report. *J Med Life* 5, 101-104.

Goldberg, J. A., and Wilson, C. J. (2005). Control of spontaneous firing patterns by the selective coupling of calcium currents to calcium-activated potassium currents in striatal cholinergic interneurons. *J Neurosci* 25, 10230-10238.

Goldfarb, D. A., Stein, B. S., Shamszadeh, M., and Petersen, R. O. (1986). Age-related changes in tissue levels of prostatic acid phosphatase and prostate specific antigen. *J Urol* 136, 1266-1269.

Goldstein, S. A., Bayliss, D. A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L. D., and Rajan, S. (2005). International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 527-540.

Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., and Dolmetsch, R. (2006). The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* 127, 591-606.

- Gomez-Villafuertes, R., Torres, B., Barrio, J., Savignac, M., Gabellini, N., Rizzato, F., Pintado, B., Gutierrez-Adan, A., Mellstrom, B., Carafoli, E., and Naranjo, J. R. (2005). Downstream regulatory element antagonist modulator regulates Ca²⁺ homeostasis and viability in cerebellar neurons. *J Neurosci* 25, 10822-10830.
- Gomora, J. C., Enyeart, J. A., and Enyeart, J. J. (1999). Mibefradil potently blocks ATP-activated K(+) channels in adrenal cells. *Mol Pharmacol* 56, 1192-1197.
- Gong, H. C., Hang, J., Kohler, W., Li, L., and Su, T. Z. (2001). Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel alpha2delta subunit subtypes. *J Membr Biol* 184, 35-43.
- Graddis, T. J., McMahan, C. J., Tamman, J., Page, K. J., and Trager, J. B. (2011). Prostatic acid phosphatase expression in human tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 4, 295-306.
- Greenberg, M. E., Ziff, E. B., and Greene, L. A. (1986). Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science* 234, 80-83.
- Greene, K. L., Albertsen, P. C., Babaian, R. J., Carter, H. B., Gann, P. H., Han, M., Kuban, D. A., Sartor, A. O., Stanford, J. L., Zietman, A., and Carroll, P. (2009). Prostate specific antigen best practice statement: 2009 update. *J Urol* 182, 2232-2241.
- Gregg, R. G., Messing, A., Strube, C., Beurg, M., Moss, R., Behan, M., Sukhareva, M., Haynes, S., Powell, J. A., Coronado, R., and Powers, P. A. (1996). Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13961-13966.
- Gregory, C. W., He, B., Johnson, R. T., Ford, O. H., Mohler, J. L., French, F. S., and Wilson, E. M. (2001). A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61, 4315-4319.
- Grobholz, R., Bohrer, M. H., Siegsmond, M., Junemann, K. P., Bleyl, U., and Woenckhaus, M. (2000). Correlation between neovascularisation and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Pathol Res Pract* 196, 277-284.
- Grunnet, M., and Kaufmann, W. A. (2004). Coassembly of big conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in rat brain. *J Biol Chem* 279, 36445-36453.
- Grunwald, R., and Meissner, G. (1995). Luminal sites and C terminus accessibility of the skeletal muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *J Biol Chem* 270, 11338-11347.
- Guo, W., Kamiya, K., Kodama, I., and Toyama, J. (1998). Cell cycle-related changes in the voltage-gated Ca²⁺ currents in cultured newborn rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30, 1095-1103.
- Gupta, A., Lotan, Y., Ashfaq, R., Roehrborn, C. G., Raj, G. V., Aragaki, C. C., Montorsi, F., and Shariat, S. F. (2009). Predictive value of the differential expression of the urokinase plasminogen activation axis in radical prostatectomy patients. *Eur Urol* 55, 1124-1133.
- Gurnett, C. A., Felix, R., and Campbell, K. P. (1997). Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha2delta and alpha1 subunits. *J Biol Chem* 272, 18508-18512.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Robertson, G. A., Rudy, B., Sanguinetti, M. C., Stuhmer, W., and Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 473-508.

- Halatsch, M. E., Low, S., Mursch, K., Hielscher, T., Schmidt, U., Unterberg, A., Vougioukas, V. I., and Feuerhake, F. (2009). Candidate genes for sensitivity and resistance of human glioblastoma multiforme cell lines to erlotinib. Laboratory investigation. *J Neurosurg* *111*, 211-218.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* *391*, 85-100.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanke, S., Bugert, P., Chudek, J., and Kovacs, G. (2001). Cloning a calcium channel alpha2delta-3 subunit gene from a putative tumor suppressor gene region at chromosome 3p21.1 in conventional renal cell carcinoma. *Gene* *264*, 69-75.
- Hanley, P. J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S. H., Dalpke, A. H., Sus, R., Heeg, K. M., Preisig-Muller, R., and Daut, J. (2004). Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9479-9484.
- Hansen, J. P., Chen, R. S., Larsen, J. K., Chu, P. J., Janes, D. M., Weis, K. E., and Best, P. M. (2004). Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *J Mol Cell Cardiol* *37*, 1147-1158.
- 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*, 261-267.
- 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*, 260-265.
- HAS (2012). Cancer de la prostate : identification des facteurs de risque et pertinence d'un dépistage par dosage de l'antigène spécifique prostatique (PSA) de populations d'hommes à haut risque ? . Service documentation http://www.has-santefr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-04/rapport_orientation_-_cancer_de_la_prostate_2012-04-03_16-39-9_898pdf
- Havt, A., Schally, A. V., Halmos, G., Varga, J. L., Toller, G. L., Horvath, J. E., Szepeshazi, K., Koster, F., Kovitz, K., Groot, K., *et al.* (2005). The expression of the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its splice variants in normal and neoplastic human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 17424-17429.
- Hayashi, N., Sugimura, Y., Kawamura, J., Donjacour, A. A., and Cunha, G. R. (1991). Morphological and functional heterogeneity in the rat prostatic gland. *Biol Reprod* *45*, 308-321.
- Henderson, K., Stella, S. L., Kobylewski, S., and Eckhart, C. D. (2009). Receptor activated Ca(2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells. *PLoS One* *4*, e6009.
- Hendrich, J., Van Minh, A. T., Hebllich, F., Nieto-Rostro, M., Watschinger, K., Striessnig, J., Wratten, J., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2008). Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3628-3633.
- Hildebrand, M. E., David, L. S., Hamid, J., Mulatz, K., Garcia, E., Zamponi, G. W., and Snutch, T. P. (2007). Selective inhibition of Cav3.3 T-type calcium channels by Galphaq/11-coupled muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* *282*, 21043-21055.

- 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, 586-592; discussion 592.
- Hirooka, K., Bertolesi, G. E., Kelly, M. E., Denovan-Wright, E. M., Sun, X., Hamid, J., Zamponi, G. W., Juhasz, A. E., Haynes, L. W., and Barnes, S. (2002). T-Type calcium channel $\alpha 1G$ and $\alpha 1H$ subunits in human retinoblastoma cells and their loss after differentiation. *J Neurophysiol* 88, 196-205.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev* 17, 2205-2232.
- Hogg, P. J. (2003). Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* 28, 210-214.
- Holmgaard, K., Jensen, K., and Lambert, J. D. (2009). Imaging of Ca^{2+} responses mediated by presynaptic L-type channels on GABAergic boutons of cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1249, 79-90.
- Hoppa, M. B., Lana, B., Margas, W., Dolphin, A. C., and Ryan, T. A. (2012). $\alpha 2\delta$ expression sets presynaptic calcium channel abundance and release probability. *Nature* 486, 122-125.
- Hu, X. Q., and Zhang, L. (2012). Function and regulation of large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel in vascular smooth muscle cells. *Drug Discov Today* 17, 974-987.
- Huang, C. H., Chen, Y. C., and Chen, C. C. (2013). Physical interaction between calcineurin and Cav3.2 T-type Ca^{2+} channel modulates their functions. *FEBS Lett* 587, 1723-1730.
- Huang, J., Yao, J. L., di Sant'Agnes, P. A., Yang, Q., Bourne, P. A., and Na, Y. (2006). Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *Prostate* 66, 1399-1406.
- Huang, J. B., Kindzelskii, A. L., Clark, A. J., and Petty, H. R. (2004). Identification of channels promoting calcium spikes and waves in HT1080 tumor cells: their apparent roles in cell motility and invasion. *Cancer Res* 64, 2482-2489.
- Huc, S., Monteil, A., Bidaud, I., Barbara, G., Chemin, J., and Lory, P. (2009). Regulation of T-type calcium channels: signalling pathways and functional implications. *Biochim Biophys Acta* 1793, 947-952.
- 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, 948-951.
- Hughes, K., Edin, S., Antonsson, A., and Grundstrom, T. (2001). Calmodulin-dependent kinase II mediates T cell receptor/CD3- and phorbol ester-induced activation of IkappaB kinase. *J Biol Chem* 276, 36008-36013.
- Hurt, E. M., Kawasaki, B. T., Klarmann, G. J., Thomas, S. B., and Farrar, W. L. (2008). CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* 98, 756-765.
- Hussain, A. R., Ahmed, S. O., Ahmed, M., Khan, O. S., Al Abdulmohsen, S., Plataniias, L. C., Al-Kuraya, K. S., and Uddin, S. (2012). Cross-talk between NFkB and the PI3-kinase/AKT pathway can be targeted in primary effusion lymphoma (PEL) cell lines for efficient apoptosis. *PLoS One* 7, e39945.

