

Université Lille1 Sciences et Technologies

Année 2014

N° d'ordre: 41670

## THESE

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE1 SCIENCES ET TECHNOLOGIES**

Discipline: Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

---

**La signalisation calcique dans l'homéostasie de  
l'épiderme et au cours du vieillissement**  
*Implication dans le cancer*

---

**Thèse dirigée par le Dr. V'yacheslav Lehen'kyi**

Présentée et soutenue publiquement par

**Maylis Raphaël**

Le 15 décembre 2014

Membres du Jury :

Pr. Philippe Delannoy, CNRS 8576, Université Lille1

Dr. Laurence Bresson-Bepoldin, CR1 CNRS, INSERM U916, Bordeaux

Dr. David Bernard, DR CNRS, INSERM U1052/CNRS 5286, Lyon

Dr. Benjamin Beck, IRIBHM, Université libre de Bruxelles

Dr. Thierry Oddos, responsable R&D, Johnson&Johnson, Val de Reuil

Pr. Natalia Prevarskaya, INSERM U1003, Université Lille1

Pr. Roman Skryma, INSERM U1003, Université Lille1

Dr. V'yacheslav Lehen'kyi, INSERM U1003, Université Lille1

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

Examineur

# RESUME

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain et sa position d'interface entre le milieu extérieur et l'organisme en fait un organe crucial et particulièrement vulnérable. La peau assure une protection contre les agressions physiques (coups, frottements, UVs...), chimiques (produits irritants, toxiques...) et immunologiques. La peau participe aussi à la thermorégulation, à la biosynthèse de facteurs paracrines et endocrines (Vitamine D, adipokines, angiotensinogènes...), elle empêche la déshydratation et procure des informations sensorielles indispensables à notre organisme.

L'épiderme est la partie la plus superficielle de la peau, celle directement en contact avec l'extérieur. Ce tissu participe à l'intégralité des fonctions de la peau et doit son rôle de « barrière » à son fonctionnement très singulier. En effet, afin d'éviter toute accumulation de pathogènes ou de lésions, les cellules épithéliales de l'épiderme ou kératinocytes se détachent en surface par le processus de desquamation. La division asymétrique des kératinocytes de la couche basale garantit le renouvellement constant des cellules, qui suivent ensuite le processus ascensionnel de différenciation terminale et viennent desquamer en surface assurant l'homéostasie de l'épiderme.

Toute dermatose est liée à une dérégulation de la balance prolifération/différenciation des kératinocytes et à une modification du gradient de calcium observé dans l'épiderme sain. Or, *in vitro*, les kératinocytes sont particulièrement sensibles au calcium. Ainsi, les canaux ioniques de la famille des TRP (Transient Receptor Potential), qui ont une grande diversité de stimuli (température, pression...) se sont révélés d'un grand intérêt dans la physiologie de l'épiderme et notamment dans la réparation de la barrière cutanée. De premières données publiées par le laboratoire de Physiologie Cellulaire ont notamment montré l'importance du canal TRPV6 dans la différenciation des kératinocytes humains. De plus, au cours du vieillissement, des modifications structurales sont observées, associées à une xérose cutanée (sécheresse), une cicatrisation moins rapide et une disparition des papilles dermiques affaiblissant l'épiderme face aux contraintes mécaniques. L'incidence de certaines dermatoses augmente avec l'âge (kératose séborrhéique) mais aussi et surtout celles des tumeurs malignes basocellulaires et spinocellulaires.

Nous nous sommes alors intéressés à l'évolution de l'expression de 90 gènes, parmi les acteurs de la signalisation calciques, au cours du vieillissement de l'épiderme afin d'identifier des gènes cibles et de faire le point sur les canaux TRP exprimés ou non dans l'épiderme humain. Pour cela, nous avons travaillé en collaboration avec le service d'anatomo-pathologie de l'hôpital Saint Vincent de Paul à Lille qui nous a fourni des échantillons de peau d'une cohorte de 20 patients ayant subi une dermolipectomie abdominale ou une résection de sinus pilonidal (19-70 ans). La même analyse a ensuite été réalisée à partir de cultures primaires de kératinocytes humains afin de déterminer l'expression spécifique de ces gènes dans la différenciation induite par le calcium ou la sénescence intrinsèque des kératinocytes.

Ensuite, le rôle du canal Orai1 a plus particulièrement été décortiqué dans la physiologie de l'épiderme et nous avons montré que celui-ci maintient les kératinocytes à l'état indifférencié prolifératif et intervient dans la migration de ces cellules.

Enfin, nous avons examiné l'implication des canaux Orai1 et TRPV6 dans la progression d'un cancer épithélial, le cancer de la prostate, que nous pourrions maintenant transposer dans les cancers cutanés baso- et spino-cellulaires.

# ABSTRACT

Skin is the largest organ of the human body that borders the external environment. It is responsible for the protection of our body from the physical impacts (strokes, rubbing, UV exposure, etc...) and temperature, chemical aggressions (irritants, toxic products, etc...) and pathogen invasion (bacteria, virus, etc...). In addition, skin is involved in the thermoregulation, in the biosynthesis of numerous endo- and paracrine factors (Vitamin D, adipokines, angiotensinogen, etc...), in water barrier and in the number of signal perceptions (pressure, nociception, etc...).

Epidermis is the most external part of the skin that contacts directly the environment. This tissue is highly organized to accomplish its primary role of permeability barrier. In fact, epidermis is mainly composed of keratinocytes which move outwards leaving the skin (the process called desquamation) thus protecting the skin from various pathogens and lesions. The asymmetric division of the basal keratinocytes is responsible for the constant cell supply moving upwards while entering the terminal differentiation, thus providing skin homeostasis. The impairment of this tiny balance between proliferation and differentiation will definitely lead to the emergence of skin disorder. Moreover, since both processes are highly dependent on calcium, the existence of calcium gradient has been reported in the skin and the crucial role of calcium was demonstrated *in vitro*.

TRP (Transient Receptor Potential) channels have been discovered as a superfamily of cationic channels being activated by vast variety of stimuli (temperature, pression, etc...), and their role in epidermis physiology and barrier function was shown. One of them, TRPV6 channel, was previously published by the Laboratory of Cell Physiology as a channel having an important role in human keratinocytes differentiation.

During aging various structural modifications occur which are associated with skin dryness, slow healing, dermal ridges extinction which all weaken epidermis as a barrier. The appearance of most skin disorders increases with age as well as the incidence of skin cancer such as basal and squamous cell carcinomas.

We have thus studied the expression of 90 genes involved in calcium signalling during epidermis aging in order to identify the prospective target genes including all TRP channels. The collaboration with the Department of Cell Pathology of the Saint Vincent de Paul Hospital of Lille has given us the possibility to obtain a cohort of 20 healthy human subjects being subjected to abdominal dermolipectomia (19-70 years old). The appropriate *in vitro* model was also established using primary human keratinocytes to study the gene expression during calcium-induced differentiation and replicative senescence.

Further, the role of Orai1 channel in epidermis physiology has been studied in detail showing its role in maintaining of keratinocyte's undifferentiated and proliferative state with its crucial role in keratinocyte migration.

Finally, we have demonstrated the involvement of both Orai1 and TRPV6 calcium channels in cancer using a model of such epithelial cancer as a prostate cancer. These data will be employed in the future for the study of basal and squamous cell carcinomas.

# REMERCIEMENTS

*“Non, tu n'as pas quitté mes yeux;  
Et quand mon regard solitaire  
Cessa de te voir sur la terre,  
Soudain je te vis dans les cieux.*

*[...]*

*Si j'admire ces feux épars  
Qui des nuits parsèment le voile,  
Je crois te voir dans chaque étoile  
Qui plaît le plus à mes regards.”*

*Souvenir, Alphonse de Lamartine*

## **Aux membres du Jury**

Mesdames, Messieurs les membres du jury, veuillez accepter mes sincères remerciements pour avoir accepté d'assister à ma soutenance de thèse, pour votre lecture critique et vos conseils.

Pr. Delannoy,

Vous avez toujours soutenu mon travail, depuis la fin du master et tout au long de ma thèse. Je vous remercie pour votre considération et vos conseils avisés lors des CST. Vous avez présidé l'ouverture de ce chapitre et je suis émue que vous ayez accepté d'en présider également la clôture. Merci beaucoup.

Dr. Bernard et Dr. Bresson-Bepoldin,

C'est pour moi un grand honneur que vous soyez rapporteurs de cette thèse, pour laquelle vous avez accepté de consacrer votre temps, recevez pour cela toute ma gratitude. Je vous remercie également d'avoir accepté de vous déplacer depuis le sud de la France afin d'assister à ma soutenance et partager avec nous vos connaissances, ce qui rendra, j'en suis sûre, la discussion très intéressante.

Dr. Oddos,

Je tiens à vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi, sans vous, je n'aurais pas travaillé sur la peau et j'adore ce modèle. Je vous suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance et j'espère que mes travaux de recherche seront utiles à Johnson&Johnson. J'espère qu'un jour nous aurons l'occasion de travailler à nouveau ensemble.

Dr. Beck,

Je suis vraiment ravie que vous soyez membre de mon jury de thèse, vous êtes l'instigateur de la dermatologie au laboratoire et je vous dois en partie mes connaissances que vous aviez transmises à Matthieu et qui me les a ensuite lui-même transmises. J'espère que vous serez fier de vos héritiers scientifiques au laboratoire.

Je remercie tout particulièrement madame le Pr. Prevarskaya pour m'avoir acceptée dans son laboratoire. Merci de m'avoir offert tant d'opportunités, d'être une directrice toujours à l'écoute, disponible et d'excellents conseils. Je suis vraiment fière d'avoir fait partie de votre laboratoire.

Merci à monsieur le Pr. Skryma d'avoir toujours suivi, de prêt ou de loin, le bon déroulement de ma thèse. Merci pour vos conseils et votre présence au « grand jury » de M2 en tant que futur directeur de thèse, votre avis a beaucoup compté pour moi.

Enfin je remercie le Dr. V'yacheslav Lehen'kyi,

Slava, merci d'avoir misé sur moi, de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi depuis le début. Vous vous êtes toujours investi à 200% pour me former et faire en sorte que le pari soit gagnant. C'est vrai que vous êtes un chef comme on en voit rarement, ça n'a pas toujours été facile, ni de tout repos, mais je vous dois beaucoup et j'espère avoir été, dans l'ensemble, un bon poulain.

## **Aux membres du laboratoire et aux voisins**

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire pour leur professionnalisme, leur aide et leurs précieux conseils mais aussi pour leur bonne humeur et leur humour. Grâce à vous les temps d'incubation n'étaient jamais bien longs...

Chercheurs, enseignants-chercheurs, techniciens, étudiants stagiaires, masters ou thésards, ils ont tous, à leur manière, participé au bon déroulement de ma thèse.

Je tiens à remercier Matthieu qui m'a gentiment et toujours très patiemment transmis son savoir-faire et ses connaissances sur les kératinocytes. Merci de m'avoir supportée pendant un mois chez toi à San Diego et de m'avoir attendue le soir devant le labo sans jamais râler, C'était vraiment adorable et malgré tout le travail à faire, j'ai passé un super été là-bas avec toi. J'espère que nous en aurons à nouveau l'occasion et avec toute ta petite famille cette fois. On aura quand même fait du bon boulot ensemble !

Quelle chance j'ai eu d'être en thèse avec Charlotte, je suis vraiment heureuse de t'avoir rencontrée et d'avoir partagé le bureau avec toi ces quelques années. Merci pour ta bonne humeur chaque jour et ton soutien quoi qu'il arrive. J'en profite pour aussi te féliciter pour ton travail admirable, tu es un exemple de réussite et de persévérance. Restons dans le bureau, où je remercie Fabien pour son radiateur, sa cafetière, ses petites blagues mais surtout pour tous ses bons conseils. J'ai vraiment passé de très bons moments avec vous deux.

Brigitte, je vous remercie pour votre aide et votre gentillesse.

Franck, je te remercie pour ta bonne humeur, ton zen naturel et tes encouragements.

Aux tardifs du labo pour m'avoir accompagnée dans ces longues journées de manip, ils se reconnaîtront.

## **A ma famille et à mes amis**

A mes parents, ma sœur et mon beau-frère, j'espère que vous serez fiers de moi ! Merci de m'avoir tant aidée et toujours soutenue. Je suis désolée pour tout ce stress.

A mes nièces qui sont nos « crayons de soleil » dans le brouillard du ch'nord.

Mille mercis à tous mes amis, grâce auxquels chaque journée, bonne ou moins bonne, finit toujours plus belle. Vous êtes les meilleurs !

Chère Geneviève, cher Novo, merci pour tous ces bons moments passés ensemble, pour votre accueil, votre gentillesse et vos encouragements pendant ma thèse.

# TABLE DES MATIERES

<b>RESUME</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>4</b>
<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>7</b>
<b>GLOSSAIRE</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>16</b>
I. La signalisation calcique dans les cellules non excitables	18
<i>A.L'homéostasie calcique</i>	18
<i>B.Les acteurs de la signalisation calcique</i>	20
1. Les canaux calciques des organites	22
2. Les canaux calciques membranaires	22
<i>C.Le calcium dans les processus cellulaires</i>	28
1. Importance du Calcium dans le cycle cellulaire	28
2. Importance du calcium dans l'apoptose	30
3. Le calcium dans l'autophagie	32
4. Importance du calcium dans l'adhésion et la motilité cellulaire	34
II. Le rôle crucial du calcium dans l'épiderme de la peau humaine	36
<i>A.Anatomie et physiologie de la peau</i>	36
<i>B.Rôles de l'épiderme dans les fonctions de la peau</i>	40
1. L'épiderme dans la fonction de barrière physique	40
2. L'épiderme dans la fonction de barrière chimique, échanges et dynamique de l'hydratation cutanée	40
3. L'épiderme, barrière antimicrobienne et acteur du système immunitaire	42
4. L'épiderme, tissu sensoriel	44
5. L'épiderme dans les fonctions métaboliques de la peau	44
<i>C.Régulation de l'homéostasie de l'épiderme par le calcium</i>	46
1. Maintien du gradient calcique dans l'épiderme	46
2. Rôle du calcium dans la croissance des kératinocytes	48
i. La division asymétrique des kératinocytes	48
ii. La différenciation des kératinocytes	50
iii. Régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes	52
3. Rôle du calcium dans la cicatrisation et la migration des kératinocytes	54
4. Le calcium et les canaux calciques dans des pathologies dermatologiques bénignes et cancéreuses	56
i. Les canaux calciques, clés d'un épiderme sain et cibles dans les dermatoses	56
ii. Le calcium et les canaux calciques dans les cancers cutanés des kératinocytes	60
III. IMPLICATION DU CALCIUM DANS LE VIEILLISSEMENT	66
<i>A.Augmentation du calcium plasmatique avec l'âge</i>	66
1. Régulation du calcium plasmatique	66
2. Vieillesse des organes à l'origine de l'augmentation du calcium plasmatique au cours du vieillissement	66
<i>B.Le vieillissement : théories et caractéristiques cellulaires</i>	70
1. Caractéristiques primaires du vieillissement cellulaire	70
i. L'instabilité génomique	70
ii. Le raccourcissement télomérique	72



iii. L'altération épigénétique	72
iv. Dérégulation de l'homéostasie protéique	74
2. Caractéristiques secondaires du vieillissement cellulaire	76
i. Dérégulation de la détection des éléments nutritifs	76
ii. Stress mitochondrial	76
iii. Sénescence cellulaire	78
3. Caractéristiques intégratives du vieillissement cellulaire	79
i. Epuisement des cellules souches	79
ii. Perturbation de la communication intercellulaire	80
C. Qu'est ce que la sénescence ?	81
1. Age <i>in vivo</i> et Sénescence <i>in vitro</i>	81
2. L'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence	82
3. Caractéristiques physiologiques et morphologiques des cellules en sénescence	84
D. Implication du calcium dans les caractéristiques cellulaires du vieillissement	86
1. Le calcium et les canaux calciques impliqués dans le vieillissement <i>in vivo</i>	86
2. Régulation de la TERT par le calcium	88
3. Régulation du métabolisme énergétique par le calcium	89
4. Régulation de la protéostasie par le calcium	89

## PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS 91

### MATERIELS & METHODES 93

I. Modèles animaux utilisés et prélèvements humains	94
A. Souris Swiss-Nude et xénogreffes	94
B. Souris <i>Orai1</i> <sup>-/-</sup>	94
C. Métastases osseuses	96
D. Echantillons de peau humaine	96
II. Culture cellulaire	97
A. Kératinocytes primaires et lignées cellulaires de kératinocytes	97
B. Cellules cancéreuses prostatiques	99
III. Biologie moléculaire	100
A. Transfections de siARN	100
B. Extraction d'ADN, des ARN <sub>totaux</sub> et transcription inverse	100
C. PCR semi-quantitative	101
D. PCR quantitative en temps réel	102
IV. Analyse protéomique	103
A. Biotinylation des protéines membranaires, extraction et dosage des protéines totales	103
B. Co-immunoprécipitation	103
C. Électrophorèse en conditions dénaturantes et Immunodétection des protéines.	103
D. Immunodétection sur coupes de tissus ou cellules fixées	104
V. Biologie cellulaire et test fonctionnel	105
A. Étude de la prolifération cellulaire	105
B. Tests de migration	106
C. Étude de la mort cellulaire par apoptose	107
VI. Patch clamp et imagerie calcique	108
A. Patch Clamp	108
B. Imagerie calcique	109

VII. Etudes statistiques	110
<b>RESULTATS 111</b>	
I. Le canal calcique ORAI1, chef d'orchestre de l'homéostasie de l'épiderme.	112
II. Evolution de la signature calcique au cours du vieillissement de l'épiderme humain	131
<i>A. Acteurs de la signalisation calcique et marqueurs physiologiques exprimés dans l'épiderme humain</i>	134
<i>B. Evaluation d'une corrélation entre l'expression génétique des acteurs de l'homéostasie calcique et le vieillissement de l'épiderme humain</i>	138
<i>C. Détermination de l'expression génique des acteurs de l'homéostasie calcique dans les kératinocytes indifférenciés, différenciés ou sénescents</i>	142
<i>D. Caractérisation immunohistochimique du vieillissement de l'épiderme humain</i>	146
<i>E. Modification des stocks et entrées calciques dans les kératinocytes primaires humains en sénescence</i>	146
<b>CONCLUSION 149</b>	
<b>DISCUSSION 153</b>	
I. Expression des canaux et pompes calciques dans l'épiderme humain	154
II. Evolution structurale de l'épiderme humain entre 20 et 70 ans	156
III. Implication des outils de la signalisation calcique dans l'homéostasie et le vieillissement de l'épiderme, l'exemple d'Orai1	157
<i>A. Orai1, un canal de prolifération dont l'expression augmente avec l'âge</i>	157
<i>B. Cas des autres canaux et acteurs de la signalisation calcique</i>	159
IV. Les voies de signalisation dépendantes du calcium impliquées dans l'homéostasie de l'épiderme au cours du vieillissement	163
<b>PERSPECTIVES 167</b>	
<b>ANNEXE I: Rôle des canaux Orai1 et TRPV6 dans la progression du cancer de la prostate 169</b>	
I. INTRODUCTION AU CANCER DE LA PROSTATE	170
<i>A. Anatomie et physiologie de la prostate</i>	170
<i>B. Le calcium et les canaux calciques dans le cancer de la prostate</i>	171
II. Implication du canal Orai1 et du SOCE dans la progression du cancer de la prostate vers les stades androgéno-indépendants et résistants à l'apoptose	174
<i>A. Implication du SOCE et du canal Orai1 dans la différenciation neuro-endocrine des cellules cancéreuses prostatiques</i>	174
1. Résumé	174
2. Discussion	186
<i>B. La réorganisation du cytosquelette, un mécanisme alternatif de contrôle du SOCE dans les cellules neuro-endocrines issues de cellules cancéreuses prostatiques</i>	188
1. Résumé :	188
2. Discussion	202
III. IMPLICATION DE TRPV6 DANS LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE	204
<i>A. Introduction</i>	204
<i>B. TRPV6 détermine l'effet de la Vitamine D3 sur la croissance des cellules PCa</i>	214
1. Résumé	214
2. Discussion	224
<i>C. TRPV6 est transloqué à la membrane plasmique par un mécanisme lié au SOCE par Orai1 et contrôle la survie des cellules PCa</i>	226
1. Résumé	226

2. Discussion

244

**ANNEXE II: Protocole de xénogreffes in vivo dans un modèle de souris swiss nude** 246

**BIBLIOGRAPHIE** 253

# GLOSSAIRE

ABP	Actin Binding Protein
ADN	Acide déoxyNucléotide
ADP	Adénosine DiPhosphate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AP-1	Activator Protein 1
AP-2	Activator Protein 2
ARN	Acide RiboNucléotide
ATP	Adénosine triPhosphate
BCC	Basal Cell Carcinoma
CAMK	Calmoduline Kinase
CAMKK	Calmoduline Kinase Kinase
CaSR	Ca <sup>2+</sup> Sensor Receptor
CBP	Ca <sup>2+</sup> -Binding Protein
CICR	Ca <sup>2+</sup> -induced Ca <sup>2+</sup> release
CRE	Ca <sup>2+</sup> -Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding protein
CS	Citrate Synthase
CYP27A	sterol 27-hydroxylase
CYP27B1	25-hydroxyvitamin D-1 alpha hydroxylase
DAG	DiAcylGlycerol
DDR	DNA Damage Response
DhPKa	Differentiated human Primary Keratinocyte adult
Dsc	Desmocolline
Dsg	Desmogléine
E <sub>2</sub> F	Elongation Factor 2
EDTA	acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
EGF	Epithelial Growth Factor
EGFR	Epithelial Growth Factor Receptor
EGTA	acide Ethylène Glycol Tétra Acétique
FA	Focal Adhesion
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLG	Filaggrine
HaCaT	Lignée cellulaire de keratinocytes immortalisés
HEK	Human Embryonic Kidney (lignée cellulaire)
hGK	human Gingival Keratinocyte
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukine
IP <sub>3</sub> (InsP <sub>3</sub> )	Inositol tri-Phosphate
IP <sub>3</sub> R	Inositol triPhosphate Receptor
IVL	Involucrine
KRT	Kératine
LNCaP	Lymph Node Carcinoma of the Prostate (lignée cellulaire)

MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCU	Mitochondrial Ca <sup>2+</sup> Uniporter
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
MMP	Matrix Metallo-Proteinase
mPK	mouse Primary Keratinocyte
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC	mammalian Target Of Rapamycin Complex
mPTP	mitochondrial Permeability Transition Pore
NAD <sup>+</sup> /NADH	nicotinamide adénine dinucléotide forme oxydée/réduite
NCKX	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> Exchanger
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Exchanger
NED	Neuro-Endocrine Differentiation
NF-κB	Nuclear Factor κ B
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NMF	natural Moisturizing Factor
OIS	Oncogene-Induced Senescence
PCa	Prostate Cancer
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKC	Protéine Kinase dépendante du Ca <sup>2+</sup>
PLC	PhosphoLipase c
PM	Plasma Membrane
PMCA	Plasma Membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase
pRB	protéine du Rétinoblastome
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTH	Parathyroid Hormone
RE	Réticulum Endoplasmique
ROC	Receptor-Operated Channel
ROS	Reactive Oxygen Species
RYR	Ryanodine Receptor
SA-β-Gal	Senescence-Associated β-Galactosidase
SB	Stratum Basalis
SC	Stratum Corneum
SCC	Squamous Cell Carcinoma
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
SG	Stratum Granulosum
SMOC	Second Messenger-Operated Channel
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SOAR	STIM1-Orai1 Activating Region
SOC	Store-Operated Channel
SOCE	Store-Operated Ca <sup>2+</sup> Entry
SPCA	Secretion Pathway Ca <sup>2+</sup> ATPase
STIM1	STromal Interaction Molecule 1
TERT	TElomerase Reverse Transcriprase
TEWL	TransEpidermal Water Loss

Tg	Thapsigargin
TGF	Transforming Growth Factor
TGM	Transglutaminase
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRP	Transient Receptor Potential
UHPKa	Undifferentiated human Primary Keratinocyte adult
UPR	Unfolded Protein Response
UV	Ultra-Violet

# INTRODUCTION



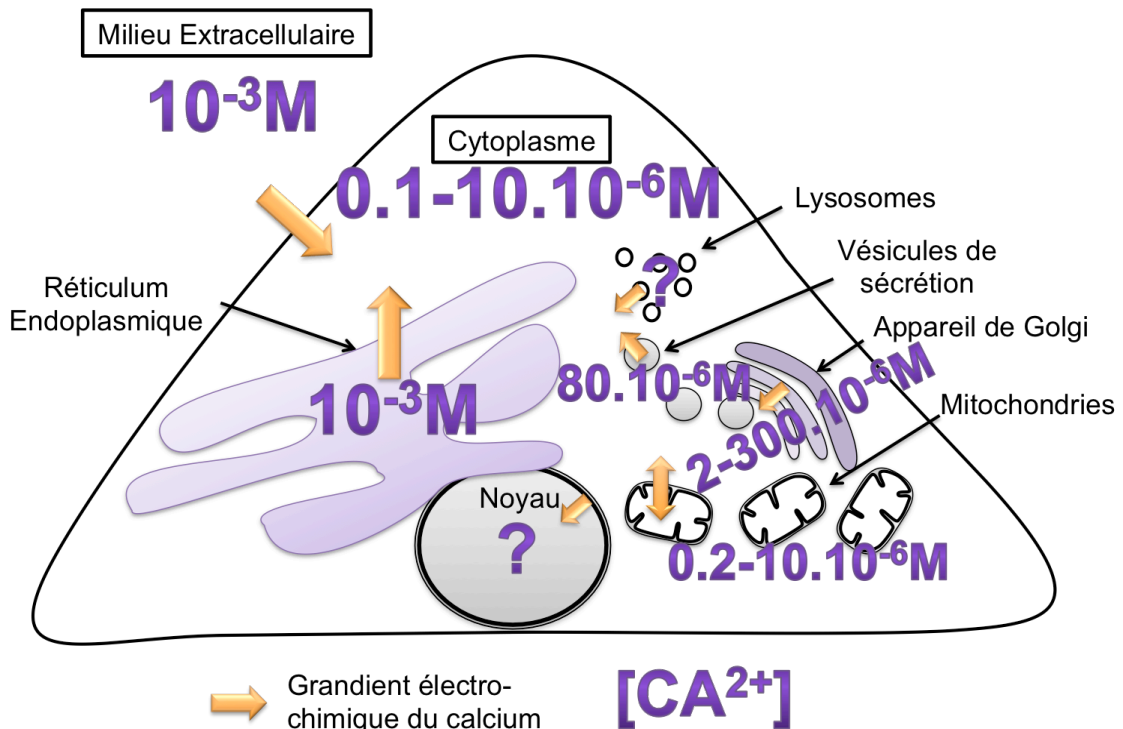


Figure 1: Schéma illustrant les concentrations calciques (en violet) et le gradient électrochimique du calcium (flèche jaune) dans les différents compartiments cellulaires.

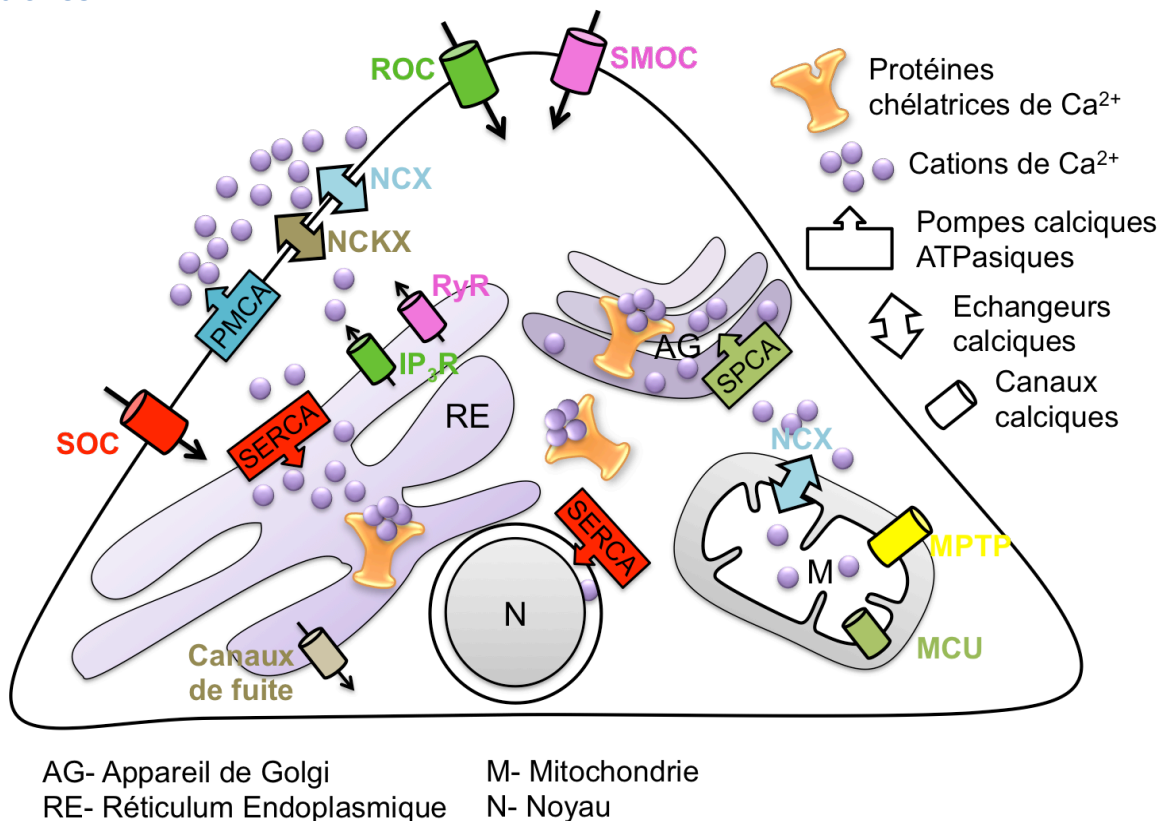


Figure 2: Schéma montrant les différentes protéines, canaux, pompes et échangeurs impliqués dans l'homéostasie et la signalisation calcique des cellules épithéliales non-excitables.

## I. La signalisation calcique dans les cellules non excitables

C'est dans le bouillonnement des étoiles que tous les atomes ont été créés à partir de l'hydrogène. Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) est né de réactions entre l'oxygène et le néon (Burbridge EM et al., 1957). Plus de 13 milliards d'années plus tard, cet ion représente environ 3% de la croûte terrestre et 2% du poids total du corps humain, ce qui en fait le minéral le plus répandu dans l'organisme.

Il intervient dans toutes les étapes de la vie, lors de la fécondation, pour le développement embryonnaire, au cours de la contraction musculaire (battements du cœur), dans la sécrétion d'hormones, dans l'apprentissage, la mémoire, etc... (pour revue voir, Berridge et al., 2003; Berridge, 2009; Mikoshiba, 2007). Le  $\text{Ca}^{2+}$  détermine le devenir des cellules, elles dépensent donc une énergie considérable pour en réguler la concentration cytoplasmique en le stockant dans le réticulum endoplasmique (RE) principalement mais aussi dans l'appareil de Golgi (pour revue voir Pizzo et al., 2011), les mitochondries et le noyau (pour revue voir Michelangeli et al., 2005).

### A. L'homéostasie calcique

Dans le milieu extracellulaire, la concentration de calcium ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ) est de l'ordre du millimolaire (mM), comme dans le RE tandis que dans le cytoplasme le calcium libre oscille entre 0,1 et 10  $\mu\text{M}$ . Il y a donc un gradient de 10 000 fois maintenu par les cellules entre ces différents compartiments. En conditions physiologiques, les mitochondries ont une  $[\text{Ca}^{2+}]$  de moins de 200 nM mais celle-ci peut atteindre 10  $\mu\text{M}$  (Rizzuto et al., 1994; Rutter et al., 1996; Suzuki et al., 2014). L'appareil de Golgi contient en moyenne 130  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$ , de 2 à 300  $\mu\text{M}$  selon la localisation trans-cis (Pinton et al., 1998) et les vésicules de sécrétion 80  $\mu\text{M}$  (Mitchell et al., 2001) (Fig.1). Cependant, de part la nouveauté et la complexité des techniques utilisées, les concentrations calciques dans les organites font encore débat et notamment en ce qui concerne l'enveloppe nucléaire (pour revue voir Gerasimenko and Gerasimenko, 2004). Le développement constant depuis les années 90 de nouvelles techniques de plus en plus précises (pour revue voir Srikanth et al., 2014; Ottolini et al., 2014; Hill et al., 2014) et notamment la création des sondes CEPIA (Calcium-measuring organelle-Entrapped Protein IndicAtoR) (Suzuki et al., 2014) devraient permettre de résoudre cela dans un futur proche.

Le  $\text{Ca}^{2+}$ , bien qu'indispensable, est toxique à forte concentration pour la cellule, (pour revue voir Clapham, 1995; Clapham, 2007). Afin de maintenir le gradient calcique tout en gardant des stocks calciques disponibles, la cellule dispose d'une «boîte à outils» contenant divers types de transporteurs et pompes. Les pompes ATPasiques utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour envoyer le calcium contre son gradient de concentration du cytoplasme vers le RE par les SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases- ATP2A1-3), vers l'appareil de Golgi par les SPCA (Secretory Pathway Calcium ATPase, ATP2C1-2) ou vers le milieu extracellulaire par les PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase- ATP2B1-4). Les échangeurs profitent du flux énergétique d'un autre ion dans le sens de son gradient électrochimique pour compenser celui du calcium.

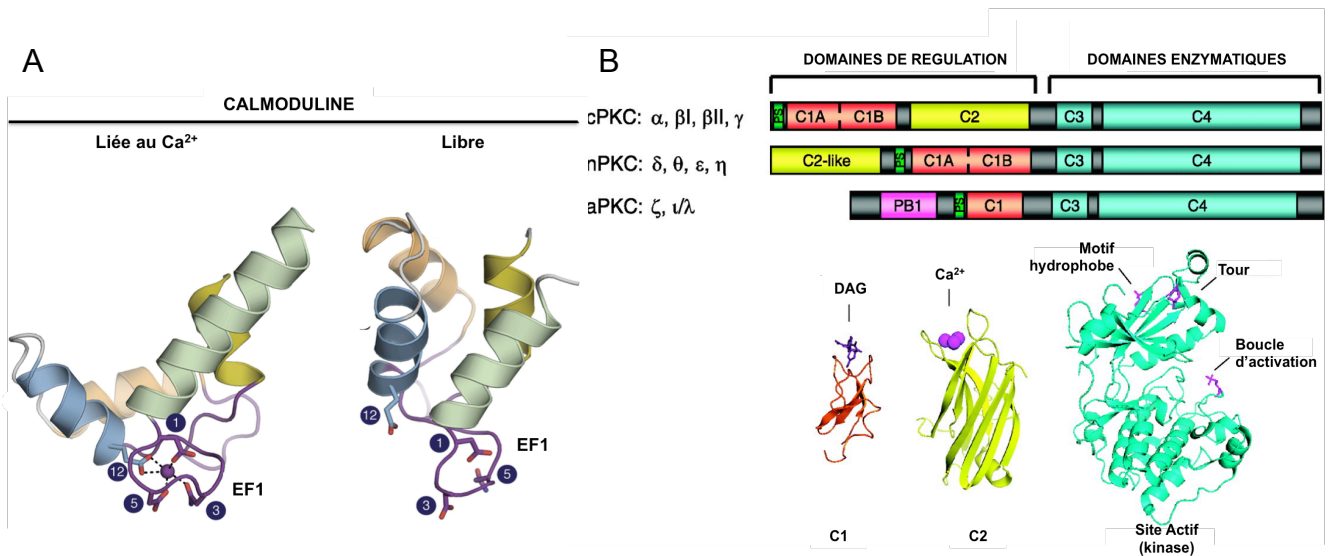


Figure 3: Structure des domaines protéiques de fixation du calcium comme A- le domaine « EF-Hand » de la Calmoduline et B- le domaine C2 des Protéines Kinases C classiques (cPKC) (adaptée de Steinberg et al., 2008).

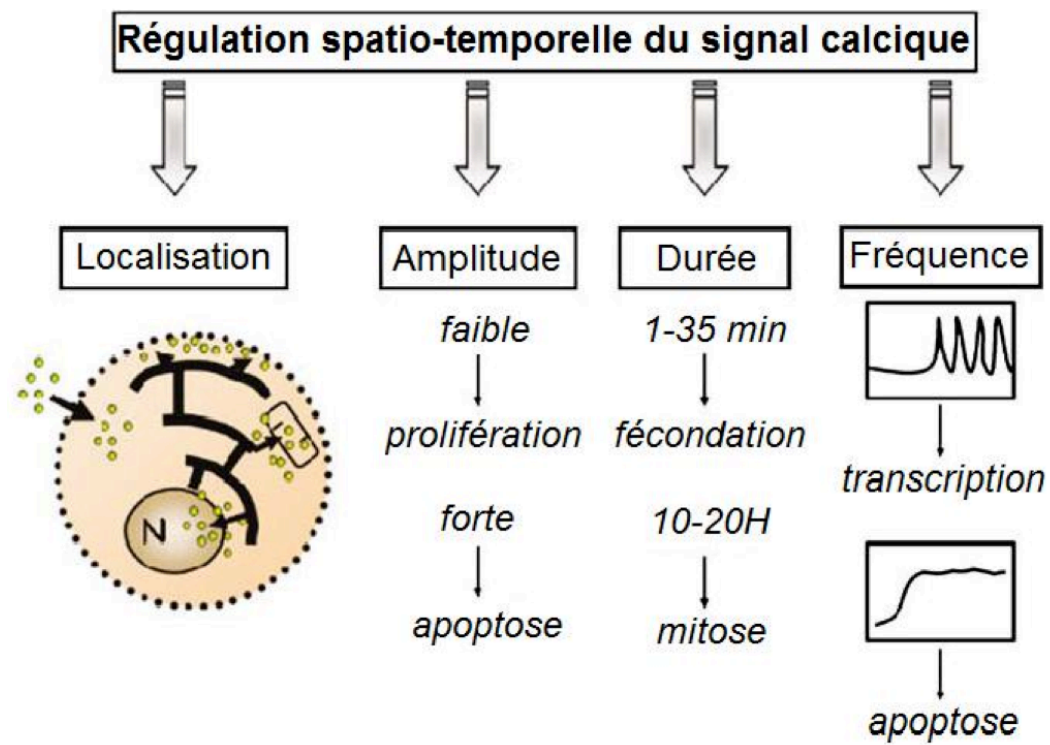


Figure 4: La signalisation calcique détermine l'attitude des cellules par un encodage multiparamétrique selon la localisation intracellulaire, l'amplitude, la durée et la fréquence de variation de la concentration calcique (d'après Prevarskaya et al., 2007).

C'est le cas des échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) ou les  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}-\text{K}^+$  (NCKX) présents à la fois sur la membrane plasmique (MP) mais aussi sur la membrane des organites comme les mitochondries qui interviennent lorsque le calcium cytoplasmique devient trop élevé auquel cas les uniports MCU laissent entrer le calcium qui sera par la suite ré-exporté par l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou le MTPT (mitochondria permeability transition Pore). De plus, la concentration de calcium peut être régulée par la présence de protéines chélatrices comme les calréticuline, calsequestrine, endoplasmine dans le RE, les Cab45, CALNUC, p54/NEFA et caluménine dans l'appareil de Golgi, les parvalbumine, calbindine, calrétinine dans le Cytoplasme (Fig.2) (Scherer et al., 1996; Yabe et al., 1997; Morel-Huau et al., 2002). Certaines protéines chélatrices du calcium sont également impliquées dans les voies de signalisation comme la calmoduline et la calcineurine.

Grâce à ces différentes protéines, la concentration cytosolique d'une cellule reste globalement stable dans le temps et l'espace d'où le terme d'homéostasie calcique.

## B. Les acteurs de la signalisation calcique

L'activité des protéines est modulée par le calcium car elle dépend de leur conformation et de leur charge (Westheimer, 1987; Arrhenius et al., 1997). Le calcium se fixe aux motifs hélice-tour-hélice des domaines « EF hand » présents dans plusieurs centaines de protéines comme la calmoduline (Fig.3.A) et avec plus ou moins d'affinité selon les acides aminés présents. Le calcium se fixe également très bien aux boucles formées par les feuilletts  $\beta$  antiparallèles des domaines C2 de nombreuses protéines transductionnelles comme les Protéines kinases calcium dépendantes classiques (cPKC) (Fig.3.B) (Steinberg, 2008), la kinase du phosphoinositol-triphosphate et les annexines (pour revue voir Yáñez et al., 2012). Ainsi, le calcium est un messenger très puissant dont la variation de concentration intracellulaire appelée « **signature calcique** » est encodée par l'**espace** (dans des microdomaines ou propagée) (Rizzuto and Pozzan, 2006), le **temps** (variations oscillatoires ou soutenues), et l'**intensité** (amplitude de la variation de concentration) (pour revue voir, Dolmetsch et al., 1998; De Koninck and Schulman, 1998; Dolmetsch, 2003). Ainsi, des oscillations calciques de faible amplitude stimulent la prolifération cellulaire en activant des facteurs de transcription comme les NFAT (Thebault et al., 2003; Putney, 2012) tandis qu'une élévation importante et soutenue de calcium induit l'apoptose des cellules saines (Fig.4). Une variation de calcium localisée à un microdomaine peut induire la fusion des complexes SNAREs provoquant l'exocytose des molécules du sécrétome ou une modification locale du cytosquelette (pour revue, voir Berridge, 1998).