- Igawa, T., Lin, F. F., Rao, P., and Lin, M. F. (2003). Suppression of LNCaP prostate cancer xenograft tumors by a prostate-specific protein tyrosine phosphatase, prostatic acid phosphatase. *Prostate* 55, 247-258.
- Ikura, M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* 21, 14-17.
- Ikura, M., Osawa, M., and Ames, J. B. (2002). The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* 24, 625-636.
- Ishibe, M., Rosier, R. N., and Puzas, J. E. (1991). Human prostatic acid phosphatase directly stimulates collagen synthesis and alkaline phosphatase content of isolated bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 73, 785-792.
- Ishii, K., Imamura, T., Iguchi, K., Arase, S., Yoshio, Y., Arima, K., Hirano, K., and Sugimura, Y. (2009). Evidence that androgen-independent stromal growth factor signals promote androgen-insensitive prostate cancer cell growth in vivo. *Endocr Relat Cancer* 16, 415-428.
- Jagannathan, S., Punt, E. L., Gu, Y., Arnoult, C., Sakkas, D., Barratt, C. L., and Publicover, S. J. (2002). Identification and localization of T-type voltage-operated calcium channel subunits in human male germ cells. Expression of multiple isoforms. *J Biol Chem* 277, 8449-8456.
- Jangsangthong, W., Kuzmenkina, E., Bohnke, A. K., and Herzig, S. (2011). Single-channel monitoring of reversible L-type Ca(2+) channel Ca(V)alpha(1)-Ca(V)beta subunit interaction. *Biophys J* 101, 2661-2670.
- Jay, S. D., Sharp, A. H., Kahl, S. D., Vedvick, T. S., Harpold, M. M., and Campbell, K. P. (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem* 266, 3287-3293.
- Jesik, C. J., Holland, J. M., and Lee, C. (1982). An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate* 3, 81-97.
- Jiang, Z., Fanger, G. R., Woda, B. A., Banner, B. F., Algate, P., Dresser, K., Xu, J., and Chu, P. G. (2003). Expression of alpha-methylacyl-CoA racemase (P504s) in various malignant neoplasms and normal tissues: a study of 761 cases. *Hum Pathol* 34, 792-796.
- Jones, S. E., and Palmer, T. M. (2012). Protein kinase A-mediated phosphorylation of RhoA on serine 188 triggers the rapid induction of a neuroendocrine-like phenotype in prostate cancer epithelial cells. *Cell Signal* 24, 1504-1514.
- Kahl, C. R., and Means, A. R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24, 719-736.
- Kajiwara, T., Takeuchi, T., Ueki, T., Moriyama, N., Ueki, K., Kakizoe, T., and Kawabe, K. (1999). Effect of Bcl-2 overexpression in human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Urol* 6, 520-525.
- Kang, M. G., and Campbell, K. P. (2003). Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 278, 21315-21318.
- Kang, M. G., Chen, C. C., Felix, R., Letts, V. A., Frankel, W. N., Mori, Y., and Campbell, K. P. (2001). Biochemical and biophysical evidence for gamma 2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca2+ channels. *J Biol Chem* 276, 32917-32924.
- Kang, S. S., Han, K. S., Ku, B. M., Lee, Y. K., Hong, J., Shin, H. Y., Almonte, A. G., Woo, D. H., Brat, D. J., Hwang, E. M., *et al.* (2010). Caffeine-mediated inhibition of calcium

release channel inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtype 3 blocks glioblastoma invasion and extends survival. *Cancer Res* 70, 1173-1183.

Karppi, J., Kurl, S., Laukkanen, J. A., and Kauhanen, J. (2012). Serum beta-carotene in relation to risk of prostate cancer: the Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor study. *Nutr Cancer* 64, 361-367.

Kawai, N., and Aumuller, G. (1988). Immuno-electron microscopical localisation of alpha-actinin and actin in microvilli of prostatic epithelial cells. *J Anat* 161, 125-132.

Keir, S. T., Friedman, H. S., Reardon, D. A., Bigner, D. D., and Gray, L. A. (2013). Mibefradil, a novel therapy for glioblastoma multiforme: cell cycle synchronization and interlaced therapy in a murine model. *J Neurooncol* 111, 97-102.

Khan, M. T., Wagner, L., 2nd, Yule, D. I., Bhanumathy, C., and Joseph, S. K. (2006). Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 281, 3731-3737.

Khanna, R., Chang, M. C., Joiner, W. J., Kaczmarek, L. K., and Schlichter, L. C. (1999). hSK4/hIK1, a calmodulin-binding KCa channel in human T lymphocytes. Roles in proliferation and volume regulation. *J Biol Chem* 274, 14838-14849.

Kirschenbaum, A., Liu, X. H., Yao, S., Leiter, A., and Levine, A. C. (2011). Prostatic acid phosphatase is expressed in human prostate cancer bone metastases and promotes osteoblast differentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1237, 64-70.

Kiviluoto, S., Decuyper, J. P., De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J. B., and Bultynck, G. (2011). STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle* 1, 16.

Kohler, M., Hirschberg, B., Bond, C. T., Kinzie, J. M., Marrion, N. V., Maylie, J., and Adelman, J. P. (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 273, 1709-1714.

Komiya, A., Suzuki, H., Imamoto, T., Kamiya, N., Nihei, N., Naya, Y., Ichikawa, T., and Fuse, H. (2009). Neuroendocrine differentiation in the progression of prostate cancer. *Int J Urol* 16, 37-44.

Kordel, S. F. a. J. (1994). Calcium in Biological Systems Bioinorganic Chemistry *Ed Mill Valley*.

Kotturi, M. F., and Jefferies, W. A. (2005). Molecular characterization of L-type calcium channel splice variants expressed in human T lymphocytes. *Mol Immunol* 42, 1461-1474.

Kovac, J. R., Chrones, T., and Sims, S. M. (2008). Temporal and spatial dynamics underlying capacitative calcium entry in human colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G88-98.

Krongrad, A., Lai, H., and Lai, S. (1997). Survival after radical prostatectomy. *JAMA* 278, 44-46.

Kubo, Y., Adelman, J. P., Clapham, D. E., Jan, L. Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C. G., Seino, S., and Vandenberg, C. A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol Rev* 57, 509-526.

Kuga, T., Kobayashi, S., Hirakawa, Y., Kanaide, H., and Takeshita, A. (1996). Cell cycle--dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res* 79, 14-19.

- Kunzelmann, K. (2005). Ion channels and cancer. *J Membr Biol* 205, 159-173.
- Kurahashi, N., Sasazuki, S., Iwasaki, M., Inoue, M., and Tsugane, S. (2008). Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study. *Am J Epidemiol* 167, 71-77.
- Kurhanewicz, J., Vigneron, D. B., Nelson, S. J., Hricak, H., MacDonald, J. M., Konety, B., and Narayan, P. (1995). Citrate as an in vivo marker to discriminate prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and normal prostate peripheral zone: detection via localized proton spectroscopy. *Urology* 45, 459-466.
- Kurshan, P. T., Oztan, A., and Schwarz, T. L. (2009). Presynaptic alpha2delta-3 is required for synaptic morphogenesis independent of its Ca²⁺-channel functions. *Nat Neurosci* 12, 1415-1423.
- Lacinova, L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1, 1-78.
- Lallet-Daher, H., Roudbaraki, M., Bavencoffe, A., Mariot, P., Gackiere, F., Bidaux, G., Urbain, R., Gosset, P., Delcourt, P., Fleurisse, L., *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, 1792-1806.
- Lamont, K. R., and Tindall, D. J. (2010). Androgen regulation of gene expression. *Adv Cancer Res* 107, 137-162.
- Lamy, C., Goodchild, S. J., Weatherall, K. L., Jane, D. E., Liegeois, J. F., Seutin, V., and Marrion, N. V. (2010). Allosteric block of KCa2 channels by apamin. *J Biol Chem* 285, 27067-27077.
- Lang, F., Gulbins, E., Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Huber, S. M., Duranton, C., Lang, K. S., Lang, P. A., and Wieder, T. (2004). Cell volume and the regulation of apoptotic cell death. *J Mol Recognit* 17, 473-480.
- Lanner, J. T. (2012). Ryanodine receptor physiology and its role in disease. *Adv Exp Med Biol* 740, 217-234.
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., and Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003996.
- Lansley, A. B., and Sanderson, M. J. (1999). Regulation of airway ciliary activity by Ca²⁺: simultaneous measurement of beat frequency and intracellular Ca²⁺. *Biophys J* 77, 629-638.
- Lansu, K., and Gentile, S. (2013). Potassium channel activation inhibits proliferation of breast cancer cells by activating a senescence program. *Cell Death Dis* 4, e652.
- Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., and Alvarez, O. (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol* 51, 385-399.
- Lawson, D. A., Xin, L., Lukacs, R. U., Cheng, D., and Witte, O. N. (2007). Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 181-186.
- Ledo, F., Kremer, L., Mellstrom, B., and Naranjo, J. R. (2002). Ca²⁺-dependent block of CREB-CBP transcription by repressor DREAM. *EMBO J* 21, 4583-4592.
- Lee, J. H., Daud, A. N., Cribbs, L. L., Lacerda, A. E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., and Perez-Reyes, E. (1999a). Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19, 1912-1921.