Il existe plusieurs familles de canaux intervenant dans la signalisation calcique (Fig2): les canaux présents sur les organites, provoquant des variations locales de calcium, et différentes familles de canaux de la MP: les canaux **SMOC** (Second Messenger-Operated Channels), **ROC** (Receptor-Operated Channels), **SOC** (Store-Operated Channels) et la superfamille des canaux **TRP** (Transient Receptor Potential).

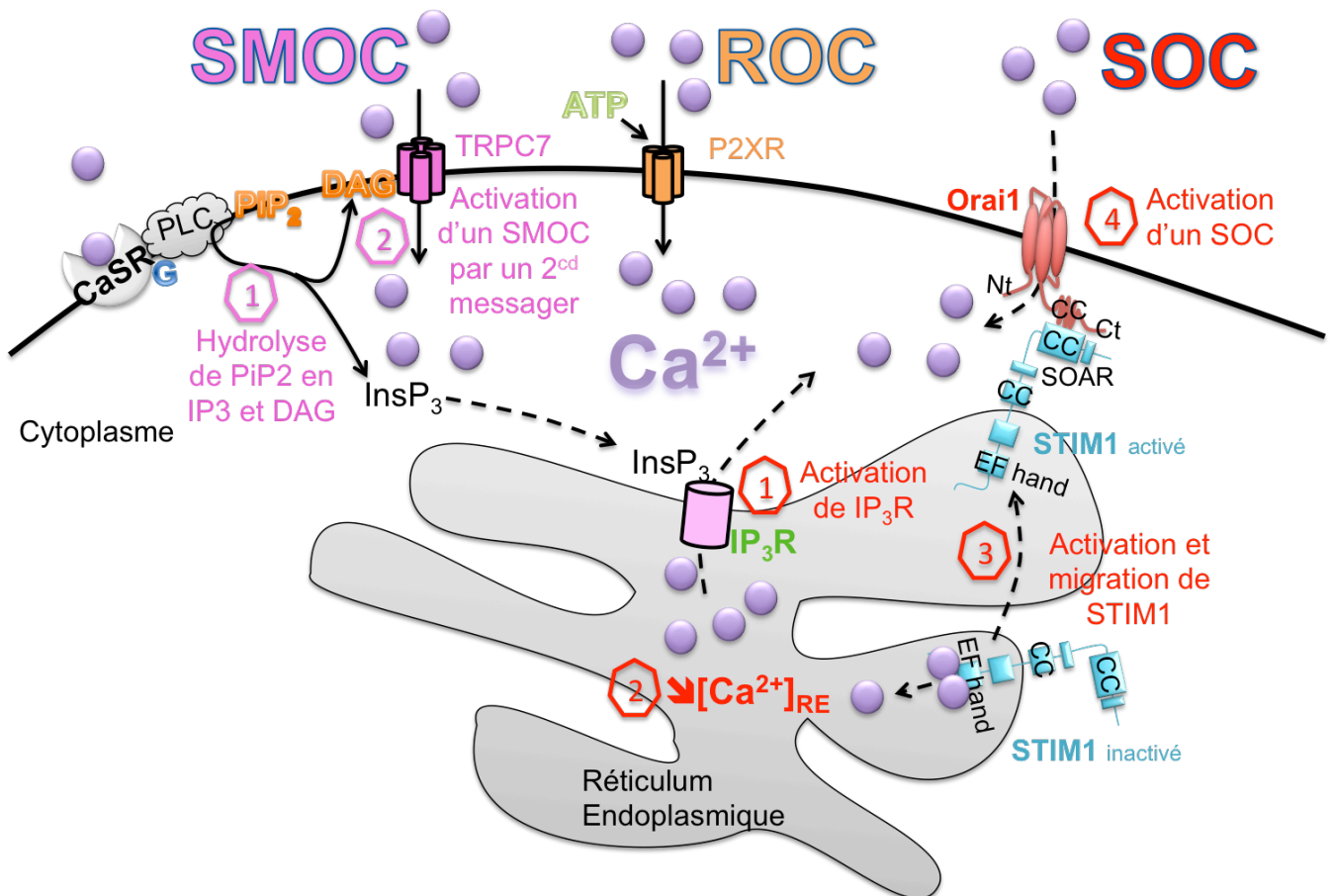


Figure 5: Schéma illustrant par des exemples trois différentes voies d'activation des canaux calciques dans les cellules non-excitables. Les canaux SMOC (Second-Messenger-Operated Channels) sont activés par un second messenger provenant de l'activation d'un autre canal ou récepteur. Les canaux ROC (Receptor-Operated Channels) sont activés directement par fixation d'un ligand spécifique. Les canaux SOC (Store-Operated Channels) sont des canaux membranaires activés suite à une vidange du calcium réticulaire détectée par la protéine STIM1.

## 1. Les canaux calciques des organites

Les **TPC** (Two Pore Channels, TPCN1-2) présents sur les membranes endolysosomales sont responsables de la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytoplasme sous l'effet du NAADP (Zhu MX 2010). Les canaux **RyR** (RyR1-3), activés par la Ryanodine et **IP<sub>3</sub>R** (IP<sub>3</sub>R1-3), activés par l'inositol triphosphate (InsP<sub>3</sub> ou IP<sub>3</sub>) se trouvent sur la membrane du RE. L'insP<sub>3</sub> est un produit cytosolique de l'hydrolyse du lipide membranaire PiP2 par la phospholipase c membranaire (PLC $\gamma$ ). En activant son récepteur, l'IP<sub>3</sub> provoque une libération de calcium réticulaire vers le cytoplasme. Ainsi, les IP<sub>3</sub>R sont responsables de fluctuations de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans le cytoplasme dont la fréquence dépend de leur activation par l'InsP<sub>3</sub> et de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans le RE (Hoth and Penner, 1992). Les canaux RyR sont physiologiquement activés par le calcium cytosolique et, dans quelques systèmes cellulaires, par l'ADP-ribose cyclique ou l'AMPc (Coronado et al., 1994). Les canaux IP<sub>3</sub>R et RyR sont responsables de la vidange Calcium-induced Calcium Release (CICR) impliquée dans des processus tels que la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Zhang et al., 2007).

## 2. Les canaux calciques membranaires

Les canaux **SOC** (Store-Operated Channels) sont activés par la vidange du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE détectée par la protéine de la membrane réticulaire STIM1 possédant des domaines « EF hand » dans le lumen (Fig.5). La diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans le lumen est détectée par STIM1 qui migre vers les points de proximité entre le RE et la MP où il active les canaux SOC, par interaction directe, dont le plus connu est Orai1 (Zhou et al., 2010a). L'activation des canaux SOC provoque une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme permettant de restaurer les stocks réticulaires (pour revue voir Thomas et al., 1996; Frischauf et al., 2008). Orai1 est un canal présent uniquement sur la membrane plasmique qui est constitué de 4 domaines transmembranaires dont les extrémités carboxy- et amino-terminales ( $\text{C}_t$  et  $\text{N}_t$ ) sont dans le cytoplasme. Sa région  $\text{N}_t$  est riche en résidus proline et arginine, son extrémité  $\text{C}_t$  contient un domaine d'interaction protéique « coiled-coil » et la boucle entre les domaines D3 et D4 montre un site de N-glycosylation. Classiquement, le canal Orai1 est fonctionnel sous forme d'un homotétramère dont les domaines D1 de chaque sous-unité constituent le pore du canal extrêmement sélectif pour le  $\text{Ca}^{2+}$  (Zhou et al., 2010b; Prakriya et al., 2006; Maruyama et al., 2009). C'est l'interaction entre la région « coiled-coil » de Orai1 et l'une des deux de STIM1, la région SOAR (STIM1-Orai1 Activating Region), qui provoque l'ouverture du canal (Yuan et al., 2009). Dans les cellules, le couplage entre les SOC et l'IP<sub>3</sub>R provoque des oscillations rapides de calcium dans le cytoplasme activant la voie NFAT impliquée dans la prolifération cellulaire (Lipskaia and Lompré, 2004).

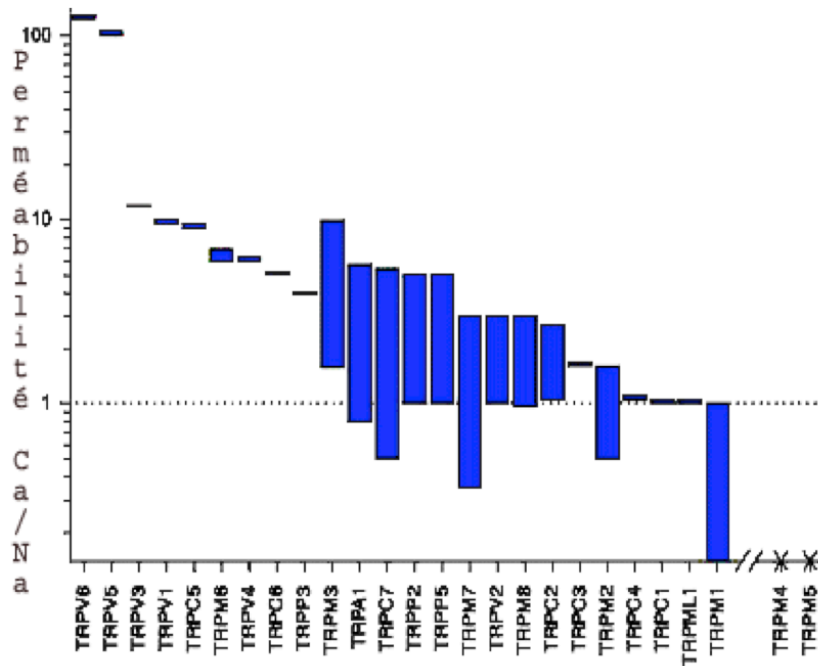


Figure 6: Sélectivité des canaux de la famille des TRP pour le calcium par rapport au sodium, TRPV6 et TRPV5 étant les plus sélectifs pour le calcium (traduit de Gees et al., 2010).

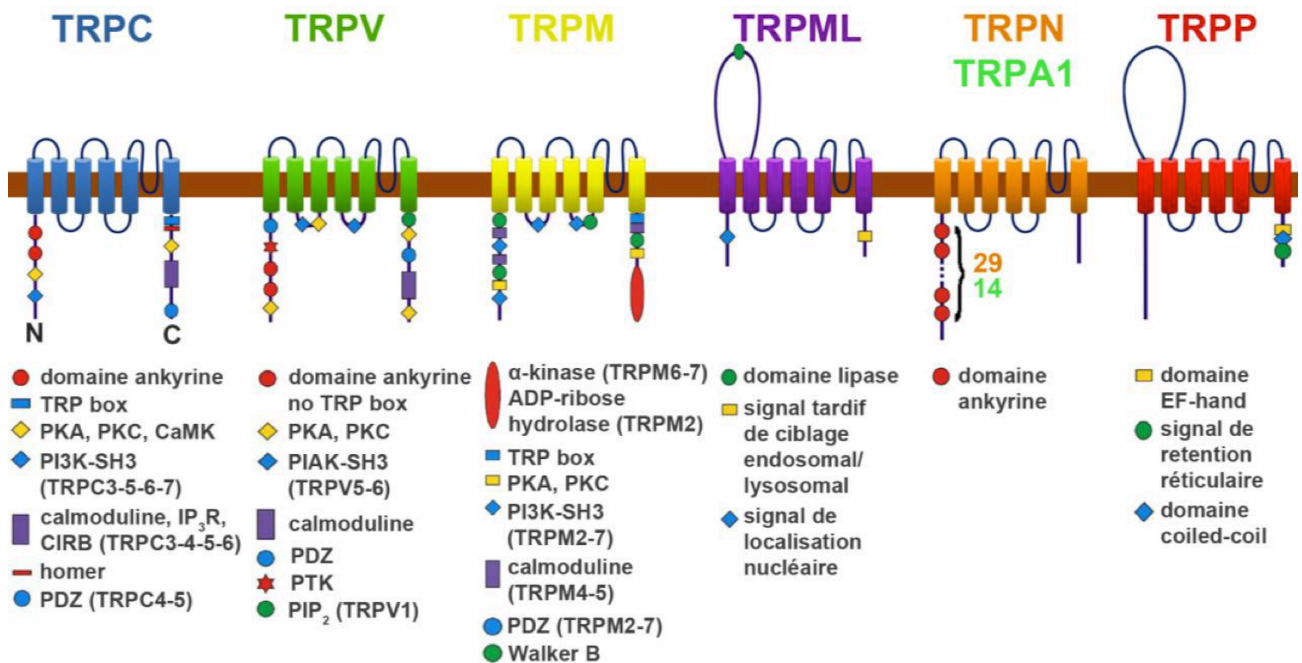


Figure 7: Représentation schématisée de la structure générale des unités monomériques composant les canaux TRP. Celles-ci sont composées de 6 domaines transmembranaires, d'une boucle-P entre les domaines 5 et 6 formant le pore du canal et des extrémités C<sub>t</sub> et N<sub>t</sub> cytoplasmiques contenant les différents domaines de régulation (adapté de Pedersen et al., 2005).

Les **ROC** sont directement activés par un ligand plus ou moins spécifique (Fig.5). Par exemple, les ionophores purinorécepteurs (P2X1-7), fonctionnels en homo- et/ou hétérotrimères (Nicke et al., 1998), sont activés lorsque chaque sous-unité a fixé une molécule d'ATP au niveau de son unique boucle extracellulaire (Ding and Sachs, 1999; Evans, 2009). Ces canaux contiennent tous dans la région  $N_t$  un domaine régulateur phosphorylé par la PKC (Boué-Grabot et al., 2000). Ils sont notamment impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que l'excitabilité cardiaque, la tonicité vasculaire ou encore la nociception (pour revue voir Khakh and Alan North, 2006).

Les canaux **SMOC** sont activés par un second messenger produit suite à l'activation d'un récepteur membranaire par son ligand (Fig.5). Par exemple, l'activation du récepteur de l'EGF ou de récepteur sensible au  $Ca^{2+}$  (Calcium Sensor Receptor, CaSR) provoque l'activation de la PLC $\gamma$  et ainsi la production d'IP $_3$ , à l'origine d'une libération de calcium depuis le RE (pour revue voir Chattopadhyay et al., 1996), et de DAG qui peut activer le canal calcique TRPC7 dans les kératinocytes HaCaT (Beck et al., 2006a).

La superfamille des canaux **TRP** regroupe des canaux cationiques codés par 33 gènes et exprimés sur la MP et/ou sur celle de différents organites. Ce sont des canaux plus ou moins sélectifs pour le calcium (Fig.6) (Gees et al., 2010) activés par différents stimuli, mécaniques, osmotiques, thermiques, parfois par des agonistes (ROC) ou encore par des seconds messagers (SMOC) et peuvent même participer à l'entrée SOCE comme TRPC1 ou TRPC4 (pour revue voir Clapham, 2003; Venkatachalam and Montell, 2007). Ils ont longtemps été étudiés dans la proprioception de par leur sensibilité mécanique et thermique mais il a aussi été montré qu'ils participent à de nombreux autres processus cellulaires. Les canaux TRP sont constitués de 6 segments transmembranaires hydrophobes séparés par de petites boucles hydrophiles. Les extrémités carboxy- et amino-terminales ( $C_t$  et  $N_t$ ) sont cytoplasmiques et possèdent des séquences régulatrices propres à chaque sous famille. La boucle P (P-loop) comprise entre les domaines 5 et 6 forme le pore et procure la sélectivité ionique au canal fonctionnel généralement sous forme d'homotétramère. Les TRP sont divisés en 6 sous familles (Fig.7):

- *TRPC* (1-7) ; pour « Canonique » ou « Classique », en raison de leur forte homologie avec la protéine TRP originelle, photosensible (récepteur à la Rhodopsine) et responsable de la transduction du signal lumineux chez la drosophile. Seul TRPC2 n'est pas exprimé chez l'homme.
- *TRPV* (1-6) ; similaires au premier membre de ce groupe, TRPV1 sensible aux « Vanilloïdes » et à la capsaïcine (extrait du piment) et finalement sensible à la chaleur (>43°C). Les canaux TRPV3 et V4 sont aussi activables par les UVs.
- *TRPM* (1-8) pour « Mélastatine » en référence au premier membre TRPM1 cloné à partir d'une lignée cellulaire murine de mélanome. Ces canaux sont thermosensibles.
- *TRPML* (1-3) ; pour « Mucolipines »



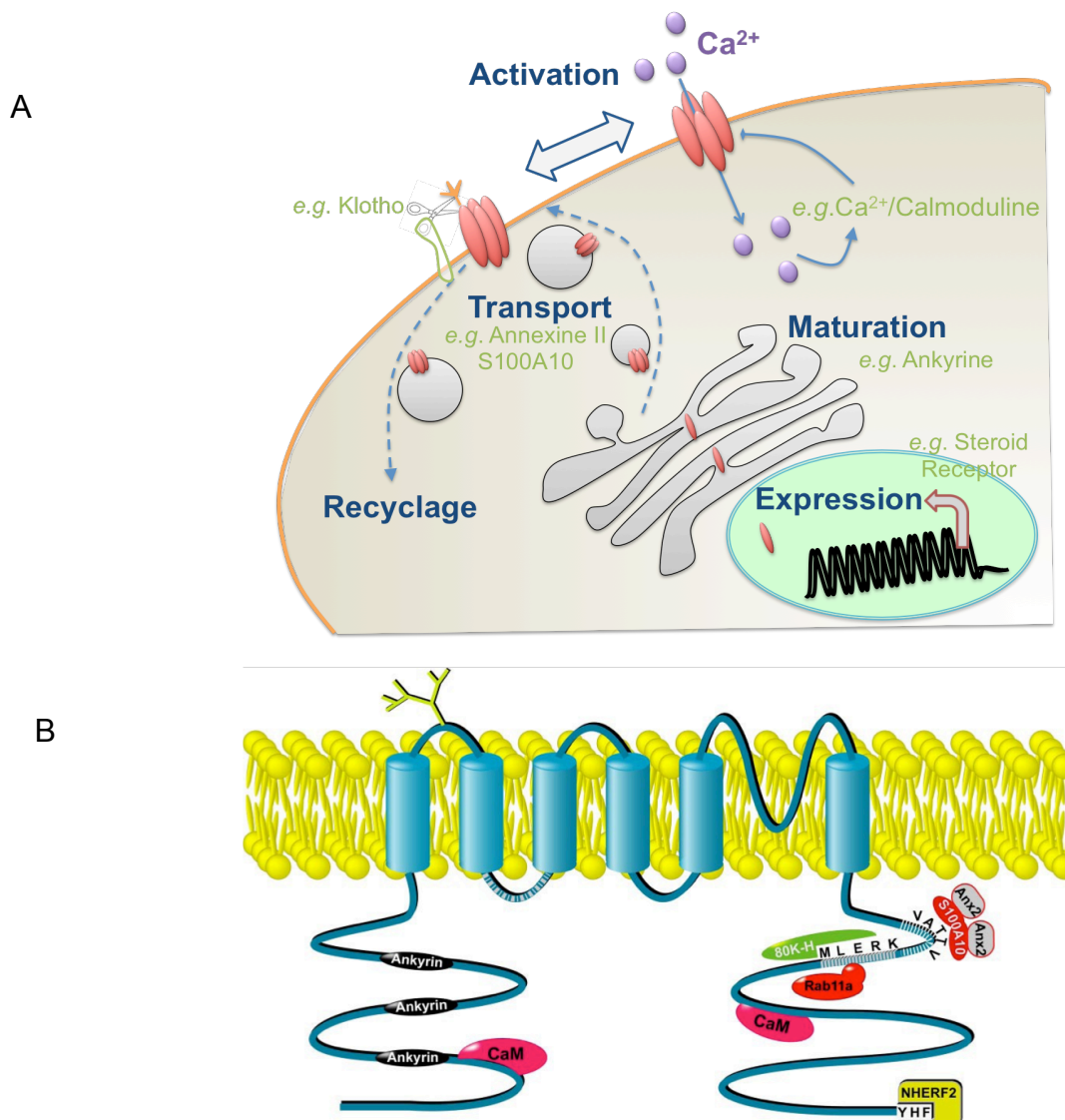


Figure 8: Schéma des différents modes de régulation du canal TRPV6 (A) et de la structure d'une unité monomérique de TRPV5 et 6 avec ses domaines de régulation (B) (Stan FJ et al., 2006).

L'activité des canaux TRP dépend de plusieurs protéines partenaires agissant sur leur expression, leur maturation, leur présence à la membrane plasmique (translocation et recyclage) et la régulation de leur ouverture par des ligands intra- ou extra-cellulaires. Ainsi, l'expression de TRPV6 peut être modulée par la présence d'hormones stéroïdiennes. La formation du canal tétramérique est sous contrôle de l'ankyrine se fixant aux domaines  $N_t$  de TRPV6. Le complexe annexine II (Anx2) S100A10 possédant un domaine de liaison au niveau  $C_t$  de TRPV6 participe à sa translocation à la MP tandis que Rab11a est impliqué dans son internalisation dans des endolysosomes. La N-glycosylation de la boucle extracellulaire entre les deux premiers domaines régule également la présence de TRPV6 à la MP est peut être clivée par la protéine Klotho. La calmoduline et la protéine 80K-H participent à la modulation de l'activité du canal par le calcium. Il n'y a pas de domaine de fixation de NHERF2 sur TRPV6 mais seulement sur TRPV5.

- *TRPP* (1-5) ; issus de deux gènes *polycystic kidney diseases 1* (*PDK1* pour *TRPP1*) et 2 (*PDK2* pour *TRPP2*).
- *TRPA1* est un membre unique un peu à part de la famille des TRP qui est sensible à la chaleur.

L'implication de ces canaux dans les cellules épithéliales saines et cancéreuses sera largement développée tout au long de cette thèse et plus particulièrement pour le canal TRPV6 qui fut cloné pour la première fois à partir d'une protéine de transport calcique (CaT1) dans le duodenum de rat (Peng et al., 1999). Celui-ci est principalement exprimé dans les épithelia impliqués dans le transport du  $\text{Ca}^{2+}$  et joue un rôle très important dans la (ré)absorption du calcium par l'intestin et les reins (den Dekker et al., 2003). Avec TRPV5, TRPV6 est en effet le canal de la famille des TRP le plus sélectif pour le calcium avec un rapport  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  supérieur à 100 (Fig.6). Pour le moment ce canal n'a été montré fonctionnel que dans la membrane plasmique (van de Graaf et al., 2003a) où il est constitutivement actif à des  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracellulaires basses et des potentiels membranaires physiologiques (Vennekens et al., 2000). Cependant, l'activité biologique de ce canal peut être contrôlée par 4 mécanismes (Fig.8.A): 1- l'expression de TRPV6 est régulée par les hormones calcitropes comme la vitamine D (Nijenhuis et al., 2003; Walters et al., 2004; Taparia et al., 2006) ; 2- le transport de TRPV6 à la membrane plasmique est crucial pour y exercer son activité biologique (Wolf et al., 2013); 3- l'activité de TRPV6 à la MP est soumise au pH et à des mécanismes dépendant du calcium; 4- le maintien ou le recyclage du canal est aussi régulé par des protéines associées (Sopjani et al., 2010). En effet, au niveau de l'extrémité  $\text{N}_t$ , TRPV6 contient des domaines ankyrines (Fig.8.B) nécessaires à l'assemblage du canal en tétramères (Erlor et al., 2004). De plus, il existe plusieurs protéines régulatrices de TRPV6 comme les annexines, la calmoduline, la protéine 80K-H et Rab11a (van de Graaf et al., 2003a). Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline exerce une rétro-action négative sur l'activité du canal (Voets et al., 2004). Le complexe annexine II/S100A10, déjà impliqué dans les processus d'exocytose, d'endocytose et d'interaction avec le cytosquelette, a été impliqué dans la translocation de TRPV6 à la membrane plasmique (van de Graaf et al., 2003a). Il a également été montré que la N-Glycosylation de la boucle extracellulaire entre les domaines D1 et D2 joue un rôle déterminant dans le repliement fonctionnel de TRPV6, son trafic intracellulaire ainsi que sur son activité (Helenius and Aebi, 2001). Ce canal reste encore méconnu quant à son rôle dans d'autres tissus sains mais a été détecté dans les cancers hormono-dépendants de la prostate et du sein (pour revue voir Stan FJ et al., 2006 et Fecher-Trost et al., 2014).

Les canaux de cette famille attirent de plus en plus l'attention, d'autant plus que de nombreuses études ont définitivement établi la contribution des canaux ioniques dans les comportements cellulaires impliqués dans la régulation de l'homéostasie tissulaire (pour revue voir, Lang et al., 2005; Shapovalov et al., 2011).

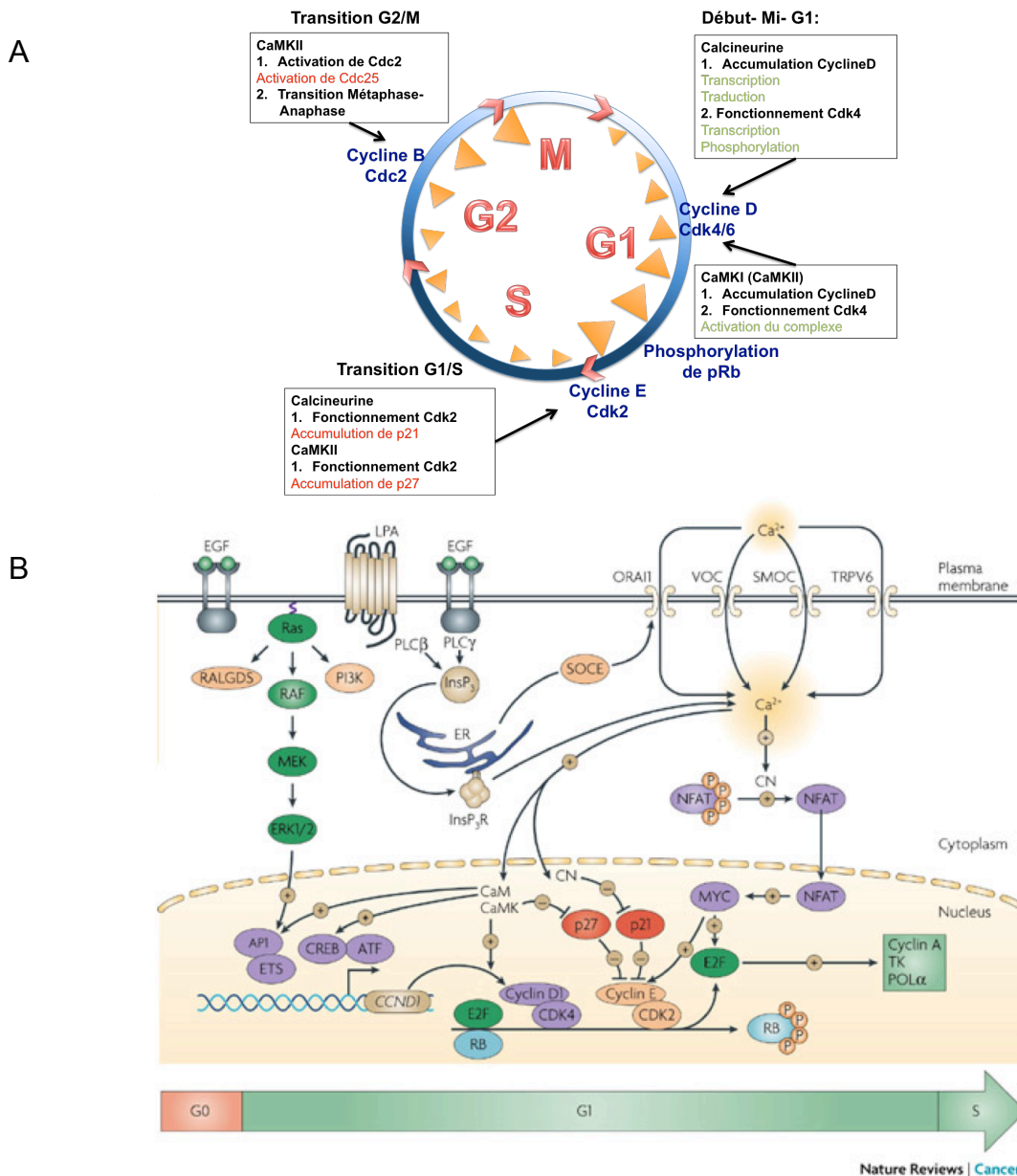


Figure 9: Représentation schématisée de la variation de la concentration de calcium (triangles oranges) au cours du cycle cellulaire (A) ainsi que des voies de signalisation modulées par le calcium au cours de la transition G1/S (B) (Roderick and Cook, 2008). Le  $\text{Ca}^{2+}$  intervient dans plusieurs étapes du cycle cellulaire en modulant l'activité des  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline kinases (CaMK) et de la calcineurine (CN). Dans la phase  $G_1$ , l'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'activation de différents récepteurs membranaires (EGFR, LPAR) et/ou réticulaires ( $\text{InsP}_3\text{R}$ ) favorise l'expression et l'activation (par phosphorylation) du complexe cyclineD-cdk4 en passant par plusieurs voies de signalisation. En effet, l'activation de la calmoduline (CaM), de la voie des MAPK ou de la CaMK induit l'expression du gène codant la cycline D1 via des facteurs AP1 et en agissant sur une séquence de type CRE. L'activation de la CN suite à la mobilisation de  $\text{Ca}^{2+}$  active la voie NFAT impliquée dans l'expression du facteur de transcription Myc, d'élongation E2F et de la cycline E. Enfin, l'inhibition des protéines p21 et 27 requiert l'activation des CaMK et CN. Ces mécanismes participent à la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome RB indispensable à la progression de la phase  $G_1$  et à la transition  $G_1/S$ . Le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique diminue au cours de la phase S pour réaugmenter lors de la transition  $G_2/M$ . Il y participe en activant la cdc2 via la CaMKII et en régulant la polymérisation du cytosquelette lors de la transition métaphase-anaphase.

## C. Le calcium dans les processus cellulaires

### 1. Importance du Calcium dans le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en 4 étapes successives et non rétrogrades, deux phases de croissance G1 et G2 séparées par une phase S de réplication de l'ADN puis, après G2, la mitose M au cours de laquelle la cellule mère se divise en deux cellules filles identiques. Les cellules peuvent arrêter momentanément de proliférer en entrant dans la phase de quiescence dite G0 puis reprendre ou non le cycle de division. La progression du cycle cellulaire et la transition d'une phase à l'autre est sous contrôle des complexes cycline/cdk (cycline-dependent kinases) qui, elles mêmes, peuvent être modulées par la concentration de calcium. En effet, la stimulation de cellules quiescentes par des facteurs de croissance comme l'EGF et leur entrée en phase G1 provoquent une mobilisation rapide de  $\text{Ca}^{2+}$  extra- et intracellulaire. De plus, dans les cellules mammifères, une baisse de calcium extracellulaire de 1 mM à 0,1 mM entraîne une réduction progressive du taux de prolifération avec accumulation des cellules en phase G1. L'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  est également indispensable lors de la transition G1/S où la concentration calcique augmente progressivement pour l'initiation de la réplication puis, lors de la phase S, la concentration de calcium diminue progressivement pour ré-augmenter en phase G2, surtout en transition G2/M, et lors de la mitose où le calcium participe à la formation des kinétochores, favorise le remodelage du cytosquelette en anaphase et ainsi, la séparation des chromatides et la cytodivision (Pande et al., 1996) (Fig.9.A). Les mécanismes exacts par lesquels le calcium régule le cycle cellulaire sont encore équivoques mais de nombreuses études ont montré que la calmoduline (via les CamKinasés) et la calcineurine (calcium-dependent phosphatase) y ont un rôle essentiel (pour revue, voir Takuwa et al., 1995). Par exemple, lors de la transition G1/S (Fig.9.B), l'augmentation de calcium intracellulaire active la calcineurine et la translocation du NFAT dans le noyau où il régule l'expression des facteurs de transcription AP1, cFos, cMyc, cJun, qui régulent à leur tour l'expression des cyclines requises à la formation des complexes cyclines/cdk (voir la revue de Roderick and Cook, 2008). Selon Yap KL et ses collaborateurs, la plupart des cyclines et cdk ont un motif putatif de liaison à la calmoduline même si pour le moment cela n'a été prouvé que pour la cycline E2 et des protéines régulatrices des cdk, les p21 et p16 (Yap et al., 2000). Plus tard dans la phase G1, le  $\text{Ca}^{2+}$  joue un rôle important dans l'activation des complexes cyclineD/cdk4 et cyclineE/cdk2 nécessaires à la phosphorylation inactivatrice du rétinoblastome (pRb) à l'origine de la transition en phase S (Takuwa et al., 1993; pour revue, voir Cook and Lockyer, 2006).

De même la Calmoduline joue un rôle crucial au cours de la dynamique des microtubules lors de la mitose (Weisenberg, 1972; pour revue voir Whitaker and Larman, 2001) et la déphosphorylation en T<sup>253</sup> de la CAMKII $\alpha$  par la protéine phosphatase 2A favorise le passage de la métaphase à l'anaphase (Hoffman et al., 2014).

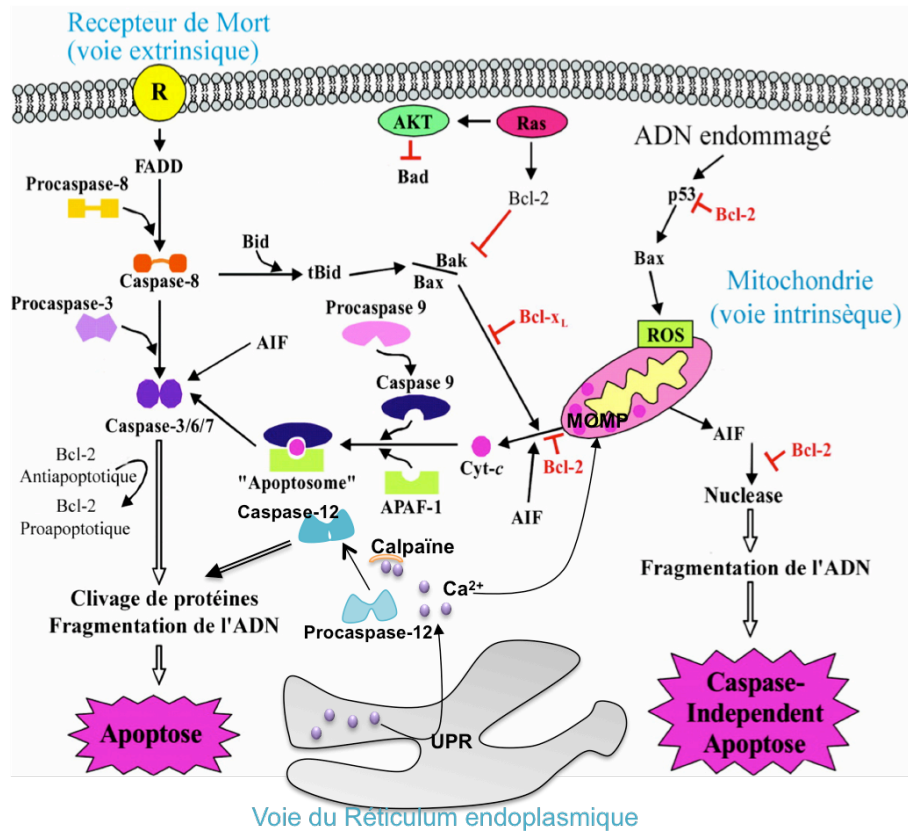


Figure 10: Schéma représentant les voies apoptotiques extrinsèque (via les récepteurs de mort) et intrinsèques mitochondriale ou réticulaire (d'après Remillard & Yuan, 2004).

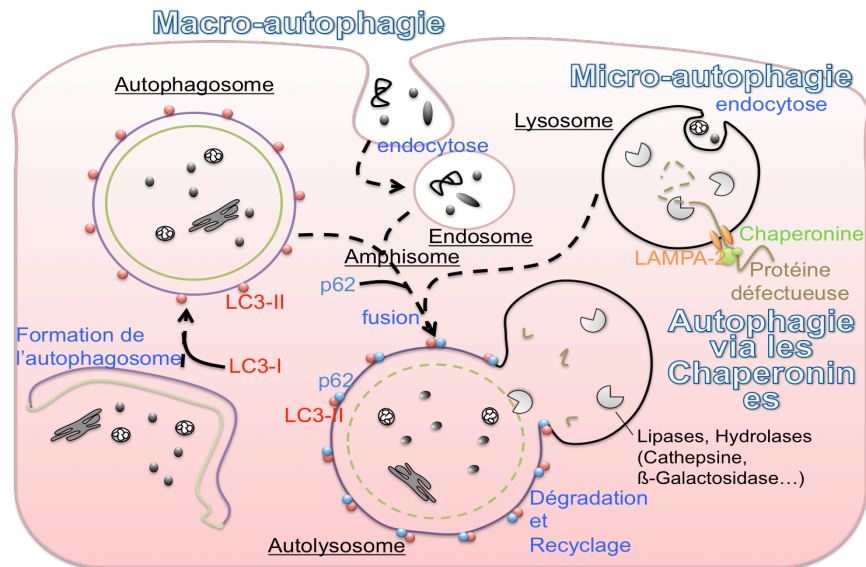


Figure 11: Schéma illustrant la formation des vésicules autophagiques. La macro-autophagie met en jeu la formation d'autophagosomes contenant les « gros » déchets intracellulaires ou des endosomes issus de l'endocytose de déchets extracellulaires pouvant fusionner ensemble pour former des amphisomes et/ou directement avec un lysosome apportant alors les enzymes de dégradation. La microautophagie permet la dégradation des organites directement endocytés par un lysosome ou des protéines intégrées dans le lysosome via les chaperonines et LAMPA2.

## 2. Importance du calcium dans l'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique assurant l'élimination des « vieilles » cellules ou bien des cellules qui, quel qu'en soit la raison, ne parviennent plus à assurer leurs fonctions physiologiques et, par conséquent, deviennent inutiles. C'est en 1972 que Kerr décrit la mort programmée des cellules en observant des caractéristiques morphologiques bien spécifiques (Kerr et al., 1972) telles que le bourgeonnement de la surface membranaire, la condensation de la chromatine, la fragmentation régulière de l'ADN (180 pb), le maintien de l'intégrité des organelles et, finalement, la phagocytose de la cellule morte. Il est connu que les événements précoces et principaux de l'apoptose sont directement liés à la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE et à la libération du cytochrome c par la mitochondrie (Scorrano et al., 2003). Indépendamment des stimuli induisant l'apoptose, l'influx létal de calcium est une condition *sine qua non* à l'induction de l'apoptose. De plus, il a déjà été démontré que l'apoptose dépendante du calcium peut passer par trois voies principales: mitochondriale, cytoplasmique et réticulaire (pour revues, voir Norberg et al., 2008; Pinton et al., 2008; Prevarskaya et al., 2004). Deux voies d'induction de l'apoptose peuvent alors être engagées: la **voie extrinsèque** et la **voie intrinsèque** (Fig.10).

**La voie extrinsèque** est une voie cytoplasmique qui met en jeu l'activation des récepteurs membranaires de mort tels que Fas, (Ashkenazi and Dixit, 1998) qui active la procaspase-8 (Kischkel et al., 1995) par clivage qui, elle-même, active la caspase effectrice 3 menant à l'exécution de l'apoptose. Dans d'autres types cellulaires, l'activation des caspases effectrices par Fas dépend d'une boucle d'amplification provoquant l'activation de Bid, protéine de la famille des Bcl-2 pro-apoptotique, par la caspase-8 provoquant l'apoptose par la voie intrinsèque (Luo et al., 1998; Muzio et al., 1998) (Fig.8).

**La voie intrinsèque** met principalement en jeu la mitochondrie et le RE (Fig.8). La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP) peut être induite par l'influx excessif de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la mitochondrie et assure la libération irréversible des facteurs apoptogènes que sont le cytochrome c, les caspases 2, 3 et 9, l'AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G (Von Ahsen et al., 2000) initiant la phase de dégradation. Le MOMP peut aussi être induit par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou par p53 interagissant avec les protéines homologues de Bcl-2 (Cory and Adams, 2002). L'apoptosome, formé par le complexe cytochrome c/APAF1, recrute et active la pro caspase-9 (Li et al., 1997). Ce complexe active les caspases effectrices à l'origine de l'exécution de l'apoptose. L'AIF et l'endonucléase-G induisent la dégradation par une voie indépendante des caspases dans les cellules cancéreuses prostatiques (Liu et al., 2011). Le RE peut également initier l'apoptose par deux moyens, la réponse UPR (Unfolded Protein Response) et la signalisation calcique (Kaufman, 1999). L'UPR est déclenchée par l'accumulation de protéines conformationnellement défectueuses dans le RE granuleux provoquant la sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire (Oakes et al., 2005). Cette libération de calcium peut provoquer la MOMP et initier la voie intrinsèque de l'apoptose (Szalai et al., 1999).