- Lee, J. H., Gomora, J. C., Cribbs, L. L., and Perez-Reyes, E. (1999b). Nickel block of three cloned T-type calcium channels: low concentrations selectively block α_1H . *Biophys J* 77, 3034-3042.
- 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, 7380-7385.
- Lerman, M. I., and Minna, J. D. (2000). The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* 60, 6116-6133.
- Leroy, J., Richards, M. W., Butcher, A. J., Nieto-Rostro, M., Pratt, W. S., Davies, A., and Dolphin, A. C. (2005). Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for β_1 but not for palmitoylated β_2 , implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties. *J Neurosci* 25, 6984-6996.
- Leuranguer, V., Monteil, A., Bourinet, E., Dayanithi, G., and Nargeot, J. (2000). T-type calcium currents in rat cardiomyocytes during postnatal development: contribution to hormone secretion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2540-8.
- Levine, L., Lucci, J. A., 3rd, Pazdrak, B., Cheng, J. Z., Guo, Y. S., Townsend, C. M., Jr., and Hellmich, M. R. (2003). Bombesin stimulates nuclear factor kappa B activation and expression of proangiogenic factors in prostate cancer cells. *Cancer Res* 63, 3495-3502.
- Li, W., Zhang, S. L., Wang, N., Zhang, B. B., and Li, M. (2011). Blockade of T-type Ca^{2+} channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest* 29, 339-346.
- Li, Y., Chen, H. Q., Chen, M. F., Liu, H. Z., Dai, Y. Q., Lv, H., Bing Zu, X., and Qi, L. (2009). Neuroendocrine differentiation is involved in chemoresistance induced by EGF in prostate cancer cells. *Life Sci* 84, 882-887.
- Ligeza, J., and Klein, A. (2011). Growth factor/growth factor receptor loops in autocrine growth regulation of human prostate cancer DU145 cells. *Acta Biochim Pol* 58, 391-396.
- Lilja, H. (1985). A kallikrein-like serine protease in prostatic fluid cleaves the predominant seminal vesicle protein. *J Clin Invest* 76, 1899-1903.
- Lin, C., Wang, L., Wang, H., Yang, L., Guo, H., and Wang, X. (2013). Tanshinone IIA inhibits breast cancer stem cells growth in vitro and in vivo through attenuation of IL-6/STAT3/NF- κ B signaling pathways. *J Cell Biochem* 114, 2061-2070.
- Lin, M. F., Lee, M. S., Zhou, X. W., Andressen, J. C., Meng, T. C., Johansson, S. L., West, W. W., Taylor, R. J., Anderson, J. R., and Lin, F. F. (2001). Decreased expression of cellular prostatic acid phosphatase increases tumorigenicity of human prostate cancer cells. *J Urol* 166, 1943-1950.
- Lin, Z., Witschas, K., Garcia, T., Chen, R. S., Hansen, J. P., Sellers, Z. M., Kuzmenkina, E., Herzig, S., and Best, P. M. (2008). A critical GxxxA motif in the γ_6 calcium channel subunit mediates its inhibitory effect on Cav3.1 calcium current. *J Physiol* 586, 5349-5366.
- 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 Ca^{2+} sensor essential for Ca^{2+} -store-depletion-triggered Ca^{2+} influx. *Curr Biol* 15, 1235-1241.
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M. J., and Bootman, M. D. (1997). Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *EMBO J* 16, 7166-7173.

- Liu, X. F., Xiang, L., Zhang, Y., Becker, K. G., Bera, T. K., and Pastan, I. (2012). CAPC negatively regulates NF-kappaB activation and suppresses tumor growth and metastasis. *Oncogene* *31*, 1673-1682.
- Llinas, R., Sugimori, M., Lin, J. W., and Cherksey, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 1689-1693.
- Llobet, A., Cooke, A., and Lagnado, L. (2003). Exocytosis at the ribbon synapse of retinal bipolar cells studied in patches of presynaptic membrane. *J Neurosci* *23*, 2706-2714.
- Lorenzo, I. M., Liedtke, W., Sanderson, M. J., and Valverde, M. A. (2008). TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 12611-12616.
- Lory, P., Bidaud, I., and Chemin, J. (2006). T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* *40*, 135-146.
- Lu, F., Chen, H., Zhou, C., Liu, S., Guo, M., Chen, P., Zhuang, H., Xie, D., and Wu, S. (2008). T-type Ca²⁺ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation. *Cell Calcium* *43*, 49-58.
- Lynch, M. J., and Nicholson, J. K. (1997). Proton MRS of human prostatic fluid: correlations between citrate, spermine, and myo-inositol levels and changes with disease. *Prostate* *30*, 248-255.
- MacInnis, R. J., and English, D. R. (2006). Body size and composition and prostate cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes Control* *17*, 989-1003.
- Maiti, K., Oh, D. Y., Moon, J. S., Acharjee, S., Li, J. H., Bai, D. G., Park, H. S., Lee, K., Lee, Y. C., Jung, N. C., *et al.* (2005). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I and GnRH-II on prostate cancer cell signaling and death. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 4287-4298.
- Maitland, N. J., Frame, F. M., Polson, E. S., Lewis, J. L., and Collins, A. T. (2011). Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? *Horm Cancer* *2*, 47-61.
- Marais, E., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2001). Calcium channel alpha(2)delta subunits-structure and Gabapentin binding. *Mol Pharmacol* *59*, 1243-1248.
- Marcantoni, A., Baldelli, P., Hernandez-Guijo, J. M., Comunanza, V., Carabelli, V., and Carbone, E. (2007). L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium* *42*, 397-408.
- Marchiani, S., Tamburrino, L., Nesi, G., Paglierani, M., Gelmini, S., Orlando, C., Maggi, M., Forti, G., and Baldi, E. (2010). Androgen-responsive and -unresponsive prostate cancer cell lines respond differently to stimuli inducing neuroendocrine differentiation. *Int J Androl* *33*, 784-793.
- Marcu, M., Radu, E., and Sajin, M. (2010). Neuroendocrine transdifferentiation of prostate carcinoma cells and its prognostic significance. *Rom J Morphol Embryol* *51*, 7-12.
- 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*, 205-214.
- Mariot, P., Vanoverberghe, K., Lalevee, N., Rossier, M. F., and Prevarskaya, N. (2002). Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *J Biol Chem* *277*, 10824-10833.

- Marrion, N. V., and Tavalin, S. J. (1998). Selective activation of Ca²⁺-activated K⁺ channels by co-localized Ca²⁺ channels in hippocampal neurons. *Nature* 395, 900-905.
- Martin, A., and Gaya, A. (2010). Stereotactic body radiotherapy: a review. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22, 157-172.
- Martinez-Martinez, S., and Redondo, J. M. (2004). Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem* 11, 997-1007.
- Matos, A. R., Coutinho-Camillo, C. M., Thuler, L. C., Fonseca, F. P., Soares, F. A., Silva, E. A., and Gimba, E. R. (2013). Expression analysis of thrombospondin 2 in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Exp Mol Pathol* 94, 438-444.
- McEnery, M. W., Haase, H., Vance, C. L., Dubel, S. J., Morano, I., Copeland, T. D., and Choi, Y. (1997). Beta1B subunit of voltage-dependent Ca²⁺ channels is predominant isoform expressed in human neuroblastoma cell line IMR32. *FEBS Lett* 420, 74-78.
- McManus, O. B. (1991). Calcium-activated potassium channels: regulation by calcium. *J Bioenerg Biomembr* 23, 537-560.
- McNeal, J. E. (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. *Am J Clin Pathol* 49, 347-357.
- McNeal, J. E., Redwine, E. A., Freiha, F. S., and Stamey, T. A. (1988). Zonal distribution of prostatic adenocarcinoma. Correlation with histologic pattern and direction of spread. *Am J Surg Pathol* 12, 897-906.
- Meir, A., Bell, D. C., Stephens, G. J., Page, K. M., and Dolphin, A. C. (2000). Calcium channel beta subunit promotes voltage-dependent modulation of alpha 1 B by G beta gamma. *Biophys J* 79, 731-746.
- Meissner, G., Rios, E., Tripathy, A., and Pasek, D. A. (1997). Regulation of skeletal muscle Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) by Ca²⁺ and monovalent cations and anions. *J Biol Chem* 272, 1628-1638.
- Mellstrom, B., Savignac, M., Gomez-Villafuertes, R., and Naranjo, J. R. (2008). Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiol Rev* 88, 421-449.
- Men, X., Peng, L., Wang, H., Zhang, W., Xu, S., Fang, Q., Liu, H., Yang, W., and Lou, J. (2013). Involvement of the Ca²⁺-responsive transactivator in high glucose-induced beta-cell apoptosis. *J Endocrinol* 216, 231-243.
- Michalak, M., Robert Parker, J. M., and Opas, M. (2002). Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32, 269-278.
- Michalaki, V., Syrigos, K., Charles, P., and Waxman, J. (2004). Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *Br J Cancer* 90, 2312-2316.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S., and Numa, S. (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340, 230-233.
- Mikoshiba, K. (2007). The IP3 receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function. *Biochem Soc Symp*, 9-22.
- Mishra, S. K., and Hermsmeyer, K. (1994). Selective inhibition of T-type Ca²⁺ channels by Ro 40-5967. *Circ Res* 75, 144-148.