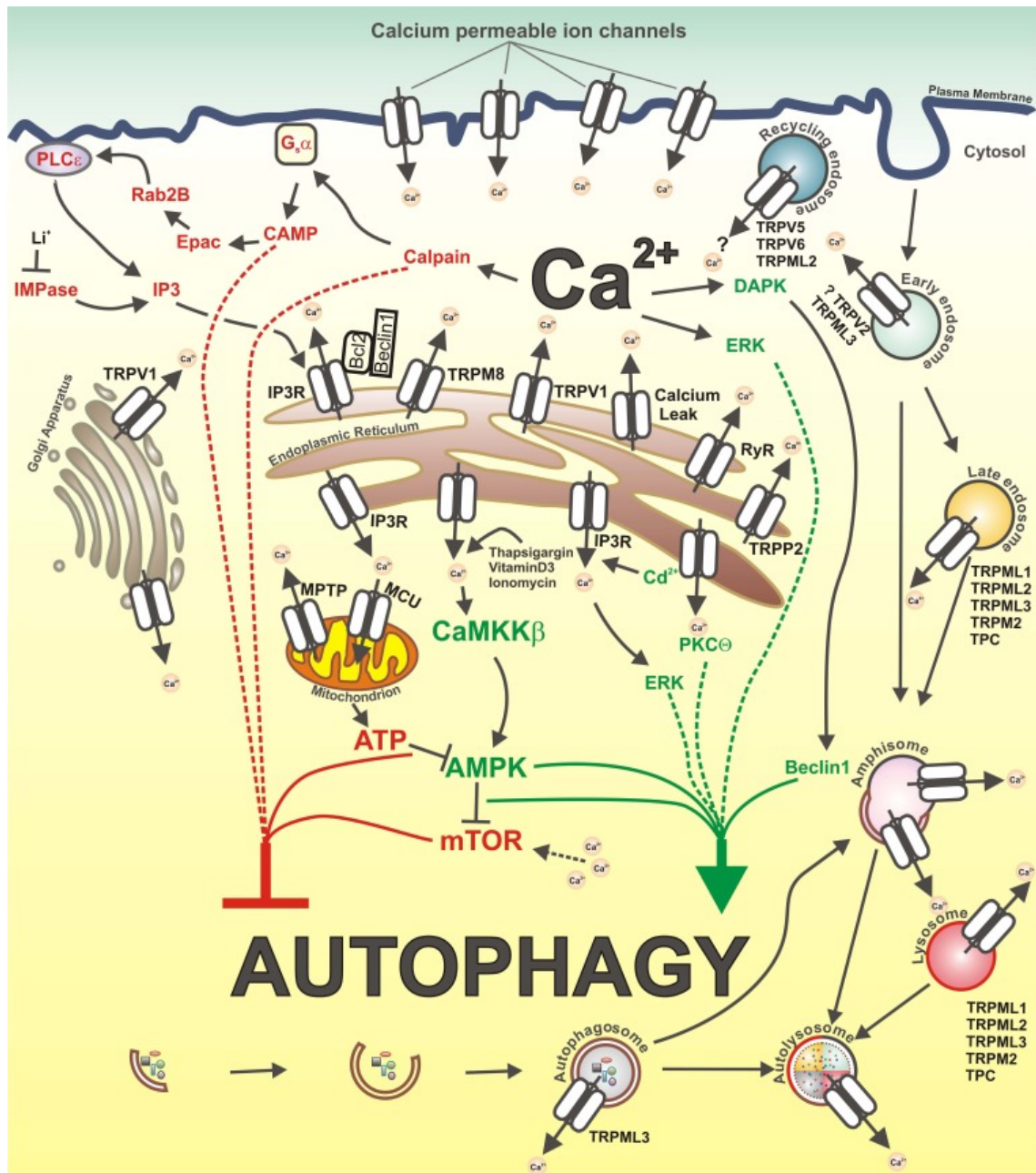


Figure 12: Implication du calcium et des canaux TRP dans l'autophagie (Kondratsky A. et al., 2013). Le calcium et les canaux perméables au calcium peuvent avoir des effets inducteurs et/ou inhibiteurs de l'autophagie selon la voie empruntée (activatrices en vert et inhibitrices en rouge). Ainsi, de nombreux canaux TRP, et principalement les TRPM et TRPML, ont été mis en évidence dans la modulation des voies de transduction de l'autophagie et dans l'acidification des vésicules autophagiques nécessaire à la dégradation des déchets cellulaires. Aussi, le RE et les mitochondries ont un rôle déterminant dans la régulation de l'autophagie. En effet, une libération modérée de calcium depuis le RE et tamponnée par les mitochondries sera à l'origine d'une production d'ATP et d'une inhibition de l'autophagie, tandis qu'un efflux calcique plus conséquent par les IP3R dû à un stress réticulaire ou à l'utilisation d'agents pharmacologiques (Thapsigargine, Ionomycine,...) sera plutôt pro-autophagique.

La pro-caspase 12 est une caspase spécifique au RE qui peut être activée suite à l'UPR (Yoneda et al., 2001) ou par clivage via la calpaine (Nakagawa and Yuan, 2000) elle-même activée par l'augmentation de calcium cytoplasmique. De plus, il a été montré qu'une diminution du stock calcique dans le RE provoque une résistance à l'apoptose (Jiang et al., 1994; Lam et al., 1994; pour revue, voir Rizzuto et al., 2003; Pinton and Rizzuto, 2006).

### 3. Le calcium dans l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme cellulaire du catabolisme impliqué dans la dégradation d'agrégats protéiques, des vieilles protéines et des organelles défectueux permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire (Ravikumar et al., 2010; Chen and Klionsky, 2011). Il y a donc toujours un peu d'autophagie dans les cellules et celle-ci est amplifiée par des stress tels qu'une restriction alimentaire, une hypoxie, un stress réticulaire, oxydatif ou encore l'endommagement des mitochondries causés notamment par des agents pharmacologiques (Kroemer et al., 2010). Il existe trois types d'autophagie (Fig.11): la macro-autophagie, la microautophagie et l'autophagie via les chaperonines. La macroautophagie permet la dégradation d'organites intracellulaires séquestrés dans des autophagosomes (discriminés par la protéine LC3-II sur la membranes externe) ou des débris extracellulaires endocytés dans des endosomes. Ces deux types de vésicules peuvent fusionner, grâce à la protéine p62 ou sequestosome (SQSTM1), et former des Amphisomes ou fusionner chacune avec des lysosomes acides contenant les hydrolases (Cathepsines,  $\beta$ -galactosidases...), ce qui permettra de digérer et recycler les « déchets ». La microautophagie permet de dégrader directement des débris cellulaires par endocytose dans les lysosomes. L'autophagie via les chaperonines permet l'insertion directe dans les lysosomes (via LAMP2A) des protéines défectueuses prises en charge et conduites par les chaperonines (Mizushima et al., 2008; Klionsky, 2005). La première étude montrant une régulation de l'autophagie par le calcium a été publiée en 1993 (Gordon et al., 1993). Cependant, les travaux sur le sujet depuis montrent que le calcium peut être à la fois activateur et inhibiteur de l'autophagie (Fig.12) selon les paramètres du signal calcique, la voie empruntée et le système étudié, à savoir notamment les conditions nutritionnelles et d'hypoxie, ainsi que le type cellulaire sain ou cancéreux. En effet, certaines équipes ont mis en évidence que le  $Ca^{2+}$  ou des agents mobilisant le calcium (ATP, Vitamine D, Thapsigargine ou Ionomycine) activent l'autophagie par la voie CAMKK $\beta$  (Høyer-Hansen et al., 2007), Becline1 (Gao et al., 2008) par l'intermédiaire de la DAPK (Death Associated Protein Kinase), une kinase dépendante de la CamK (Zalckvar et al., 2009a; Zalckvar et al., 2009b), ou encore par la PKC $\delta$  dans le cas de l'autophagie induite par un stress réticulaire (Sakaki et al., 2008). Au contraire, il a aussi été montré que le calcium peut inhiber l'autophagie et notamment lorsque celui-ci est libéré du RE par l'IP $_3$ R (pour revue, voir Parys et al., 2012). Il existe donc plusieurs voies de régulation de l'autophagie mettant en jeu notamment mTOR et les voies PI $_3$ K/AKT ou les MAPK et impliquant le calcium et les canaux calciques en de nombreuses étapes (pour revue, voir Feng et al., 2014 et Kondratskyi et al., 2013).



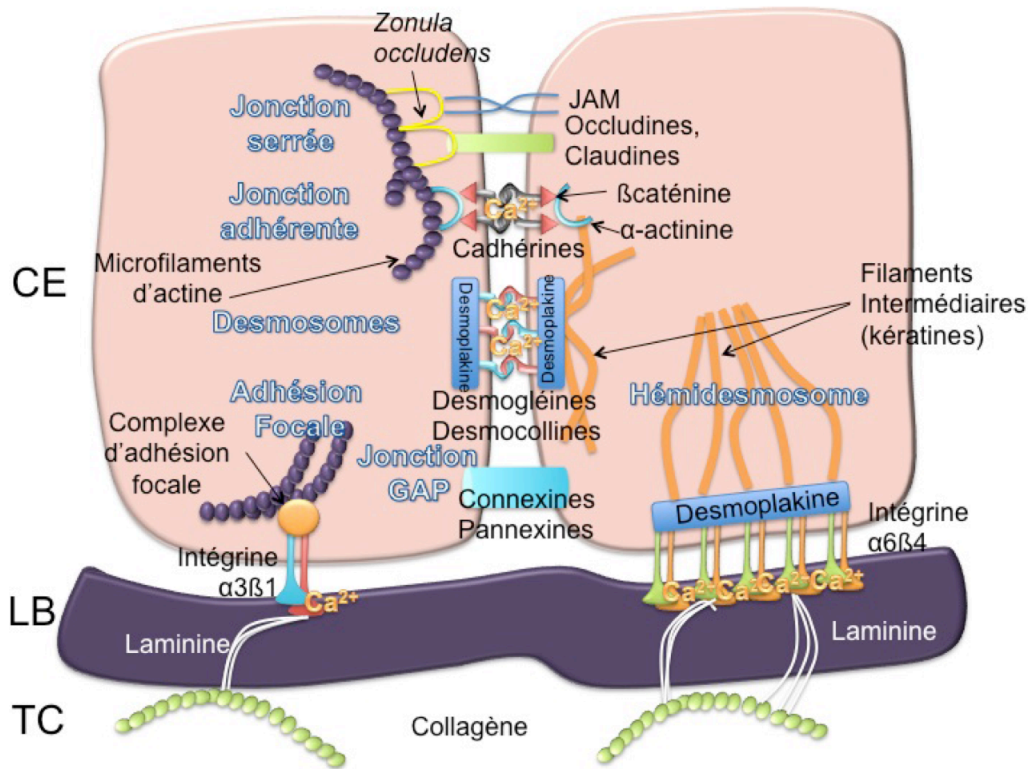


Figure 13: Le calcium intervient dans la l'adhésion des cellules à la lame basale (adhésion focale et hémidesmosome) ou des cellules entre elles (jonction adhérente et desmosomes).

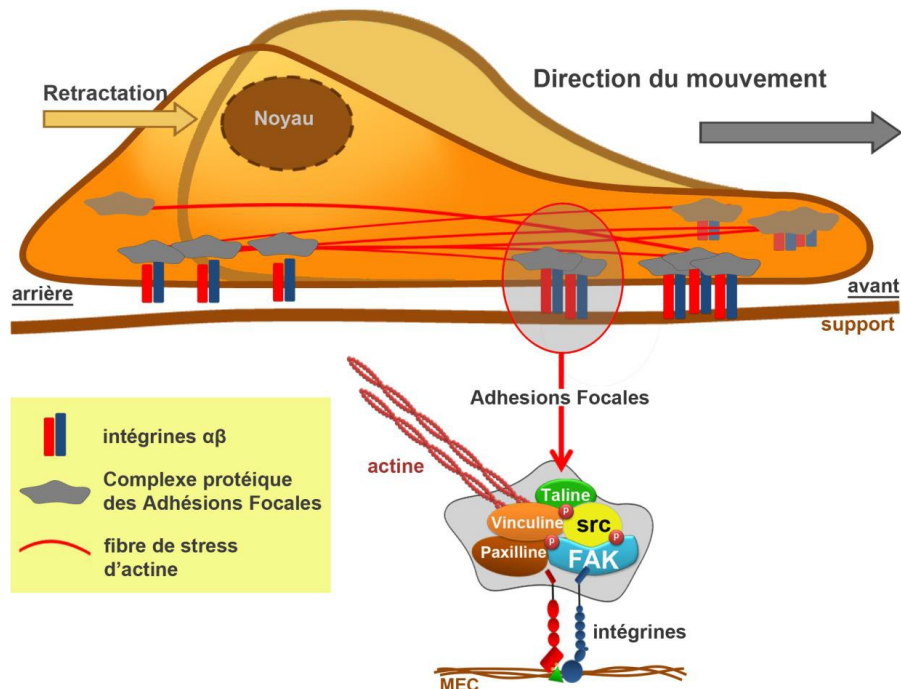


Figure 14: Mise en jeu du recyclage des adhésions focales dans la migration polarisée des cellules épithéliales. (Issu de la thèse de Vandenberghe M., 2011).

## 4. Importance du calcium dans l'adhésion et la motilité cellulaire

Les cellules épithéliales sont bien organisées et cohésives au sein d'un tissu et le calcium joue un rôle crucial dans la dynamique de ces cellules (Clapham, 2007). Elles sont attachées par deux types de protéines d'adhésion (Fig.13): Les **SAM** (Substrate Adhesion Molecule), assurant l'adhésion des cellules à la lame basale (hémidesmosomes et Adhésion Focales), et les **CAM** (Cell Adhesion Molecules), assurant l'adhésion des cellules entre elles (jonctions serrées, ceinture d'adhérence, desmosomes et jonctions communicantes). La ceinture d'adhérence et les desmosomes sont assurés par les cadhérines (glycoprotéines transmembranaires) qui s'associent entre elles dans l'espace intercellulaire au niveau de leur domaine  $C_t$ , grâce à la fixation d'ions  $Ca^{2+}$ , et sont liées aux filaments d'actine via les caténines ( $\alpha$  et  $\beta$ ), pour les jonctions adhérentes, et aux filaments intermédiaires, comme les cytokératines, via les plaques protéiques desmosomales pour les desmosomes. Les hémidesmosomes et les adhésions focales (FA: Focal Adhesion) mettent toutes deux en jeu les intégrines qui relient les glycoprotéines de structure de la lame basale comme les laminines respectivement aux filaments intermédiaires du cytosquelette via les plectrines, ou aux filaments d'actine par un complexe protéique d'adhésion focale (taline, vinculine, etc...) (pour revue, voir Bosman, 1993; Jamora and Fuchs, 2002). De plus, tout comme les cadhérines, les intégrines sont sensibles au calcium qui se fixe à leurs domaines « EF-hand » extracellulaires. L'adhérence des cellules entre elles et sur la lame basale est donc dépendante du calcium et une diminution du calcium extracellulaire en ajoutant des chélateurs tels que l'EDTA ou l'EGTA provoque le détachement des cellules adhérentes *in vitro*. Or, les intégrines sont impliquées dans les voies de survie cellulaire et de prolifération (AKT, Erk1/2) c'est pourquoi la perte d'adhésion des cellules épithéliales adhérentes induite par une diminution d'expression des intégrines par exemple, provoque l'arrêt de prolifération puis la mort cellulaire appelée dans ce cas, anoïkis (pour revue voir, Stupack and Cheresch, 2002 et Chiarugi and Giannoni, 2008).

La migration des cellules épithéliales est permise par formation de nouvelles adhésions focales dans le pseudopode (protrusion) et par désassemblage des FA à l'autre extrémité (rétraction) (Fig.14) (pour revue, voir Kirfel et al., 2004). Ce renouvellement des FA est principalement permis par l'une des protéines du complexe d'adhésion focale, la FAK (Focal Adhesion Kinase) qui, lorsqu'elle est phosphorylée en  $Y^{397}$  (autophosphorylation) permet de faire le lien entre les intégrines, les autres protéines du complexe de FA et l'actine tandis que lorsqu'elle est clivée le complexe se désassemble (Sieg et al., 1999; Wozniak et al., 2004; Cornillon et al., 2003). Il a été montré qu'une augmentation cytoplasmique de  $Ca^{2+}$  provoque la dissociation des adhésions focales en activant la dégradation de FAK par la calpaïne, une sérine-protéase dépendante du  $Ca^{2+}$ , tandis que des oscillations locales de  $Ca^{2+}$  favorisent l'autophosphorylation de FAK en  $Y^{397}$  et, par conséquent, prolonge l'association du complexe d'adhésion focale (Huttenlocher et al., 1997; Chan et al., 2010).

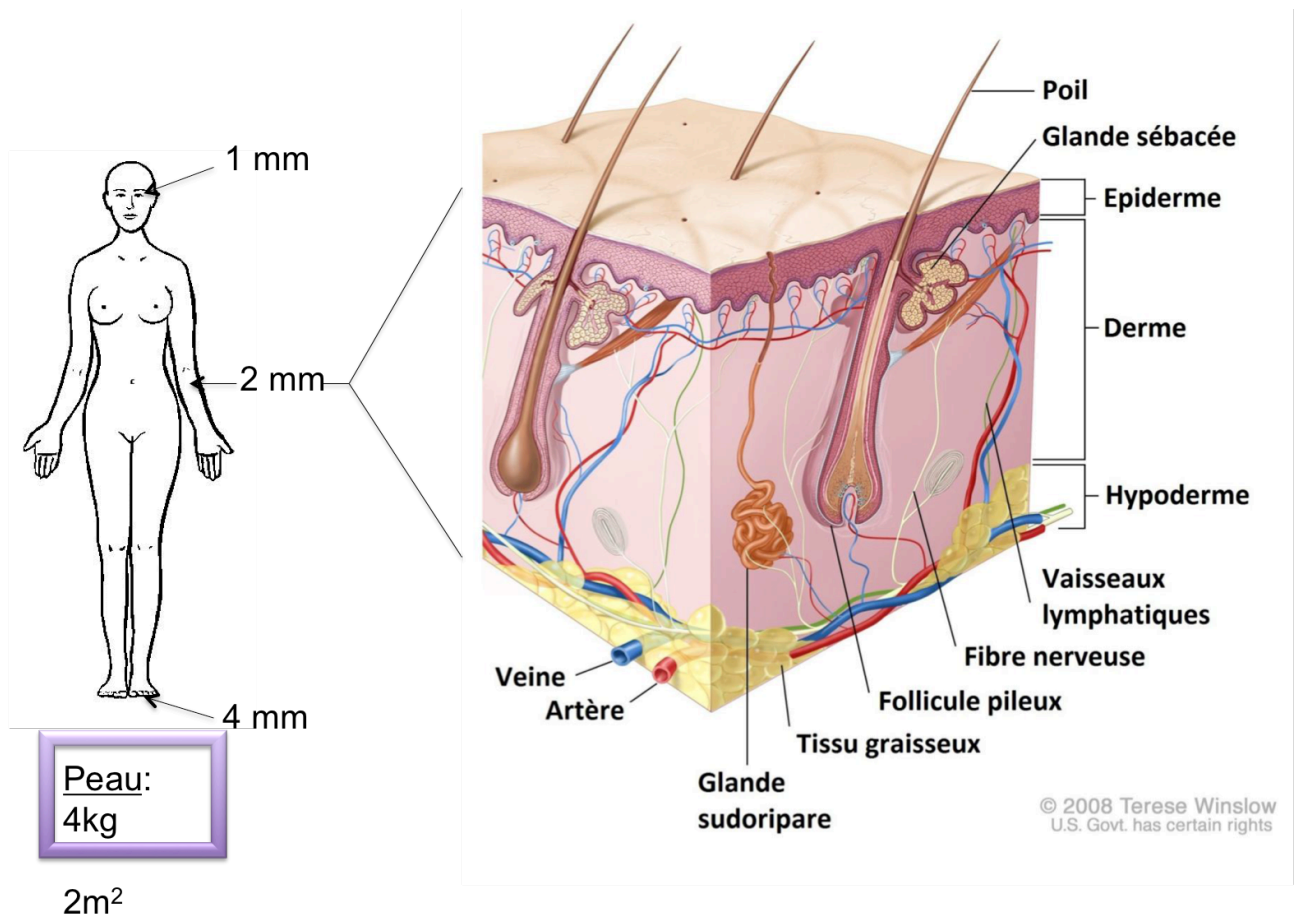


Figure 15: Anatomie de la peau vue en coupe transversale distinguant l'hypoderme, le derme et l'épiderme ainsi que les glandes annexes, fibres nerveuses et vaisseaux qu'ils contiennent. (© Terese Winslow, 2008)

De plus, au niveau du cytosquelette, le calcium coordonne la réorganisation des microfilaments d'actine, des filaments intermédiaires de kératine et des microtubules dans les kératinocytes (Zamansky et al., 1991) ce qui permet de déterminer la direction et le sens de migration par la formation de fibres de stress. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  favorise la polymérisation des microfilaments d'actine (Inagaki et al., 1989) via la régulation de protéines de liaison à l'actine (ABP, Actin-Binding Protéines) comme la gelsoline qui, en formant des manchons aux extrémités libres des filaments d'actine, détermine le sens de polymérisation de l'actine et la formation du pseudopode (Matsudaira et al., 1985; McGough et al., 1998). Le calcium induit également la phosphorylation des filaments intermédiaires comme les desmine, vimentine, et kératine par les voies AMPc/PKC ce qui provoque leur dépolymérisation, tout comme le  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe la polymérisation des tubulines. Les protéines motrices telles que les dynéïne et kinésine sont des ATPases modulées par le calcium elles aussi et notamment par l'intermédiaire de la calmoduline. D'un point de vue physiologique, il existe notamment deux facteurs paracrines induisant la migration (chémokines) des cellules épithéliales, l'EGF (Epithelial Growth Factor) et l'IP-9 (Interferon-inducible Protein 9). Toutes deux activent la PLC et les voies calcium dépendantes des MAPK comme Erk ainsi que la calpaine (Satish et al., 2005). Cependant, les acteurs moléculaires responsables de la signalisation calciques lors de la migration cellulaire sont encore méconnus bien que le domaine intéresse de plus en plus d'équipes qui ont déjà identifié quelques éléments clés comme STIM1-Orai1 (Potier et al., 2009; Schäfer et al., 2012) et des canaux ioniques (pour revue, voir Becchetti and Arcangeli, 2010; Babich and Burkhardt, 2013; Bon and Beech, 2013; Smani et al., 2014).

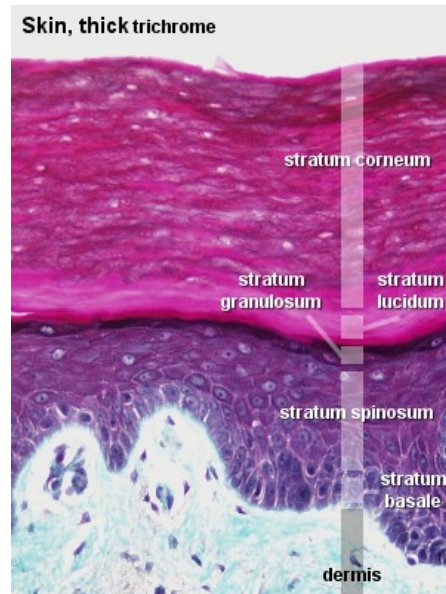
## **II. Le rôle crucial du calcium dans l'épiderme de la peau humaine**

La peau est l'organe le plus lourd et le plus étendu de l'organisme (en moyenne 4 kg et 2 m<sup>2</sup>) avec une épaisseur moyenne de 2 mm mais pouvant varier de 1mm (paupières) à 4 mm (paumes et plantes). Cet organe n'est pas un simple tégument de recouvrement. Hormis son rôle de protection à la fois physique et chimique, elle participe à la thermorégulation du corps mais elle a aussi des fonctions sensorielles, des fonctions métaboliques et d'échanges (pour revue, voir Wysocki, 1999; Mélissopoulos et al., 2012).

### **A. Anatomie et physiologie de la peau**

La peau est constituée de trois tissus superposés; l'hypoderme en profondeur est principalement composé de tissu adipeux, le derme, intermédiaire, est un tissu conjonctif contenant des fibroblastes à l'origine des fibres de collagène et d'élastine ainsi que des vaisseaux sanguins lui conférant un rôle de soutien mécanique et un rôle nutritif pour le tissu le plus superficiel qu'est l'épiderme (Fig.15). Tout comme le tissu nerveux, l'épiderme provient embryologiquement de l'ectoderme qui recouvre l'embryon en développement. La morphogénèse épidermique est provoquée par la voie Wnt (Wingless Integretion Site) (Payre et al., 1999). En l'absence de ce signal, la BMP (Bone Morphogenetic Protein) est inhibée provoquant alors la neurogénèse (pour revue, voir Fuchs, 2007; Blanpain, 2007). La morphogénèse de l'épiderme en fait un tissu épithélial stratifié, pavimenteux Malpighien et kératinisé.

A



B

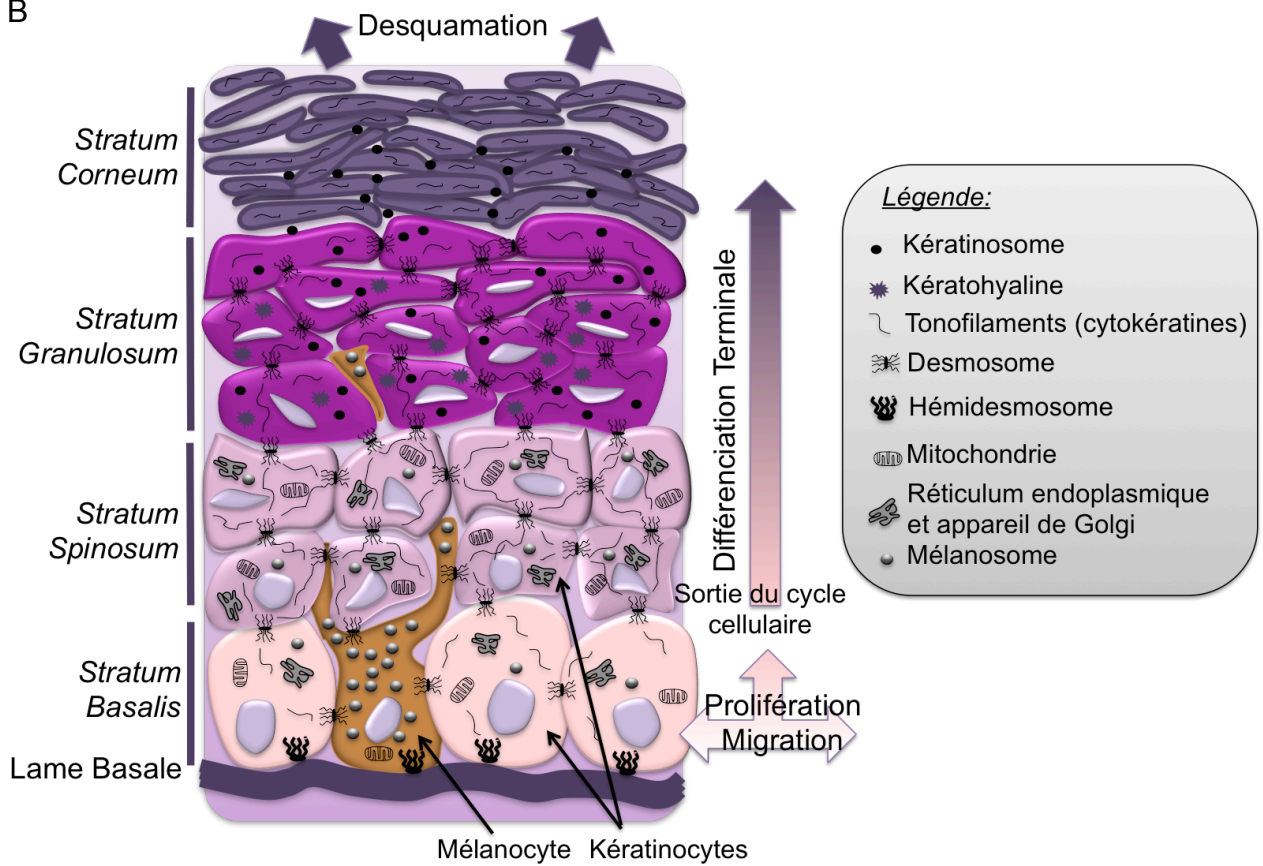


Figure 16: Structure de l'épiderme (A) vue sur une photo de coupe transversale de peau colorée au trichrome et montrant les différentes assises de kératinocytes dans l'épiderme humain. (Dempsey D.S., <http://www.nku.edu/~dempseyd/skin%20layers.jpg>) et (B) schématisée pour bien voir l'évolution physiologique des keratinocytes dans les différentes assises.

Son épaisseur est en moyenne celle d'une feuille de papier mais elle varie entre 0,05 mm au niveau des paupières et 1,5 mm d'épaisseur au niveau palmo-plantaire. L'épiderme est constitué de 4 types cellulaires: les **kératinocytes**, majoritaires à 80% sont les cellules épithéliales de structure, les **mélanocytes** synthétisent la mélanine, pigment permettant de protéger l'ADN des UVs, les cellules immunitaires de **Langerhans** surveillent et protègent l'organisme contre les agressions extérieures et enfin les **cellules de Merckels**, récepteurs sensoriels d'origine nerveuse.

Les kératinocytes se répartissent en 4 (peau fine) ou 5 (peau épaisse) couches superposées que l'on distingue selon l'état de différenciation des cellules de la profondeur vers la surface (pour revue, voir Kanitakis, 2002) (Fig.16).

- **La couche basale ou germinative (*stratum basalis*)** est la couche la plus profonde de kératinocytes en contact par des hémidesmosomes avec la matrice extracellulaire de la jonction dermo-épidermique. Cette couche monocellulaire est caractérisée par des kératinocytes indifférenciés cylindriques capables de proliférer par division mitotique.
- **La couche épineuse ou couche des corps muqueux de Malpighi (*stratum spinosum*)** est constituée de 5 ou 6 couches de kératinocytes entrant dans le processus de différenciation. Ces cellules possèdent un gros noyau vésiculeux à deux nucléoles et deviennent polygonales du fait de l'augmentation du nombre de desmosomes qui leur donnent alors une allure épineuse et assurent une grande cohésion cellulaire.
- **La couche granuleuse (*stratum granulosum*)** est formée de trois couches de kératinocytes aplatis possédant un noyau ovale dense, peu d'organites dans le cytoplasme et deux sortes de granulations, les kératohyalines et les kératinosomes. Les premières contiennent la profilaggrine, essentielle à la différenciation des kératinocytes tandis que les secondes (issues de l'appareil de Golgi) contiennent des lipides qui seront exocytés dans l'espace extracellulaire et formeront le « ciment » entre les cellules.
- **La couche claire (*stratum lucidum*)** n'est présente que dans la peau épaisse et est constituée de plusieurs assises de kératinocytes plats et clairs.
- **La couche cornée (*stratum corneum*)** est composée de 4 à 20 assises de kératinocytes aplatis et totalement kératinisés appelés alors cornéocytes. Ces cellules ne possèdent plus ni noyau, ni organite, ni kératohyaline mais ont un cytoplasme rempli de filaments de kératines enrobées de filaggrine et une membrane plasmique épaissie par un enduit protéique interne (involucrine, kératolinine) et externe lipidique. La couche cornée se divise elle-même en deux sous couches; la couche compacte (*stratum compactum*) qui contient les cornéocytes soudés assurant la fonction de barrière cutanée très hydrophobe et la couche desquamante (*stratum disjonctum*) en surface (pour revue, voir Ishida-Yamamoto and Iizuka, 1998; Nemes and Steinert, 1999).

Chaque couche de l'épiderme est donc caractérisée par l'expression de marqueurs spécifiques à leur état de différenciation, les cytokératines (KRT) (pour revue, voir Fuchs, 1994), involucrine, IVL (Hohl et al., 1991), filaggrine, FLG (Lonsdale-Eccles et al., 1984), transglutaminase 1, TGM1 (Schroeder et al., 1992) et les protéines desmosomiales desmogléines, Dsg, et desmocollines, Dsc (Skerrow et al., 1989).

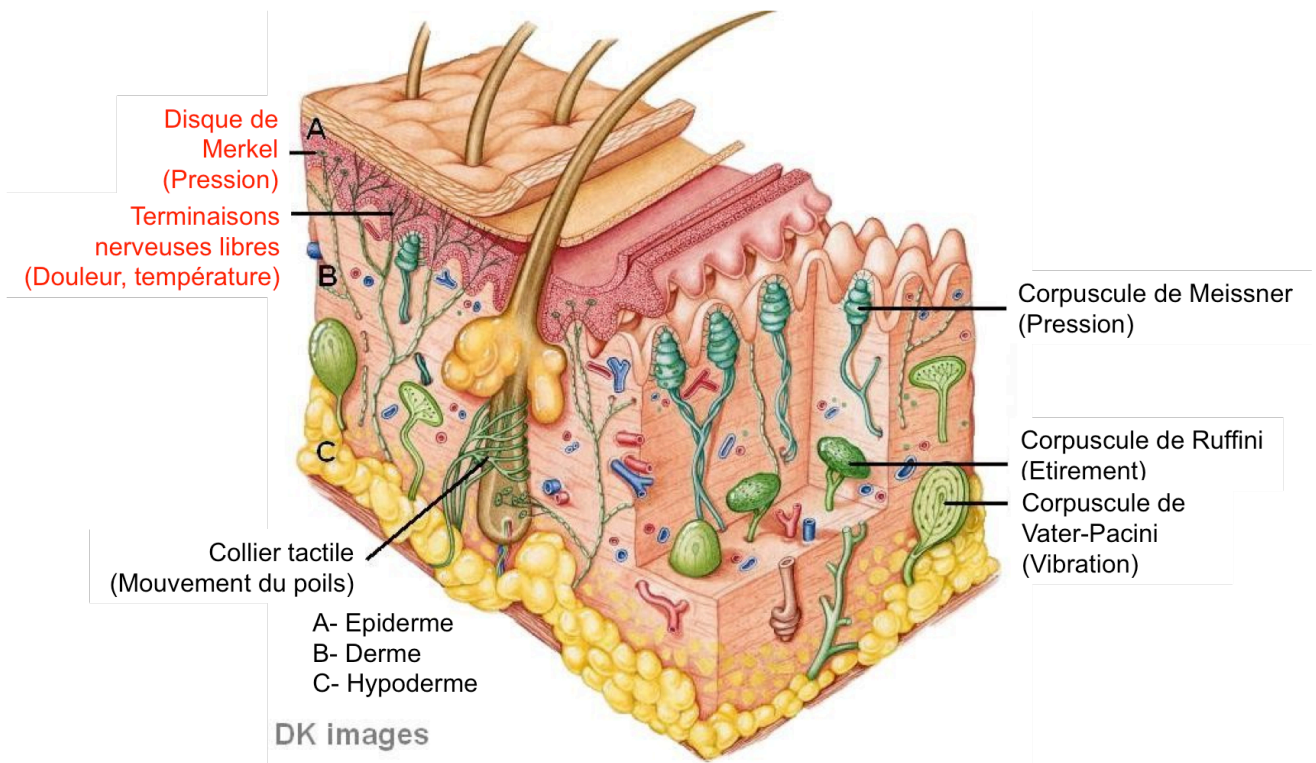


Figure 17 : Schéma d'une coupe transversale de peau détaillant les différentes terminaisons nerveuses sensorielles et notamment les disques de Merkel et terminaisons nerveuses libres au contact de l'épiderme et des kératinocytes respectivement. (Source : Modifié à partir d'un schéma original de DK Images).

## B. Rôles de l'épiderme dans les fonctions de la peau

L'épiderme étant le tissu le plus superficiel de la peau, il assure principalement la fonction de barrière protégeant les tissus sous-jacents et l'organisme des agressions physiques, chimiques, infectieuses et environnementales (chaleur, sécheresse, UVs). Toutefois, l'épiderme a également un rôle à jouer dans les autres fonctions de la peau (pour revue, voir Bressler and Bressler, 1989).

### 1. L'épiderme dans la fonction de barrière physique

La résistance mécanique de la peau est intimement liée à sa souplesse et à sa fermeté. De part ses propriétés mécaniques la peau lutte contre les agressions physiques (chocs, étirements, frottements...) (pour revue, voir Madison, 2003; Jensen and Proksch, 2009). Cela est permis par la couche cornée et le film hydrolipidique recouvrant la couche desquamante. La couche cornée est à la fois très résistante et extensible: résistante, grâce à l'enveloppe protéo-lipidique des cornéocytes et aux cornéodesmosomes assurant la cohésion intercellulaire, et extensible, grâce à la richesse des cornéocytes en kératines. En effet, lorsqu'elles sont soumises à de faibles contraintes, les kératines peuvent s'étirer puis reprendre leur structure en hélice- $\alpha$  comme un ressort mais, sous de plus fortes contraintes, elles ne sont plus capables de reprendre leur forme initiale et adoptent alors une structure en feuillets- $\beta$ . Le film hydrolipidique, constitué de sébum (phase lipidique) et de sueur (phase aqueuse), permet de réduire les forces de friction. De plus, l'élasticité des kératines dépend directement de la teneur en eau tout comme l'activité de nombreuses enzymes indispensables au maintien de l'épiderme comme la transglutaminase1 (TGM1), impliquée dans la formation de la coque protéique des cornéocytes, ou les SSCCs, responsables de la desquamation. L'hydratation de l'épiderme est donc également un facteur crucial dans sa fonction de barrière.

Cependant, dans le cas de forces mécaniques importantes, le rôle de l'épiderme est négligeable par rapport au derme très résistant et les efforts sont répartis par la lame basale. Au contraire, contre les agressions chimiques, c'est l'épiderme qui, grâce à l'imperméabilité des cornéocytes et des lipides intercellulaires, protège de la déshydratation et de la pénétration de molécules exogènes hydrophiles.

### 2. L'épiderme dans la fonction de barrière chimique, échanges et dynamique de l'hydratation cutanée

Le taux d'hydratation optimale de l'épiderme est de 13%. Il dépend du pouvoir hygroscopique de la couche cornée, captation d'eau et perte passive transdermique (TWEL- Transepidermal Water Loss) d'eau en transit transcellulaire depuis le derme vers la surface. L'eau arrivant en surface participe à la phase hydrophile du film hydrolipidique puis s'évapore. Ce flux d'eau est d'environ  $9 \text{ mL.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$  (ce qui représente 24% des pertes totales en eau).





La TWEL dépend de l'hygrométrie atmosphérique, de l'épaisseur de la couche cornée mais aussi de la quantité de céramides, lipides intercellulaires majoritaires dans la couche cornée. Les cornéocytes sont alors directement responsables de l'hygroscopie cutanée notamment par dégradation de la filaggrine donnant les NMF (Natural Moisturizing Factor), c'est à dire les facteurs naturels d'hydratation à fort pouvoir osmotique. L'acide hyaluronique est également capable de retenir l'eau et il est principalement sécrété par les fibroblastes du derme mais aussi par les kératinocytes dans l'épiderme.

Les jonctions serrées (et principalement la claudine-1) s'opposent également à la perte d'eau surtout au niveau de la *stratum granulosum* (SG) ce qui est clair chez la souris transgénique claudine1<sup>-/-</sup> dont la barrière cutanée est affaiblie au point de mourir de déshydratation en seulement une journée *postpartum* (Furuse et al., 2002; Kirschner et al., 2013; Sugawara et al., 2013). Enfin, l'aquaporine-3 est l'aquaporine prédominante dans l'épiderme basal et supra-basal assurant la diffusion de l'eau d'une cellule à l'autre. Pourtant, dans les kératinocytes en prolifération (couche basale), l'aquaporine-3 est localisée dans le RE et ce n'est que sous l'effet du Ca<sup>2+</sup> qu'elle est adressée à la MP (Hara-Chikuma and Verkman, 2008).

Finalement, plus la couche cornée est hydratée plus la fonction de barrière physique est efficace mais l'hydratation augmente aussi les capacités d'absorption de molécules hydrophiles par l'épiderme. Ainsi, la peau n'est pas impénétrable et quasiment toutes les substances sont perméables avec un coefficient diffusif dépendant de la molécule et de l'état physiologique de l'épiderme mais elles doivent déjà traverser la couche cornée. La desquamation, donc le renouvellement perpétuel de l'épiderme, permet alors de rejeter les substances qui auraient réussi à pénétrer cette première barrière.

### 3. L'épiderme, barrière antimicrobienne et acteur du système immunitaire

Les kératinocytes sont capables de sécréter des antimicrobiens puissants: le lysozyme, lysant les bactéries Gram+, et la RNase 7 à spectre d'activité très large et grande efficacité contre les entérocoques. De plus, les kératinocytes peuvent déclencher une réponse inflammatoire par une sécrétion de cytokines et lymphokines (TNF $\alpha$ , IL-1) qui attirent les lymphocytes T veillant dans le derme ou provenant de la microcirculation sanguine des papilles dermiques (Schröder and Harder, 2006). Ils peuvent également déclencher la migration et la différenciation des cellules dendritiques, comme les cellules de Langerhans, ou avoir un rôle de cellules présentatrices d'antigènes en présence d'allergènes.