- Misra, U. K., Gawdi, G., and Pizzo, S. V. (2003). Induction of mitogenic signalling in the 1LN prostate cell line on exposure to submicromolar concentrations of cadmium+. *Cell Signal* *15*, 1059-1070.
- Mitra, R., Lee, J., Jo, J., Milani, M., McClintick, J. N., Edenberg, H. J., Kesler, K. A., Rieger, K. M., Badve, S., Cummings, O. W., *et al.* (2011). Prediction of postoperative recurrence-free survival in non-small cell lung cancer by using an internationally validated gene expression model. *Clin Cancer Res* *17*, 2934-2946.
- Mittman, S., Guo, J., Emerick, M. C., and Agnew, W. S. (1999). Structure and alternative splicing of the gene encoding alpha1I, a human brain T calcium channel alpha1 subunit. *Neurosci Lett* *269*, 121-124.
- Miyata, Y., and Sakai, H. (2013). Thrombospondin-1 in urological cancer: pathological role, clinical significance, and therapeutic prospects. *Int J Mol Sci* *14*, 12249-12272.
- Monet, M., Lehen'kyi, V., Gackiere, F., Firlej, V., Vandenberghe, M., Roudbaraki, M., Gkika, D., Pourtier, A., Bidaux, G., Slomianny, C., *et al.* (2010). Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* *70*, 1225-1235.
- Montague, J. A., Butler, L. M., Wu, A. H., Genkinger, J. M., Koh, W. P., Wong, A. S., Wang, R., Yuan, J. M., and Yu, M. C. (2012). Green and black tea intake in relation to prostate cancer risk among Singapore Chinese. *Cancer Causes Control* *23*, 1635-1641.
- Montell, C. (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* *2005*, re3.
- Montell, C., Birnbaumer, L., and Flockerzi, V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* *108*, 595-598.
- Mori, R., Xiong, S., Wang, Q., Tarabolous, C., Shimada, H., Panteris, E., Danenberg, K. D., Danenberg, P. V., and Pinski, J. K. (2009). Gene profiling and pathway analysis of neuroendocrine transdifferentiated prostate cancer cells. *Prostate* *69*, 12-23.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M. S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., and *et al.* (1991). Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* *350*, 398-402.
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T., and Rennert, P. (2003). NF-kappaB activation by protein kinase C isoforms and B-cell function. *EMBO Rep* *4*, 31-36.
- Muik, M., Schindl, R., Fahrner, M., and Romanin, C. (2012). Ca(2+) release-activated Ca(2+) (CRAC) current, structure, and function. *Cell Mol Life Sci* *69*, 4163-4176.
- Muller, A., Kukley, M., Uebachs, M., Beck, H., and Dietrich, D. (2007). Nanodomains of single Ca²⁺ channels contribute to action potential repolarization in cortical neurons. *J Neurosci* *27*, 483-495.
- Muniyan, S., Chaturvedi, N. K., Dwyer, J. G., Lagrange, C. A., Chaney, W. G., and Lin, M. F. (2013). Human prostatic Acid phosphatase: structure, function and regulation. *Int J Mol Sci* *14*, 10438-10464.
- Murillo, H., Huang, H., Schmidt, L. J., Smith, D. I., and Tindall, D. J. (2001). Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology* *142*, 4795-4805.
- Nakashima, J., Tachibana, M., Horiguchi, Y., Oya, M., Ohigashi, T., Asakura, H., and Murai, M. (2000). Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin Cancer Res* *6*, 2702-2706.

- Nam, R. K., Diamandis, E. P., Toi, A., Trachtenberg, J., Magklara, A., Scorilas, A., Papnastasiou, P. A., Jewett, M. A., and Narod, S. A. (2000). Serum human glandular kallikrein-2 protease levels predict the presence of prostate cancer among men with elevated prostate-specific antigen. *J Clin Oncol* 18, 1036-1042.
- Naraghi, M., and Neher, E. (1997). Linearized buffered Ca²⁺ diffusion in microdomains and its implications for calculation of [Ca²⁺] at the mouth of a calcium channel. *J Neurosci* 17, 6961-6973.
- Nebe, B., Holzhausen, C., Rychly, J., and Urbaszek, W. (2002). Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. *Cardiovasc Drugs Ther* 16, 183-193.
- Negrini, S., Prada, I., D'Alessandro, R., and Meldolesi, J. (2013). REST: an oncogene or a tumor suppressor? *Trends Cell Biol* 23, 289-295.
- Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260, 799-802.
- Newton, A. C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 270, 28495-28498.
- Ngo-Anh, T. J., Bloodgood, B. L., Lin, M., Sabatini, B. L., Maylie, J., and Adelman, J. P. (2005). SK channels and NMDA receptors form a Ca²⁺-mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat Neurosci* 8, 642-649.
- Nguyen, H. D., Allen, B. J., and Pow-Sang, J. M. (2013). Focal cryotherapy in the treatment of localized prostate cancer. *Cancer Control* 20, 177-180.
- Niidome, T., Kim, M. S., Friedrich, T., and Mori, Y. (1992). Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett* 308, 7-13.
- Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 12, 218.
- Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., and Peters, J. A. (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87, 165-217.
- Nilius, B., Prenen, J., Kamouchi, M., Viana, F., Voets, T., and Droogmans, G. (1997). Inhibition by mibefradil, a novel calcium channel antagonist, of Ca(2+)- and volume-activated Cl- channels in macrovascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 121, 547-555.
- Nogueira, L., Corradi, R., and Eastham, J. A. (2009). Prostatic specific antigen for prostate cancer detection. *Int Braz J Urol* 35, 521-529; discussion 530-522.
- Nowycky, M. C., Fox, A. P., and Tsien, R. W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440-443.
- O'Grady, S. M., and Lee, S. Y. (2005). Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1578-1594.
- Oeggerli, M., Tian, Y., Ruiz, C., Wijker, B., Sauter, G., Obermann, E., Guth, U., Zlobec, I., Sausbier, M., Kunzelmann, K., and Bubendorf, L. (2012). Role of KCNMA1 in breast cancer. *PLoS One* 7, e41664.
- Ohkubo, T., Inoue, Y., Kawarabayashi, T., and Kitamura, K. (2005). Identification and electrophysiological characteristics of isoforms of T-type calcium channel Ca(v)3.2 expressed in pregnant human uterus. *Cell Physiol Biochem* 16, 245-254.

- Ohkubo, T., and Yamazaki, J. (2012). T-type voltage-activated calcium channel Cav3.1, but not Cav3.2, is involved in the inhibition of proliferation and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Oncol* *41*, 267-275.
- Orio, P., Rojas, P., Ferreira, G., and Latorre, R. (2002). New disguises for an old channel: MaxiK channel beta-subunits. *News Physiol Sci* *17*, 156-161.
- Ouadid-Ahidouch, H., Chaussade, F., Roudbaraki, M., Slomianny, C., Dewailly, E., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2000). KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* *278*, 272-277.
- Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Ahidouch, A., Delcourt, P., and Prevarskaya, N. (2004). Cell-cycle-dependent expression of the large Ca²⁺-activated K⁺ channels in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *316*, 244-251.
- Ozu, C., Nakashima, J., Horiguchi, Y., Oya, M., Ohigashi, T., and Murai, M. (2008). Prediction of bone metastases by combination of tartrate-resistant acid phosphatase, alkaline phosphatase and prostate specific antigen in patients with prostate cancer. *Int J Urol* *15*, 419-422.
- Palczewska, M., Casafont, I., Ghimire, K., Rojas, A. M., Valencia, A., Lafarga, M., Mellstrom, B., and Naranjo, J. R. (2011). Sumoylation regulates nuclear localization of repressor DREAM. *Biochim Biophys Acta* *1813*, 1050-1058.
- Palmberg, C., Koivisto, P., Visakorpi, T., and Tammela, T. L. (1999). PSA decline is an independent prognostic marker in hormonally treated prostate cancer. *Eur Urol* *36*, 191-196.
- Palmieri, C., Rudraraju, B., Monteverde, M., Lattanzio, L., Gojis, O., Brizio, R., Garrone, O., Merlano, M., Syed, N., Lo Nigro, C., and Crook, T. (2012). Methylation of the calcium channel regulatory subunit alpha2delta-3 (CACNA2D3) predicts site-specific relapse in oestrogen receptor-positive primary breast carcinomas. *Br J Cancer* *107*, 375-381.
- Pang, C., Crump, S. M., Jin, L., Correll, R. N., Finlin, B. S., Satin, J., and Andres, D. A. (2010). Rem GTPase interacts with the proximal CaV1.2 C-terminus and modulates calcium-dependent channel inactivation. *Channels (Austin)* *4*, 192-202.
- Panner, A., Cribbs, L. L., Zainelli, G. M., Origitano, T. C., Singh, S., and Wurster, R. D. (2005). Variation of T-type calcium channel protein expression affects cell division of cultured tumor cells. *Cell Calcium* *37*, 105-119.
- Panner, A., and Wurster, R. D. (2006). T-type calcium channels and tumor proliferation. *Cell Calcium* *40*, 253-259.
- Papadia, S., Stevenson, P., Hardingham, N. R., Bading, H., and Hardingham, G. E. (2005). Nuclear Ca²⁺ and the cAMP response element-binding protein family mediate a late phase of activity-dependent neuroprotection. *J Neurosci* *25*, 4279-4287.
- Pardo, L. A., del Camino, D., Sanchez, A., Alves, F., Bruggemann, A., Beckh, S., and Stuhmer, W. (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *EMBO J* *18*, 5540-5547.
- Pelosi, G., Fumagalli, C., Trubia, M., Sonzogni, A., Rekhtman, N., Maisonneuve, P., Galetta, D., Spaggiari, L., Veronesi, G., Scarpa, A., *et al.* (2010). Dual role of RASSF1 as a tumor suppressor and an oncogene in neuroendocrine tumors of the lung. *Anticancer Res* *30*, 4269-4281.
- Perez-Reyes, E. (1998). Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* *30*, 313-318.

- Pillozzi, S., Brizzi, M. F., Balzi, M., Crociani, O., Cherubini, A., Guasti, L., Bartolozzi, B., Becchetti, A., Wanke, E., Bernabei, P. A., *et al.* (2002). HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. *Leukemia* *16*, 1791-1798.
- Plant, T. D., and Schaefer, M. (2005). Receptor-operated cation channels formed by TRPC4 and TRPC5. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* *371*, 266-276.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T. P., and Campbell, K. P. (1994). Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* *368*, 67-70.
- Prakriya, M., Solaro, C. R., and Lingle, C. J. (1996). [Ca²⁺]_i elevations detected by BK channels during Ca²⁺ influx and muscarine-mediated release of Ca²⁺ from intracellular stores in rat chromaffin cells. *J Neurosci* *16*, 4344-4359.
- 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*, 127rv123.
- Pretl (1944). Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdruse. *Virchows Archiv*, 392-404.
- 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*, 1295-1304.
- Price, M. G., Davis, C. F., Deng, F., and Burgess, D. L. (2005). The alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptor trafficking regulator "stargazin" is related to the claudin family of proteins by its ability to mediate cell-cell adhesion. *J Biol Chem* *280*, 19711-19720.
- 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*, 2223-2229.
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 8866-8871.
- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. L., Codd, E. E., and D'Andrea, M. R. (2002). Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Mol Pharmacol* *62*, 485-496.
- Qin, Y. R., Fu, L., Sham, P. C., Kwong, D. L., Zhu, C. L., Chu, K. K., Li, Y., and Guan, X. Y. (2008). Single-nucleotide polymorphism-mass array reveals commonly deleted regions at 3p22 and 3p14.2 associate with poor clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* *123*, 826-830.
- Qiu, Z., and Ghosh, A. (2008). A calcium-dependent switch in a CREST-BRG1 complex regulates activity-dependent gene expression. *Neuron* *60*, 775-787.
- Radhakrishnan, A., Stein, A., Jahn, R., and Fasshauer, D. (2009). The Ca²⁺ affinity of synaptotagmin 1 is markedly increased by a specific interaction of its C2B domain with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* *284*, 25749-25760.
- Raffo, A. J., Perlman, H., Chen, M. W., Day, M. L., Streitman, J. S., and Buttyan, R. (1995). Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* *55*, 4438-4445.

- Ramachandran, P. L., Craig, T. A., Atanasova, E. A., Cui, G., Owen, B. A., Bergen, H. R., 3rd, Mer, G., and Kumar, R. (2012). The potassium channel interacting protein 3 (DREAM/KChIP3) heterodimerizes with and regulates calmodulin function. *J Biol Chem* 287, 39439-39448.
- Randall, A. D., and Tsien, R. W. (1997). Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36, 879-893.
- Ranno, S., Motta, M., Rampello, E., Risino, C., Bennati, E., and Malaguarnera, M. (2006). The chromogranin-A (CgA) in prostate cancer. *Arch Gerontol Geriatr* 43, 117-126.
- Rao, J. N., Platoshyn, O., Li, L., Guo, X., Golovina, V. A., Yuan, J. X., and Wang, J. Y. (2002). Activation of K(+) channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C885-898.
- Rehak, R., Bartoletti, T. M., Engbers, J. D., Berecki, G., Turner, R. W., and Zamponi, G. W. (2013). Low voltage activation of KCa1.1 current by Cav3-KCa1.1 complexes. *PLoS One* 8, e61844.
- Renaudo, A., Watry, V., Chassot, A. A., Ponzio, G., Ehrenfeld, J., and Soriani, O. (2004). Inhibition of tumor cell proliferation by sigma ligands is associated with K+ Channel inhibition and p27kip1 accumulation. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 1105-1114.
- Richard, S., Neveu, D., Carnac, G., Bodin, P., Travo, P., and Nargeot, J. (1992). Differential expression of voltage-gated Ca(2+)-currents in cultivated aortic myocytes. *Biochim Biophys Acta* 1160, 95-104.
- Richardson, G. D., Robson, C. N., Lang, S. H., Neal, D. E., Maitland, N. J., and Collins, A. T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci* 117, 3539-3545.
- Rick, F. G., Schally, A. V., Block, N. L., Nadji, M., Szepeshazi, K., Zarandi, M., Vidaurre, I., Perez, R., Halmos, G., and Szalontay, L. (2011). Antagonists of growth hormone-releasing hormone (GHRH) reduce prostate size in experimental benign prostatic hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3755-3760.
- Rim, H. K., Lee, H. W., Choi, I. S., Park, J. Y., Choi, H. W., Choi, J. H., Cho, Y. W., Lee, J. Y., and Lee, K. T. (2012). T-type Ca2+ channel blocker, KYS05047 induces G1 phase cell cycle arrest by decreasing intracellular Ca2+ levels in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Bioorg Med Chem Lett* 22, 7123-7126.
- Rivas, M., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., and Santisteban, P. (2004). Transcriptional repressor DREAM interacts with thyroid transcription factor-1 and regulates thyroglobulin gene expression. *J Biol Chem* 279, 33114-33122.
- Rodman, D. M., Reese, K., Harral, J., Fouty, B., Wu, S., West, J., Hoedt-Miller, M., Tada, Y., Li, K. X., Cool, C., *et al.* (2005). Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res* 96, 864-872.
- Rokhlin, O. W., Taghiyev, A. F., Bayer, K. U., Bumcrot, D., Koteliansk, V. E., Glover, R. A., and Cohen, M. B. (2007). Calcium/calmodulin-dependent kinase II plays an important role in prostate cancer cell survival. *Cancer Biol Ther* 6, 732-742.
- Rong, Y. P., Aromolaran, A. S., Bultynck, G., Zhong, F., Li, X., McColl, K., Matsuyama, S., Herlitze, S., Roderick, H. L., Bootman, M. D., *et al.* (2008). Targeting Bcl-2-IP3 receptor interaction to reverse Bcl-2's inhibition of apoptotic calcium signals. *Mol Cell* 31, 255-265.