L'épiderme est donc crucial dans le rôle de barrière de la peau et, chez les nouveaux-nés prématurés (3 semaines avant terme), celle-ci étant dramatiquement défectueuse, elle ne les protège ni de la déshydratation (perte d'eau et d'électrolytes), ni de la perte de chaleur (Hammarlund and Sedin, 1979; Harpin and Rutter, 1983), ni des invasions microbiennes (Marcoux et al., 2009).

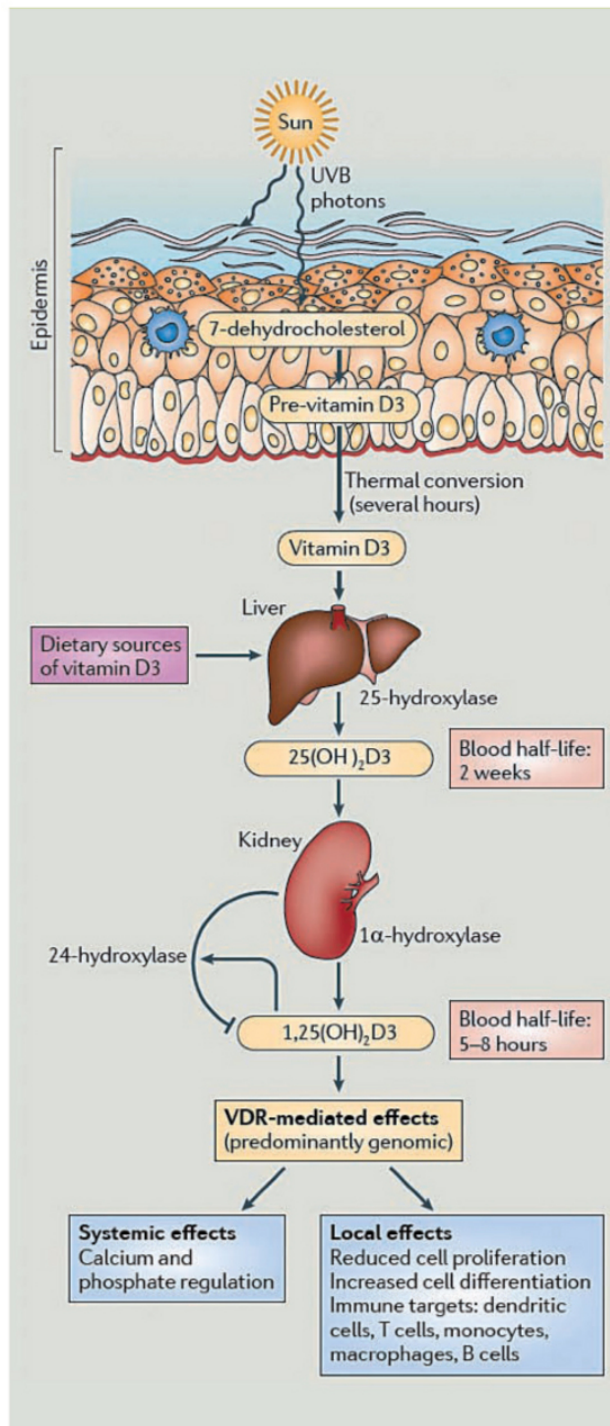


Fig.18: La coopération de l'épiderme, du foie et des reins dans la synthèse de Vitamine D initiée par les UVB sur les kératinocytes (Source: Schéma original dans la revue Hart PH, Gorman S, Finlay-Jones JJ., 2011).

## 4. L'épiderme, tissu sensoriel

La peau appartient au système somesthésique, elle participe à la sensibilité exteroceptive comme le toucher, les variations de température ou la douleur. L'innervation sensorielle est principalement située dans le derme mais certaines fibres nerveuses libres atteignent la jonction dermo-épidermique et peuvent pénétrer dans l'épiderme. Il y a notamment des fibres myéliniques fines sensibles au froid, des nocicepteurs (prurirécepteurs impliqués dans les démangeaisons) ainsi que des mécanorécepteurs sensibles à des pressions localisées.

Ces derniers sont formés par des fibres libres non myélinisées provenant des plexus sensoriels dermiques profonds et sont intimement associées aux cellules de Merckels situées dans la couche basale de l'épiderme (Fig.17) (pour revue, voir Boulais and Misery, 2008; Denda et al., 2007a et Lumpkin and Caterina, 2007). Cependant, dans certaines zones du corps, comme dans le bout des doigts, la peau a un pouvoir résolutif sensoriel anormalement grand par rapport au nombre de fibres nerveuses et récepteurs sensorielles ce qui suggère l'implication d'autres types de capteurs sensoriels. En effet, il a été montré que les kératinocytes participent directement à la perception en exprimant notamment les canaux TRPs qui, comme nous l'avons vu précédemment, sont des canaux activés par la température (ou molécules mimétiques, capsaïcine, menthol,...) et des stimuli mécaniques ou osmotiques qui ont déjà été largement impliqués dans la transduction sensorielle. Il existerait donc une transmission de l'information sensorielle depuis les cellules épithéliales non-excitables vers les neurones via les canaux TRPs (Denda and Tsutsumi, 2011).

## 5. L'épiderme dans les fonctions métaboliques de la peau

L'épiderme joue un rôle prédominant dans la synthèse de la Vitamine D3 (Fig.18). Cette vitamine est indispensable à la régulation de l'homéostasie calcique systémique et à la santé osseuse, une carence en vitamine D3 provoquant un rachitisme. Elle est très peu présente dans les aliments que nous consommons (à part l'huile de foie de morue) et donc elle nous est essentiellement fournie par la peau (90%). C'est dans la couche épineuse, et sous l'action des UVs B et de la chaleur, qu'un dérivé du cholestérol, le 7-déhydrocholestérol, est clivé en cholécalciferol ou provitamine D. Le cholestérol utilisé ne provient pas de la circulation, il est synthétisé *de novo* dans le derme principalement (80%) mais aussi dans la couche basale de l'épiderme à partir de l'acetyl coA et représente 14% des lipides de la couche cornée. Par la suite, la provitamine D est prise en charge par les systèmes hépatique et rénal pour la double déhydroxylation indispensable à la synthèse de la forme active de la vitamine D, la 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Les kératinocytes sont indépendants de cette voie systémique car ils possèdent les deux enzymes nécessaires à l'activation de la provitamine D<sub>3</sub>, la vitamine D-25 hydroxylase (CYP27A) et la 25OHD-1 $\alpha$ -hydroxylase (CYP27B1) (Bikle et al., 1986a; Bikle et al., 1986b, Lehmann et al., 2001). La forme active résultante n'est pas envoyée dans la voie systémique mais utilisée comme facteur autocrine et/ou paracrine sur les kératinocytes induisant leur différenciation (Su et al., 1994; Lehen'kyi et al., 2011a; pour revue, voir Bikle, 2012). Donc, afin de garantir son bon fonctionnement il est essentiel de maintenir l'intégrité de l'épiderme.

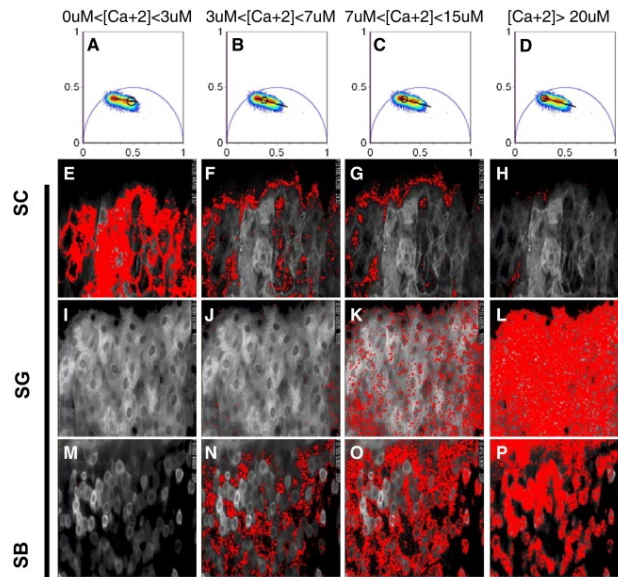


Figure 19: Evaluation des concentrations de calcium dans les différentes couches de l'épiderme humain adulte par la technique de « fluorescent lifetime imaging » (Celli et al., 2010).

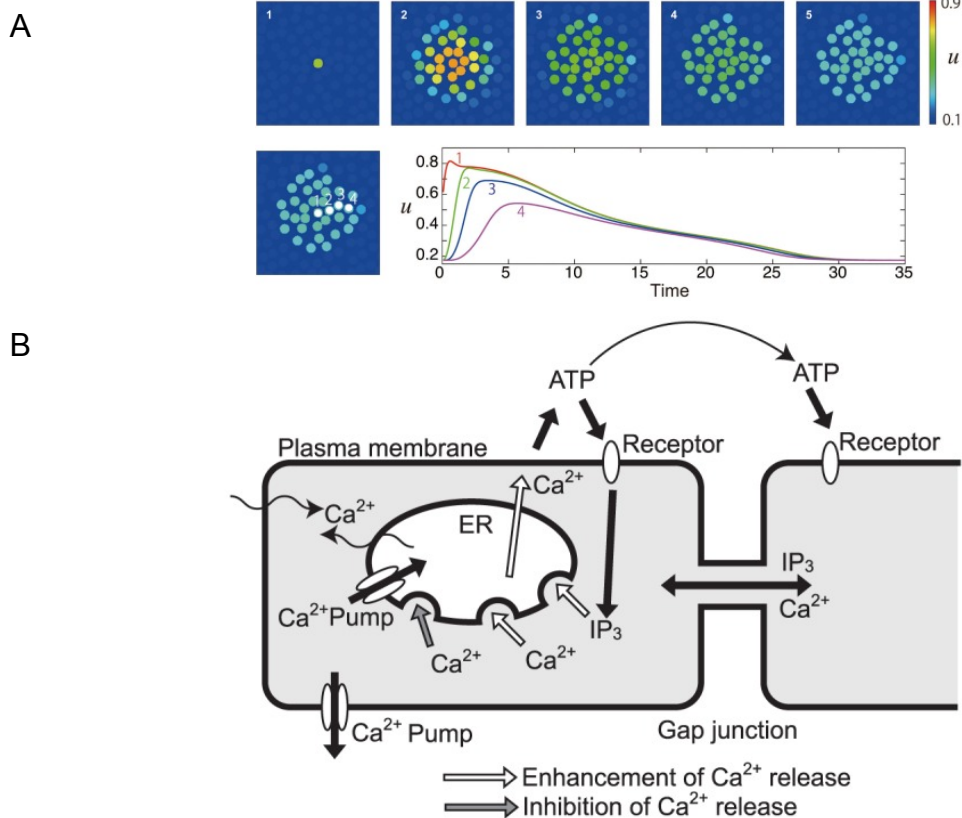


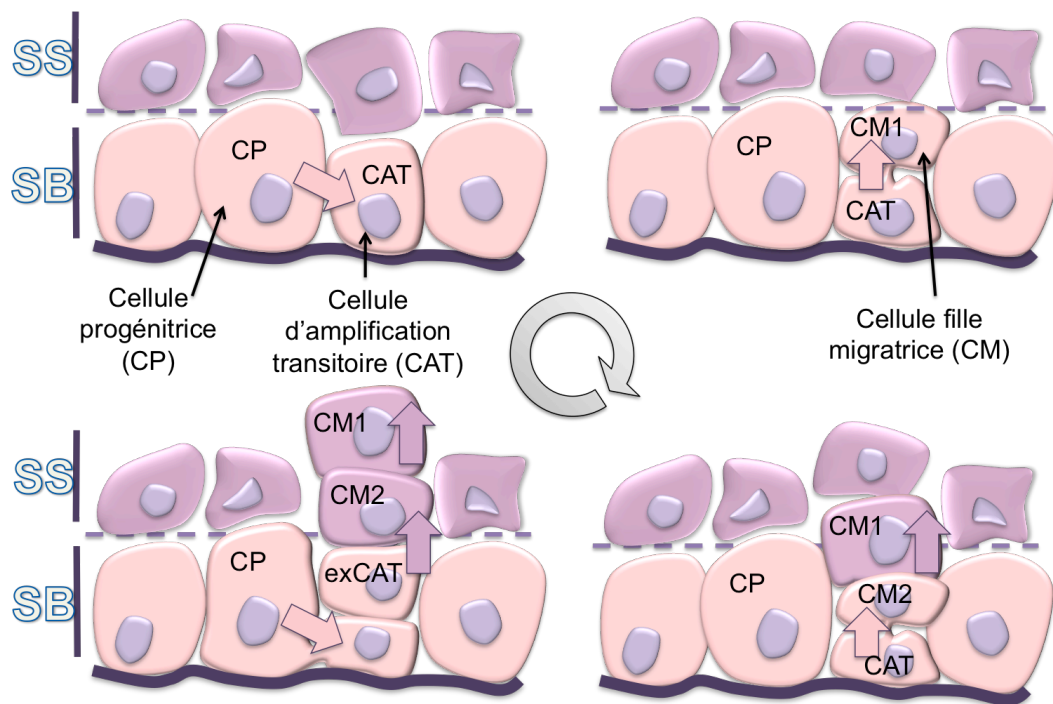
Figure 20: Modélisation de la propagation des vagues calciques dans les kératinocytes stimulés par une pression (A) et schéma des mécanismes impliqués (B). La sécrétion d'ATP induite par l'augmentation cytosolique de calcium permet d'activer les récepteurs purinergiques membranaires des cellules adjacentes à l'origine d'une libération du calcium réticulaire via la synthèse d'IP<sub>3</sub>. Entre les kératinocytes différenciés, la propagation du Ca<sup>2+</sup> et de l'IP<sub>3</sub> se fait également via les jonctions GAP. (Kobayashi et al., 2014)

## C. Régulation de l'homéostasie de l'épiderme par le calcium

### 1. Maintien du gradient calcique dans l'épiderme

En 1985, la précipitation du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'oxalate-pyroantimonate dans l'épiderme (Menon et al., 1985) a démontré l'existence d'un gradient calcique croissant depuis les cellules profondes de la *stratum basalis*, où le  $\text{Ca}^{2+}$  est localisé dans les organites de stockage, vers les cellules superficielles de la *stratum granulosum* (SG), où le  $\text{Ca}^{2+}$  augmente à la fois dans l'espace intercellulaire et dans le cytoplasme. Ce gradient n'est observable que 19 jours ou 20 jours avant la naissance de la souris ou du rat respectivement et cela coïncide avec l'acquisition de la barrière cutanée (Elias et al., 1998). Depuis, l'existence de ce gradient et son implication dans le rôle de barrière, corrélée à l'expression des marqueurs de différenciation des kératinocytes, a été vérifiée par les techniques de « microbeam proton-induced X-ray emission » (Mauro et al., 1998) et de « fluorescent lifetime imaging » (Celli et al., 2010) (Fig.19). De plus, ce gradient est modifié dans les cas de psoriasis et de dermatites atopiques (Forslind et al., 1999) ainsi que dans les maladies de Darier et de Hailey-Hailey pour lesquelles le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique est anormalement élevé dans la couche basale (Leinonen et al., 2009). La formation et le maintien de ce gradient sont donc des événements fondamentaux dans l'homéostasie et la fonction de barrière de l'épiderme. Il a été montré pour la première fois en 1992 (Boitano et al., 1992) qu'un stress mécanique sur la membrane d'un kératinocyte provoque la libération de calcium par le RE et provoque un influx de calcium dans les cellules voisine via la diffusion de l'IP<sub>3</sub> par les jonctions GAP. Depuis, cette vague de  $\text{Ca}^{2+}$  entre les kératinocytes suite à un stress mécanique ou à l'exposition à l'air a été modélisée mathématiquement par Denda M. et ses collaborateurs (Denda and Denda, 2007; Tsutsumi et al., 2010; Kobayashi et al., 2014). La diffusion du calcium se fait par vagues circulaires successives limitées à un diamètre inférieur à une dizaine de cellules en fonction de l'état de différenciation des kératinocytes (Tsutsumi et al., 2009) (Fig.20 A). En effet, pour les kératinocytes indifférenciés (UhPK), la diffusion limitée du  $\text{Ca}^{2+}$  est assurée exclusivement par la sécrétion paracrine d'ATP agissant sur les récepteurs purinergiques des cellules adjacentes et provoquant la vidange du RE via la synthèse d'IP<sub>3</sub> (Fig.20 B). Dans les kératinocytes différenciés (DhPK), la vague calcique est bien plus étendue en mettant également en jeu la diffusion du  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'IP<sub>3</sub> par les jonctions GAP (connexines) et les pannexines. Par la suite, il a été montré que les pannexines seraient impliquées dans la différenciation des kératinocytes induite par le calcium (Celetti et al., 2010) tandis que les récepteurs purinergiques seraient responsables de la prolifération des kératinocytes HaCaT (Lee et al., 2001).

Au niveau intercellulaire, le gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  est maintenu par l'expression différentielle des protéines formant les jonctions serrées dans les différentes couches de l'épiderme et principalement les claudine1 (ubiquitaires), Zonula Occludens 1 (couches supérieures) et occludines (*Stratum Granulosum*) (Kurasawa et al., 2011; Kirschner et al., 2013; pour revue, voir Kirschner and Brandner, 2012).



**Figure 21:** Les étapes de la division asymétrique des kératinocytes indifférenciés dans la couche basale de l'épiderme humain. La cellule progénitrice (CP) se divise donnant une même cellule progénitrice et une cellule fille d'amplification transitoire (CAT). La CAT se divise ensuite donnant alors deux cellules filles, dont l'une sera une cellule migratrice (CM) pouvant suivre le processus ascensionnel de différenciation terminale. Enfin, après de nombreuses divisions cellulaires, la CAT entrera à son tour en différenciation (exCAT) et sera remplacée par une nouvelle CAT provenant d'une nouvelle division de CP.

Cette augmentation de calcium extracellulaire est détectée par le Calcium Sensor Receptor (CaSR) exprimé sur la MP des kératinocytes de la couche supra-basale et impliqué dans la différenciation des kératinocytes au cours de laquelle son expression diminue tandis que celle de la petite forme inhibitrice tronquée augmente (Bikle et al., 1996; Oda et al., 1998; Fatherazi et al., 2004). En effet, l'équipe de D. Bikle a montré en 2002 (Kömüves et al., 2002), dans un modèle de souris KO pour la forme longue du CaSR (CaSR<sup>-/-</sup>), que l'absence de ce récepteur perturbe le gradient de calcium et augmente la prolifération des kératinocytes tandis que l'expression des marqueurs de différenciation dans l'épiderme des souris diminue. Depuis les années 80, la propriété du calcium pour induire la différenciation des kératinocytes est couramment utilisée *in vitro* en suivant le protocole appelé « Calcium Switch » qui consiste à passer d'une concentration de calcium extracellulaire de 0,02 mM à 1,7 mM pendant plusieurs jours (Hennings et al., 1980; Kang et al., 2000a).

Enfin, les protéines participant à l'homéostasie calcique, tout comme les canaux perméables au calcium, participent à l'augmentation de l'influx de calcium extracellulaire dans les kératinocytes (Mauro et al., 1990; Mauro et al., 1993). En particulier, les canaux de la famille des TRP puisqu'elle regroupe un remarquable panel de canaux activés par des stimuli nombreux et variés. En effet, depuis 2002, quelques-uns de ces canaux ont déjà été identifiés dans les kératinocytes (Peier et al., 2002a; Peier et al., 2002b) et sont déterminants dans la physiologie de la peau (Beck et al., 2006b; Beck et al., 2008; Lehen'kyi et al., 2007a). Certains d'entre eux ont aussi été impliqués dans différentes dermatoses telles que la maladie de Darier (Pani et al., 2006a), dans le prurit (Steinhoff and Bíró, 2009) ainsi que dans les mélanomes (Tu et al., 2012).

## 2. Rôle du calcium dans la croissance des kératinocytes

Comme vu précédemment, le Ca<sup>2+</sup> joue un rôle dans le cycle cellulaire des cellules épithéliales alors qu'une concentration calcique élevée et soutenue dans le temps induit la mort par apoptose. Pour les kératinocytes ce n'est pas tout à fait le cas, ils n'entrent en apoptose que dans la couche basale et dans le cas d'un coup de soleil provoqué par les UVB tandis qu'une élévation de la [Ca<sup>2+</sup>] cytoplasmique induit la mort des kératinocytes par différenciation terminale. Ce processus de lente « mort » génétiquement programmée se distingue de l'apoptose du fait que les cellules mortes ne sont pas dégradées par le système immunitaire puisqu'elles remplissent une fonction essentielle à la barrière cutanée. Ce processus débute dans la couche suprabasale, progresse au cours de la « migration » verticale des kératinocytes pour enfin aboutir à la formation de cornéocytes desquamants en surface.