- Ronnberg, L., Vihko, P., Sajanti, E., and Vihko, R. (1981). Clomiphene citrate administration to normogonadotropic subfertile men: blood hormone changes and activation of acid phosphatase in seminal fluid. *Int J Androl* 4, 372-378.
- Roobol, M. J., and Carlsson, S. V. (2013). Risk stratification in prostate cancer screening. *Nat Rev Urol* 10, 248.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.
- Rubin, M. A., Bismar, T. A., Andren, O., Mucci, L., Kim, R., Shen, R., Ghosh, D., Wei, J. T., Chinnaiyan, A. M., Adami, H. O., *et al.* (2005). Decreased alpha-methylacyl CoA racemase expression in localized prostate cancer is associated with an increased rate of biochemical recurrence and cancer-specific death. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 1424-1432.
- Ruiz-Gomez, A., Mellstrom, B., Tornero, D., Morato, E., Savignac, M., Holguin, H., Aurrekoetxea, K., Gonzalez, P., Gonzalez-Garcia, C., Cena, V., *et al.* (2007). G protein-coupled receptor kinase 2-mediated phosphorylation of downstream regulatory element antagonist modulator regulates membrane trafficking of Kv4.2 potassium channel. *J Biol Chem* 282, 1205-1215.
- Rundle, A., Jankowski, M., Kryvenko, O. N., Tang, D., and Rybicki, B. A. (2013). Obesity and future prostate cancer risk among men after an initial benign biopsy of the prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22, 898-904.
- Ruth, P., Rohrkasten, A., Biel, M., Bosse, E., Regulla, S., Meyer, H. E., Flockerzi, V., and Hofmann, F. (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* 245, 1115-1118.
- Sackmann, S., Lichtenauer, U., Shapiro, I., Reincke, M., and Beuschlein, F. (2011). Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways. *Horm Metab Res* 43, 106-111.
- Saijo, K., Mecklenbrauker, I., Santana, A., Leitger, M., Schmedt, C., and Tarakhovsky, A. (2002). Protein kinase C beta controls nuclear factor kappaB activation in B cells through selective regulation of the IkappaB kinase alpha. *J Exp Med* 195, 1647-1652.
- Sainz, B., Jr., and Heeschen, C. (2013). Standing out from the crowd: cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 23, 431-433.
- Sakai, H., Shiraishi, K., Minami, Y., Yushita, Y., Kanetake, H., and Saito, Y. (1991). Immunohistochemical prostatic acid phosphatase level as a prognostic factor of prostatic carcinoma. *Prostate* 19, 265-272.
- Salido, G. M., Jardin, I., and Rosado, J. A. (2011). The TRPC ion channels: association with Orai1 and STIM1 proteins and participation in capacitative and non-capacitative calcium entry. *Adv Exp Med Biol* 704, 413-433.
- Salvatori, L., Caporuscio, F., Verdina, A., Starace, G., Crispi, S., Nicotra, M. R., Russo, A., Calogero, R. A., Morgante, E., Natali, P. G., *et al.* (2012). Cell-to-cell signaling influences the fate of prostate cancer stem cells and their potential to generate more aggressive tumors. *PLoS One* 7, e31467.
- Sandoval, A., Oviedo, N., Andrade, A., and Felix, R. (2004). Glycosylation of asparagines 136 and 184 is necessary for the alpha2delta subunit-mediated regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 576, 21-26.

- Sanlioglu, A. D., Koksai, I. T., Ciftcioglu, A., Baykara, M., Luleci, G., and Sanlioglu, S. (2007). Differential expression of TRAIL and its receptors in benign and malignant prostate tissues. *J Urol* *177*, 359-364.
- Santamaria, L., Martin, R., Martin, J. J., and Alonso, L. (2002). Stereologic estimation of the number of neuroendocrine cells in normal human prostate detected by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* *10*, 275-281.
- Sauer, C. G., Roemer, A., and Grobholz, R. (2006). Genetic analysis of neuroendocrine tumor cells in prostatic carcinoma. *Prostate* *66*, 227-234.
- Savignac, M., Mellstrom, B., Bebin, A. G., Oliveros, J. C., Delpy, L., Pinaud, E., and Naranjo, J. R. (2010). Increased B cell proliferation and reduced Ig production in DREAM transgenic mice. *J Immunol* *185*, 7527-7536.
- Schally, A. V. (2008). New approaches to the therapy of various tumors based on peptide analogues. *Horm Metab Res* *40*, 315-322.
- Schally, A. V., Varga, J. L., and Engel, J. B. (2008). Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* *4*, 33-43.
- Schroder, E., Byse, M., and Satin, J. (2009). L-type calcium channel C terminus autoregulates transcription. *Circ Res* *104*, 1373-1381.
- Schwaller, B. (2012). The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Adv Exp Med Biol* *740*, 1-25.
- Seino, S., Chen, L., Seino, M., Blondel, O., Takeda, J., Johnson, J. H., and Bell, G. I. (1992). Cloning of the alpha 1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 584-588.
- Seisen, T., Roupret, M., Faix, A., and Droupy, S. (2012). [The prostate gland: a crossroad between the urinary and the seminal tracts]. *Prog Urol* *22 Suppl 1*, S2-6.
- Senchenko, V. N., Liu, J., Loginov, W., Bazov, I., Angeloni, D., Seryogin, Y., Ermilova, V., Kazubskaya, T., Garkavtseva, R., Zabarovska, V. I., *et al.* (2004). Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene* *23*, 5719-5728.
- 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*, 620-628.
- Shang, Y., Myers, M., and Brown, M. (2002). Formation of the androgen receptor transcription complex. *Mol Cell* *9*, 601-610.
- Shariat, S. F., Kattan, M. W., Traxel, E., Andrews, B., Zhu, K., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M. (2004). Association of pre- and postoperative plasma levels of transforming growth factor beta(1) and interleukin 6 and its soluble receptor with prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* *10*, 1992-1999.
- Shariat, S. F., Roehrborn, C. G., McConnell, J. D., Park, S., Alam, N., Wheeler, T. M., and Slawin, K. M. (2007). Association of the circulating levels of the urokinase system of plasminogen activation with the presence of prostate cancer and invasion, progression, and metastasis. *J Clin Oncol* *25*, 349-355.

- Shariat, S. F., Semjonow, A., Lilja, H., Savage, C., Vickers, A. J., and Bjartell, A. (2011). Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol* 50 Suppl 1, 61-75.
- Sharma D.K., M. T. N., Pandher K. (2008). Comparative Histological Study Of The Prostate In Rat, Rabbit, Dog and Man. *Anat Soc India* 57 124-130
- Sheehan, J. P., Xu, Z., Popp, B., Kowalski, L., and Schlesinger, D. (2013). Inhibition of glioblastoma and enhancement of survival via the use of mibefradil in conjunction with radiosurgery. *J Neurosurg* 118, 830-837.
- Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., and Dascal, N. (1995). Ca²⁺ current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* 489 (Pt 1), 55-62.
- Si, J., Mueller, L., and Collins, S. J. (2007). CaMKII regulates retinoic acid receptor transcriptional activity and the differentiation of myeloid leukemia cells. *J Clin Invest* 117, 1412-1421.
- Sinha, A. A., Gleason, D. F., Wilson, M. J., Wick, M. R., Reddy, P. K., and Blackard, C. E. (1988). Relationship of prostatic acid phosphatase localization in human prostate by a monoclonal antibody with the Gleason grading system. *Prostate* 13, 1-15.
- Skryma, R. N., Prevarskaya, N. B., Dufy-Barbe, L., Odessa, M. F., Audin, J., and Dufy, B. (1997). Potassium conductance in the androgen-sensitive prostate cancer cell line, LNCaP: involvement in cell proliferation. *Prostate* 33, 112-122.
- Smith, J. A., Kohn, T. A., Chetty, A. K., and Ojuka, E. O. (2008). CaMK activation during exercise is required for histone hyperacetylation and MEF2A binding at the MEF2 site on the Glut4 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E698-704.
- Soong, T. W., Stea, A., Hodson, C. D., Dubel, S. J., Vincent, S. R., and Snutch, T. P. (1993). Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133-1136.
- Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., and Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 317, 909-916.
- Stangelberger, A., Schally, A. V., Varga, J. L., Zarandi, M., Cai, R. Z., Baker, B., Hammann, B. D., Armatis, P., and Kanashiro, C. A. (2005). Inhibition of human androgen-independent PC-3 and DU-145 prostate cancers by antagonists of bombesin and growth hormone releasing hormone is linked to PKC, MAPK and c-jun intracellular signalling. *Eur J Cancer* 41, 2735-2744.
- Starr, T. V., Prystay, W., and Snutch, T. P. (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5621-5625.
- Stephan, C., Jung, K., Diamandis, E. P., Rittenhouse, H. G., Lein, M., and Loening, S. A. (2002). Prostate-specific antigen, its molecular forms, and other kallikrein markers for detection of prostate cancer. *Urology* 59, 2-8.
- Stocker, M. (2004). Ca(2+)-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci* 5, 758-770.
- Strobl, J. S., Kirkwood, K. L., Lantz, T. K., Lewine, M. A., Peterson, V. A., and Worley, J. F., 3rd (1990). Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine. *Cancer Res* 50, 5399-5405.

- Strom, T. M., Nyakatura, G., Apfelstedt-Sylla, E., Hellebrand, H., Lorenz, B., Weber, B. H., Wutz, K., Gutwillinger, N., Ruther, K., Drescher, B., *et al.* (1998). An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* *19*, 260-263.
- Su, T. T., Guo, B., Kawakami, Y., Sommer, K., Chae, K., Humphries, L. A., Kato, R. M., Kang, S., Patrone, L., Wall, R., *et al.* (2002). PKC-beta controls I kappa B kinase lipid raft recruitment and activation in response to BCR signaling. *Nat Immunol* *3*, 780-786.
- Sun, Y., Niu, J., and Huang, J. (2009). Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Am J Transl Res* *1*, 148-162.
- Swoap, S. J., Hunter, R. B., Stevenson, E. J., Felton, H. M., Kansagra, N. V., Lang, J. M., Esser, K. A., and Kandarian, S. C. (2000). The calcineurin-NFAT pathway and muscle fiber-type gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol* *279*, C915-924.
- Szado, T., Vanderheyden, V., Parys, J. B., De Smedt, H., Rietdorf, K., Kotelevets, L., Chastre, E., Khan, F., Landegren, U., Soderberg, O., *et al.* (2008). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 2427-2432.
- Tadmouri, A., Kiyonaka, S., Barbado, M., Rousset, M., Fablet, K., Sawamura, S., Bahembera, E., Pernet-Gallay, K., Arnoult, C., Miki, T., *et al.* (2012). Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J* *31*, 3730-3744.
- Tadross, M. R., Dick, I. E., and Yue, D. T. (2008). Mechanism of local and global Ca²⁺ sensing by calmodulin in complex with a Ca²⁺ channel. *Cell* *133*, 1228-1240.
- Tammela, T. L. (2012). Endocrine prevention and treatment of prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* *360*, 59-67.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* *328*, 313-318.
- Tareilus, E., Roux, M., Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1997). A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 1703-1708.
- Tavoosidana, G., Ronquist, G., Darmanis, S., Yan, J., Carlsson, L., Wu, D., Conze, T., Ek, P., Semjonow, A., Eltze, E., *et al.* (2011). Multiple recognition assay reveals prostasomes as promising plasma biomarkers for prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 8809-8814.
- Taylor, J. T., Huang, L., Pottle, J. E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B. M., Agrawal, K. C., Hansen, J. B., and Li, M. (2008a). Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* *267*, 116-124.
- Taylor, J. T., Zeng, X. B., Pottle, J. E., Lee, K., Wang, A. R., Yi, S. G., Scruggs, J. A., Sikka, S. S., and Li, M. (2008b). Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol* *14*, 4984-4991.
- Terada, N., Shiraishi, T., Zeng, Y., Mooney, S. M., Yeater, D. B., Mangold, L. A., Partin, A. W., Kulkarni, P., and Getzenberg, R. H. (2012). Cyr61 is regulated by cAMP-dependent protein kinase with serum levels correlating with prostate cancer aggressiveness. *Prostate* *72*, 966-976.

- Theatre, E., Bours, V., and Oury, C. (2009). A P2X ion channel-triggered NF-kappaB pathway enhances TNF-alpha-induced IL-8 expression in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41, 705-713.
- Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnafant, J. L., *et al.* (2006). Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 66, 2038-2047.
- Thebault, S., Zholos, A., Enfissi, A., Slomianny, C., Dewailly, E., Roudbaraki, M., Parys, J., and Prevarskaya, N. (2005). Receptor-operated Ca²⁺ entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol* 204, 320-328.
- Thomas, L. N., Douglas, R. C., Lazier, C. B., Too, C. K., Rittmaster, R. S., and Tindall, D. J. (2008). Type 1 and type 2 5alpha-reductase expression in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol* 53, 244-252.
- Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., *et al.* (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 350, 2239-2246.
- Thompson, W. R., Majid, A. S., Czymmek, K. J., Ruff, A. L., Garcia, J., Duncan, R. L., and Farach-Carson, M. C. (2011). Association of the alpha(2)delta(1) subunit with Ca(v)3.2 enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes. *J Bone Miner Res* 26, 2125-2139.
- Tomita, S., Nicoll, R. A., and Brecht, D. S. (2001). PDZ protein interactions regulating glutamate receptor function and plasticity. *J Cell Biol* 153, F19-24.
- Tomlins, S. A., Aubin, S. M., Siddiqui, J., Lonigro, R. J., Sefton-Miller, L., Miick, S., Williamsen, S., Hodge, P., Meinke, J., Blase, A., *et al.* (2011). Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript stratifies prostate cancer risk in men with elevated serum PSA. *Sci Transl Med* 3, 94ra72.
- Toyota, M., Ho, C., Ohe-Toyota, M., Baylin, S. B., and Issa, J. P. (1999). Inactivation of CACNA1G, a T-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG island in human tumors. *Cancer Res* 59, 4535-4541.
- Tran-Van-Minh, A., and Dolphin, A. C. (2010). The alpha2delta ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit alpha2delta-2. *J Neurosci* 30, 12856-12867.
- Tran, C., Ouk, S., Clegg, N. J., Chen, Y., Watson, P. A., Arora, V., Wongvipat, J., Smith-Jones, P. M., Yoo, D., Kwon, A., *et al.* (2009). Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324, 787-790.
- Truong, L. D., Kadmon, D., McCune, B. K., Flanders, K. C., Scardino, P. T., and Thompson, T. C. (1993). Association of transforming growth factor-beta 1 with prostate cancer: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 24, 4-9.
- Tsavalier, L., Shapero, M. H., Morkowski, S., and Laus, R. (2001). Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61, 3760-3769.
- Tuckwell, H. C. (2012). Quantitative aspects of L-type Ca²⁺ currents. *Prog Neurobiol* 96, 1-31.

- Uhlen, P., and Fritz, N. (2010). Biochemistry of calcium oscillations. *Biochem Biophys Res Commun* 396, 28-32.
- Utleg, A. G., Yi, E. C., Xie, T., Shannon, P., White, J. T., Goodlett, D. R., Hood, L., and Lin, B. (2003). Proteomic analysis of human prostasomes. *Prostate* 56, 150-161.
- Uzzo, R. G., Haas, N. B., Crispen, P. L., and Kolenko, V. M. (2008). Mechanisms of apoptosis resistance and treatment strategies to overcome them in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 112, 1660-1671.
- Valdes, J. A., Flores, S., Fuentes, E. N., Osorio-Fuentealba, C., Jaimovich, E., and Molina, A. (2013). IGF-1 induces IP3 -dependent calcium signal involved in the regulation of myostatin gene expression mediated by NFAT during myoblast differentiation. *J Cell Physiol* 228, 1452-1463.
- Valerie, N. C., Dziegielewska, B., Hosing, A. S., Augustin, E., Gray, L. S., Brautigam, D. L., Larner, J. M., and Dziegielewski, J. (2013). Inhibition of T-type calcium channels disrupts Akt signaling and promotes apoptosis in glioblastoma cells. *Biochem Pharmacol* 85, 888-897.
- Valverde, M. A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M. I., Mann, G. E., Vergara, C., and Latorre, R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit. *Science* 285, 1929-1931.
- Van Poppel, H. (2010). Evaluation of degarelix in the management of prostate cancer. *Cancer Manag Res* 2, 39-52.
- Vandael, D. H., Marcantoni, A., Mahapatra, S., Caro, A., Ruth, P., Zuccotti, A., Knipper, M., and Carbone, E. (2010). Ca(v)1.3 and BK channels for timing and regulating cell firing. *Mol Neurobiol* 42, 185-198.
- 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 Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1, 169-179.
- 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, e45615.
- 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, 321-330.
- Veeramani, S., Yuan, T. C., Chen, S. J., Lin, F. F., Petersen, J. E., Shaheduzzaman, S., Srivastava, S., MacDonald, R. G., and Lin, M. F. (2005). Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 12, 805-822.
- Veldscholte, J., Berrevoets, C. A., Ris-Stalpers, C., Kuiper, G. G., Jenster, G., Trapman, J., Brinkmann, A. O., and Mulder, E. (1992). The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41, 665-669.
- Venancio, D. P., Andersen, M. L., Vilamaior, P. S., Santos, F. C., Zager, A., Tufik, S., Taboga, S. R., De Mello, M. T. (2012). Sleep deprivation alters rat ventral prostate

morphology, leading to glandular atrophy: a microscopic study contrasted with the hormonal assays. *J Biomed Biotechnol* 285938.

Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N. V., and Adelman, J. P. (1998). Calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Neurobiol* 8, 321-329.

Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nurnberg, B., Heblich, F., and Dolphin, A. C. (2004). PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci* 7, 939-946.

Wada, H., Hasegawa, K., Morimoto, T., Kakita, T., Yanazume, T., Abe, M., and Sasayama, S. (2002). Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription. *J Cell Biol* 156, 983-991.

Waithe, D., Ferron, L., Page, K. M., Chaggar, K., and Dolphin, A. C. (2011). Beta-subunits promote the expression of Ca(V)2.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 286, 9598-9611.

Walker, D., Bichet, D., Campbell, K. P., and De Waard, M. (1998). A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 1A subunit. *J Biol Chem* 273, 2361-2367.

Wanajo, A., Sasaki, A., Nagasaki, H., Shimada, S., Otsubo, T., Owaki, S., Shimizu, Y., Eishi, Y., Kojima, K., Nakajima, Y., *et al.* (2008). Methylation of the calcium channel-related gene, CACNA2D3, is frequent and a poor prognostic factor in gastric cancer. *Gastroenterology* 135, 580-590.

Wang, K., Wang, J., Liu, B., Lin, S., Zhao, P., Liu, J., Jones, G., and Huang, H. C. (2013). Effects on DPPH inhibition of egg-white protein polypeptides treated by pulsed electric field technology. *J Sci Food Agric* 93, 1641-1648.

Wang, Q., Horiatis, D., and Pinski, J. (2004). Interleukin-6 inhibits the growth of prostate cancer xenografts in mice by the process of neuroendocrine differentiation. *Int J Cancer* 111, 508-513.

Wang, Y. Q., Brooks, G., Yuan, W. Z., Zhu, C. B., Li, Y. Q., and Wu, X. S. (2002a). [Functional analysis of the alpha1G subunit of the T-type calcium channel in cellular proliferation]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 35, 229-235.

Wang, Y. Q., Brooks, G., Zhu, C. B., Yuan, W. Z., Li, Y. Q., and Wu, X. S. (2002b). [Functional analysis of the human T-type calcium channel alpha 1H subunit gene in cellular proliferation]. *Yi Chuan Xue Bao* 29, 659-665.

Wang, Z. (2004). Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch* 448, 274-286.

Waning, J., Vriens, J., Owsianik, G., Stuwe, L., Mally, S., Fabian, A., Frippiat, C., Nilius, B., and Schwab, A. (2007). A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium* 42, 17-25.

Weber, M. J., and Gioeli, D. (2004). Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 91, 13-25.

Wei, L., Yu, S. P., Gottron, F., Snider, B. J., Zipfel, G. J., and Choi, D. W. (2003). Potassium channel blockers attenuate hypoxia- and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo. *Stroke* 34, 1281-1286.

Wei, M. H., Latif, F., Bader, S., Kashuba, V., Chen, J. Y., Duh, F. M., Sekido, Y., Lee, C. C., Geil, L., Kuzmin, I., *et al.* (1996). Construction of a 600-kilobase cosmid clone contig and

generation of a transcriptional map surrounding the lung cancer tumor suppressor gene (TSG) locus on human chromosome 3p21.3: progress toward the isolation of a lung cancer TSG. *Cancer Res* 56, 1487-1492.

Weissgerber, P., Held, B., Bloch, W., Kaestner, L., Chien, K. R., Fleischmann, B. K., Lipp, P., Flockerzi, V., and Freichel, M. (2006). Reduced cardiac L-type Ca^{2+} current in $\text{Ca(V)}\beta 2^{-/-}$ embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res* 99, 749-757.

Wernert, N., Seitz, G., and Achtstatter, T. (1987). Immunohistochemical investigation of different cytokeratins and vimentin in the prostate from the fetal period up to adulthood and in prostate carcinoma. *Pathol Res Pract* 182, 617-626.

Wheeler, D. G., Barrett, C. F., Groth, R. D., Safa, P., and Tsien, R. W. (2008). CaMKII locally encodes L-type channel activity to signal to nuclear CREB in excitation-transcription coupling. *J Cell Biol* 183, 849-863.

Whittaker, C. A., and Hynes, R. O. (2002). Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 13, 3369-3387.

Williams, M. E., Feldman, D. H., McCue, A. F., Brenner, R., Velicelebi, G., Ellis, S. B., and Harpold, M. M. (1992). Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8, 71-84.

Williams, M. E., Washburn, M. S., Hans, M., Urrutia, A., Brust, P. F., Prodanovich, P., Harpold, M. M., and Stauderman, K. A. (1999). Structure and functional characterization of a novel human low-voltage activated calcium channel. *J Neurochem* 72, 791-799.

Wolfe, J. T., Wang, H., Howard, J., Garrison, J. C., and Barrett, P. Q. (2003). T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. *Nature* 424, 209-213.

Womack, M. D., Chevez, C., and Khodakhah, K. (2004). Calcium-activated potassium channels are selectively coupled to P/Q-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 24, 8818-8822.

Wong, A. M., Kong, K. L., Chen, L., Liu, M., Zhu, C., Tsang, J. W., and Guan, X. Y. (2013). Characterization of CACNA2D3 as a putative tumor suppressor gene in the development and progression of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*.

Wu, C., and Huang, J. (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *J Biol Chem* 282, 3571-3583.

Wycisk, K. A., Budde, B., Feil, S., Skosyrski, S., Buzzi, F., Neidhardt, J., Glaus, E., Nurnberg, P., Ruether, K., and Berger, W. (2006). Structural and functional abnormalities of retinal ribbon synapses due to Cacna2d4 mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 3523-3530.

Xiao, D., Chinnappan, D., Pestell, R., Albanese, C., and Weber, H. C. (2005). Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells. *Cancer Res* 65, 9934-9942.

Xiong, W., Niu, P. Y., Zhu, W. T., and Chen, J. (2009). Tenascin-C as a prognostic biomarker in osteosarcoma? *Chin Med J (Engl)* 122, 2737-2743.

Xue, Y., Smedts, F., Verhofstad, A., Debruyne, F., de la Rosette, J., and Schalken, J. (1998). Cell kinetics of prostate exocrine and neuroendocrine epithelium and their differential interrelationship: new perspectives. *Prostate Suppl* 8, 62-73.

- Yan, J., and Aldrich, R. W. (2010). LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* *466*, 513-516.
- Yan, J., and Aldrich, R. W. (2012). BK potassium channel modulation by leucine-rich repeat-containing proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 7917-7922.
- Yang, L., Katchman, A., Morrow, J. P., Doshi, D., and Marx, S. O. (2011). Cardiac L-type calcium channel (Cav1.2) associates with gamma subunits. *FASEB J* *25*, 928-936.
- Yang, S., Zhang, J. J., and Huang, X. Y. (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* *15*, 124-134.
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* *419*, 35-42.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M. D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* *443*, 226-229.
- Yuan, T. C., Veeramani, S., Lin, F. F., Kondrikou, D., Zelivianski, S., Igawa, T., Karan, D., Batra, S. K., and Lin, M. F. (2006). Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocr Relat Cancer* *13*, 151-167.
- Yuan, T. C., Veeramani, S., and Lin, M. F. (2007). Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocr Relat Cancer* *14*, 531-547.
- Zeng, X. H., Xia, X. M., and Lingle, C. J. (2005). Divalent cation sensitivity of BK channel activation supports the existence of three distinct binding sites. *J Gen Physiol* *125*, 273-286.
- Zhang, Y., Yamada, Y., Fan, M., Bangaru, S. D., Lin, B., and Yang, J. (2010). The beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* *285*, 2527-2536.
- Zhang, Y., Zhang, J., Jiang, D., Zhang, D., Qian, Z., Liu, C., and Tao, J. (2012). Inhibition of T-type Ca(2)(+) channels by endostatin attenuates human glioblastoma cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* *166*, 1247-1260.
- Zhao, W., Wang, L., Han, H., Jin, K., Lin, N., Guo, T., Chen, Y., Cheng, H., Lu, F., Fang, W., *et al.* (2013). 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel alpha2delta1 subunit. *Cancer Cell* *23*, 541-556.
- Zhong, X., Liu, J. R., Kyle, J. W., Hanck, D. A., and Agnew, W. S. (2006). A profile of alternative RNA splicing and transcript variation of CACNA1H, a human T-channel gene candidate for idiopathic generalized epilepsies. *Hum Mol Genet* *15*, 1497-1512.
- Zhou, J. R., Yu, L., Zerbini, L. F., Libermann, T. A., and Blackburn, G. L. (2004). Progression to androgen-independent LNCaP human prostate tumors: cellular and molecular alterations. *Int J Cancer* *110*, 800-806.
- Zhu, X., Albertsen, P. C., Andriole, G. L., Roobol, M. J., Schroder, F. H., and Vickers, A. J. (2012). Risk-based prostate cancer screening. *Eur Urol* *61*, 652-661.
- Zimmermann, B., and Walz, B. (1999). The mechanism mediating regenerative intercellular Ca²⁺ waves in the blowfly salivary gland. *EMBO J* *18*, 3222-3231.
- Zou, S., Jha, S., Kim, E. Y., and Dryer, S. E. (2008). The beta 1 subunit of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Mol Pharmacol* *73*, 369-378.