### i. La division asymétrique des kératinocytes

La perte des cornéocytes en surface est compensée par l'intense activité mitotique des kératinocytes de la couche basale. Le renouvellement des couches supérieures est complet en 4 à 6 semaines. Ce renouvellement constant implique l'existence de cellules souches progénitrices (CP) à fort pouvoir mitotique.



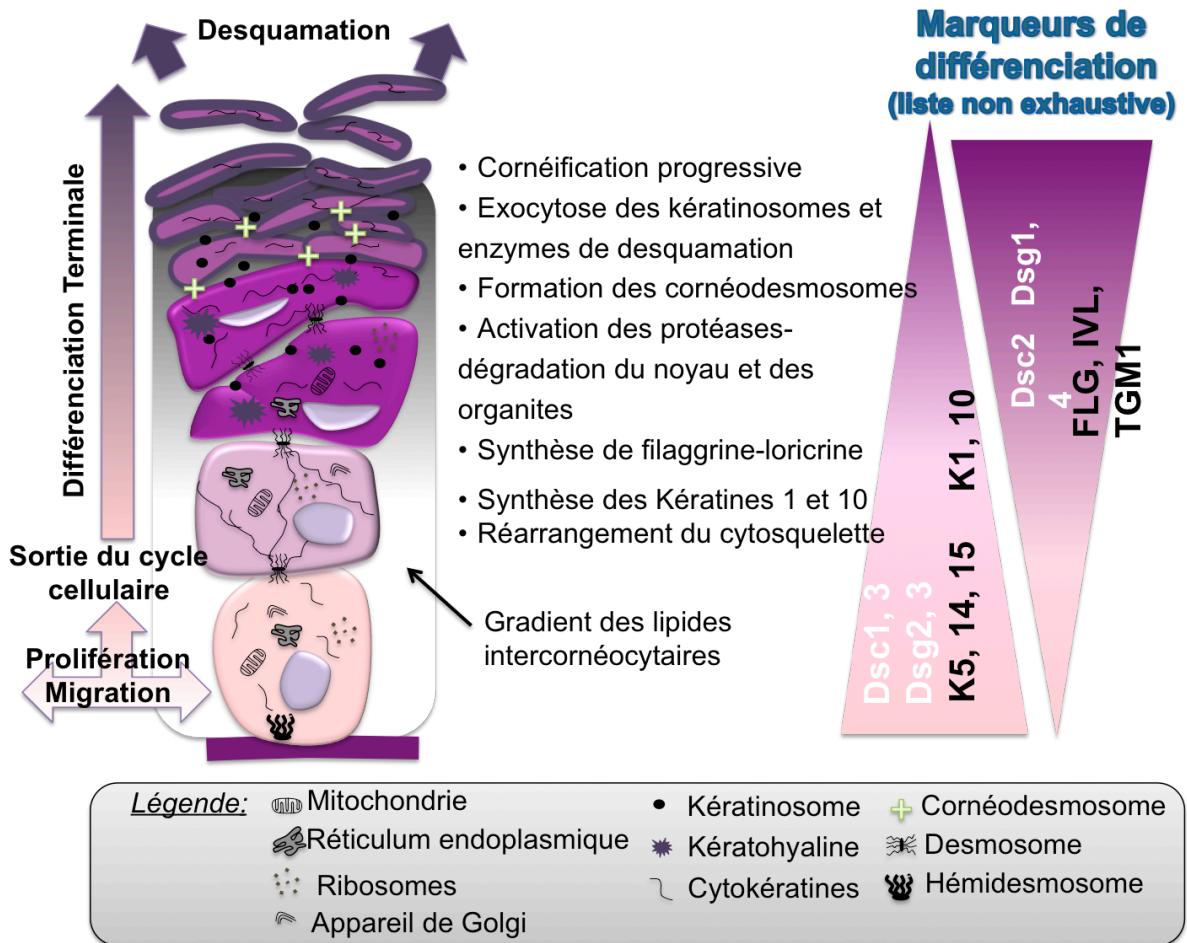


Figure 22: Schéma marquant les étapes de la progression des kératinocytes vers la différenciation terminale et la desquamation. (Dsc-Desmocolline; Dsg-Desmogléine; K-kératine; FLG-Filaggrine; IVL-Involucrine; TGM-Transglutaminase)

Celles-ci représentent 2 à 7% des cellules basales et sont soumises à une division asymétrique (Fig.21) (Seery and Watt, 2000; Lechler and Fuchs, 2005). En effet, les CS progénitrices se divisent lentement en une cellule identique et une cellule fille d'amplification transitoire, elle-même capable de se diviser très rapidement et de nombreuses fois. La division de la cellule d'amplification transitoire donne deux cellules filles, l'une restant dans la couche basale et la seconde migrant vers les couches supérieures et entrant dans le processus de différenciation.

## ii. La différenciation des kératinocytes

La différenciation des kératinocytes commence dès lors qu'ils perdent leur adhérence à la lame basale donc dans la couche supra-basale de l'épiderme (Fig.22). L'une des étapes principales de la différenciation des kératinocytes est la « kératinisation », processus par lequel ces cellules synthétisent les filaments intermédiaires de kératine du cytosquelette à l'origine d'un réseau protéique filamenteux qui assure la résistance de la peau en formant des « câbles » reliant l'enveloppe nucléaire à la membrane plasmique. La polymérisation des cytokératines (kératines « molles » épithéliales, KRT) commence par la formation d'un dimère de kératines dont l'expression des paires de gènes est coordonnée selon l'état précis de différenciation (Sun and Green, 1978). Dans l'assise basale, les kératinocytes synthétisent le dimère KRT5/KRT14, puis, dès l'initiation de la différenciation ils expriment progressivement le dimère KRT1/KRT10 qui possède plus de ponts disulfures et procure une grande stabilité aux cellules (Fuchs and Green, 1980; Fuchs, 1994). Le réseau de filaments intermédiaires se densifie progressivement passant de 30% des protéines totales dans les UHPK à 85% dans les cornéocytes. La différenciation terminale du cornéocyte implique également la création d'une matrice fibreuse intracornéocytaire, la production de lipides intercellulaires et la formation d'une enveloppe « cornée » (Sun and Green, 1976). Les kératinocytes granuleux contiennent des granules de kératohyaline et des kératinosomes. Les premiers contiennent la profilaggrine (Sybert et al., 1985) qui, après déphosphorylation et clivage, donne 1 à 12 unités de filaggrine permettant l'agrégation des KRT par la formation de ponts disulfures et ainsi la formation du réseau protéique intracornéocytaire. Les kératinosomes sont remplis de lipides (cholestérol, acides gras libres saturés et céramides) qui sont libérés dans l'espace intercellulaire et s'organisent en feuilletts importants pour la cohésion des cornéocytes (Madison et al., 1998). La cornéification correspond à la formation d'une enveloppe protéique rigide et très résistante sous la membrane plasmique (Rice and Green, 1977). La filaggrine joue encore ici un rôle important tout comme l'involucrine qui représente 60% des protéines de l'enveloppe cornée. Sous l'effet de la transglutaminase, une enzyme dépendante du calcium (Rice and Green, 1979), ces protéines associées forment un réseau insoluble très résistant accolé comme un « ciment » sur la face intracellulaire de la membrane plasmique (Rice and Green, 1978). Les cornéodesmosines remplacent progressivement les cadhérines desmosomales dans le rôle d'adhésion cellulaire (Lundström et al., 1994). Au cours de la différenciation terminale, les kératinocytes perdent progressivement leurs organites qui sont dégradés par autophagie ainsi que l'intégrité du noyau, tout comme dans l'apoptose à ceci près que la p53 ne semble pas impliquée dans ce processus mais plutôt p63 (de la famille de p53) et qu'il n'y a pas de fragmentation de l'ADN

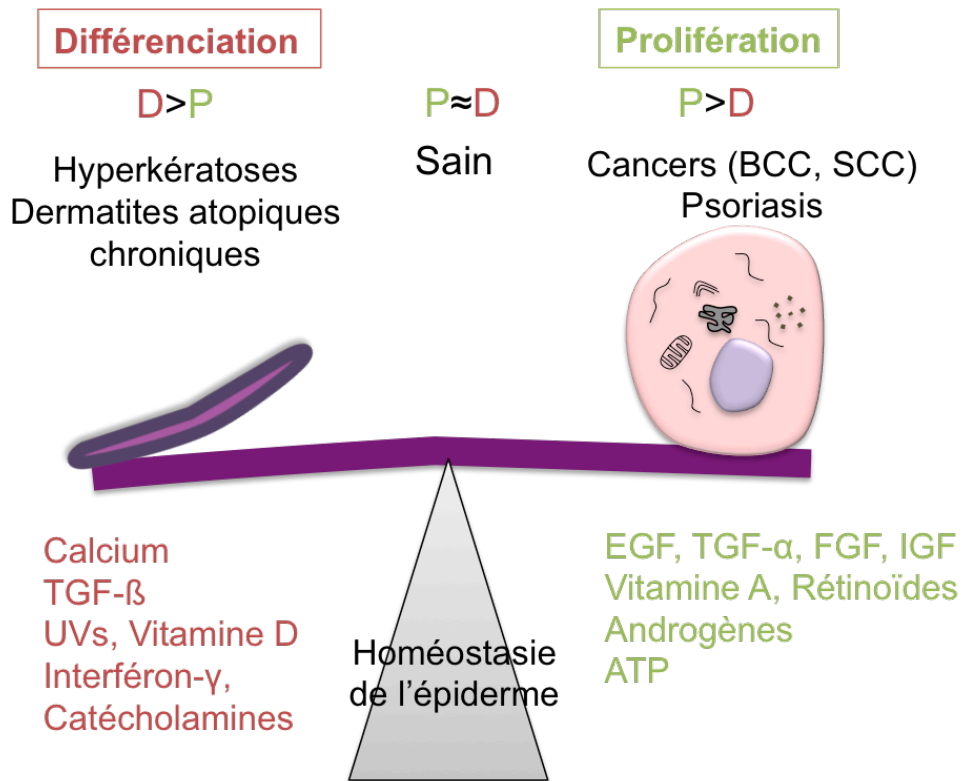


Figure 23 : Facteurs intervenant dans l'homéostasie de l'épiderme en maintenant la balance entre la prolifération et différenciation des kératinocytes.

qui est digéré par une ADNase, la desquamine (Hennings and Holbrook, 1983; pour revue, voir Eckhart et al., 2013).

Enfin, la desquamation des cornéocytes en surface est permise par l'activité enzymatique de deux serine-protéases de la famille des kallikréines, sécrétées sous forme de précurseurs dans l'espace intercornéocytaire à l'interface avec les kératinocytes granuleux, qui dégradent la coque lipido-protéique des cornéocytes ainsi que les cornéodesmosomes (Kishibe et al., 2007).

### iii. Régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes

Afin de maintenir l'homéostasie de l'épiderme, les processus de prolifération et de différenciation doivent être finement régulés. En effet, une hyperprolifération des cellules basales est à l'origine de pathologies cutanées plus ou moins graves comme les cancers baso- et spino-cellulaires ou le psoriasis alors qu'une surdifférenciation de l'épiderme altère la fonction de barrière cutanée à l'origine d'épidermolyses bulleuses (mutations de *KRT5* et/ou *KRT14*), d'hyperkératoses (mutations de *KRT1* et/ou *KRT10*), d'eczéma et autres dermatoses (pour revue, voir Stanley, 2012). Il existe donc de nombreux facteurs de croissance, cytokines, chémokines et autres facteurs endocrines ou synthétisés par les cellules cutanées et agissant de manière autocrine et/ou paracrine pour réguler la prolifération et la différenciation des kératinocytes (Fig.23). Les facteurs de croissance, EGF (Epidermal Growth Factor), TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), FGF (Fibroblastes Growth Factor), IGF (Insuline like Growth Factor), les rétinoïdes issus de la Vitamine A, les hormones androgènes et l'ATP favorisent généralement la prolifération des kératinocytes. Au contraire, le TGF $\beta$ , la vitamine D, l'interféron  $\gamma$ , les catécholamines et les UVs s'opposent à la prolifération des kératinocytes en induisant leur différenciation (Fuchs and Green, 1981; pour revue, voir Shirakata, 2010). Cependant, le facteur de différenciation nécessaire et suffisant reste le Ca<sup>2+</sup> et aussi le plus utilisé pour induire la différenciation *in vitro* grâce au protocole de « calcium-switch ». En effet, le « calcium-switch » provoque une augmentation bisphasique de la concentration de Ca<sup>2+</sup> intra-cellulaire dont le pic est suivi d'un long plateau. Cela entraîne une cascade d'évènements : un remodelage des jonctions intercellulaires, une redistribution de la PKC $\alpha$ , de la protéine p63 et de la calmoduline puis, après quelques heures, l'expression des *KRT1/10*, de la loricrine, de l'involucrine et de la transglutaminase dont l'activité dépend directement du Ca<sup>2+</sup>. Il existe un locus sur le chromosome 1 (1q21) où sont regroupés la plupart des gènes de différenciation, c'est le 2-Mb ou complexe de différenciation épidermique. La grande majorité des promoteurs de ce complexe ont un élément de réponse aux facteurs de transcription de type AP-1 comme fos, jun et fas. Or, il a été montré que le calcium peut réguler les facteurs AP-1 comme cfos dont il augmente l'expression. De plus, ce complexe 2-Mb regroupe quatre familles de gènes codant les petites protéines riches en proline, les protéines de l'enveloppe cornée et deux familles de gènes codant pour des protéines sensibles au calcium par des domaines EF-Hand, les protéines S100A et les protéines de type-S100 comme la profilaggrine (Mischke et al., 1996; pour revue, voir Henry et al., 2012).

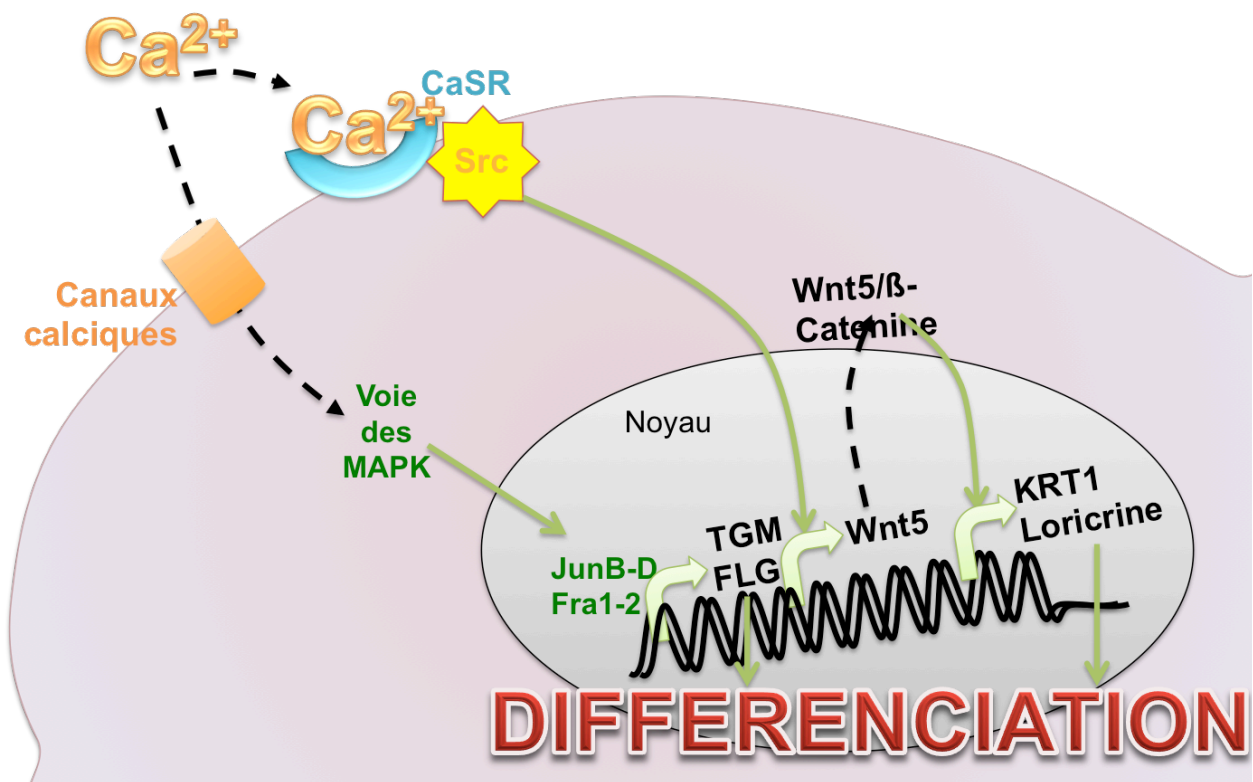


Figure 24 : Voie de signalisation empruntée par le récepteur calcique membranaire (CaSR) dans l'induction de la différenciation.

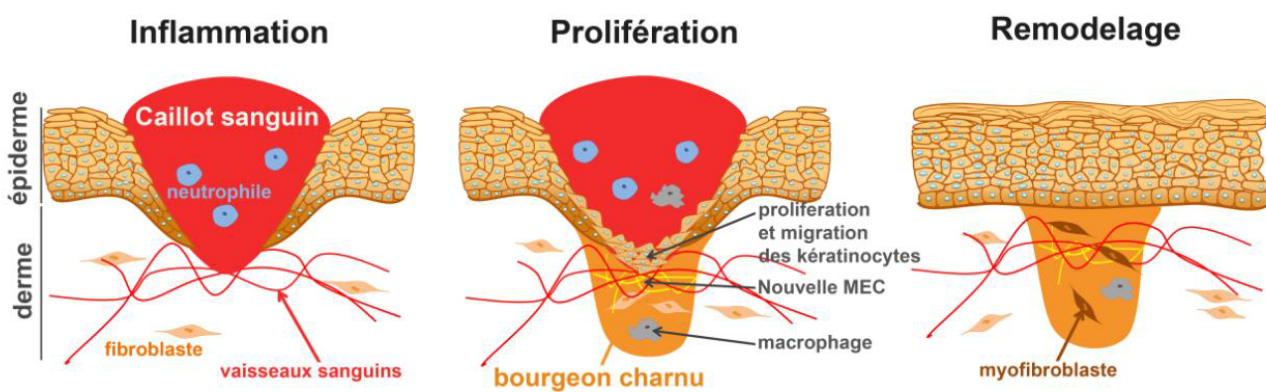


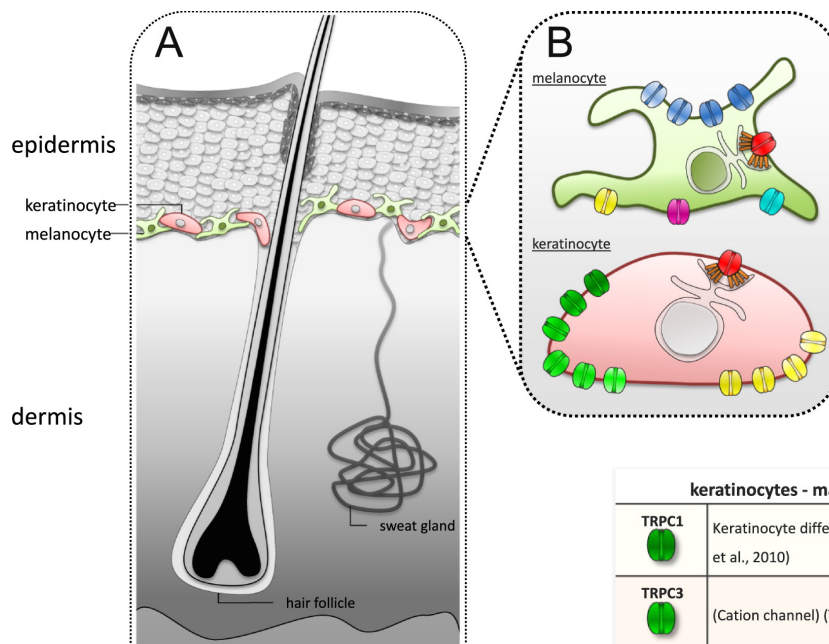
Figure 25 : Schéma de la cicatrisation de l'épiderme faisant intervenir la prolifération et la migration des kératinocytes (d'après Martin, 1997).











Le  $\text{Ca}^{2+}$  intervient donc aussi bien au niveau de l'expression des gènes utiles à la différenciation qu'au niveau de l'activité des protéines. Un exemple concret de voie de signalisation du calcium est celle induite par le récepteur sensible au calcium (CaSR) (Fig.24). Il a été montré que le calcium détecté par le CaSR stimule la PLC $\gamma$  qui induit la vidange calcique du RE via l'IP3 qui stimule la voie autocrine Wnt5a/ $\beta$ -caténine inductrice de l'expression des marqueurs de différenciation KRT1 et loricrine et inhibitrice de la prolifération cellulaire (Popp et al., 2014). Cela mène également à l'activation des kinases de la famille Src et à la formation de jonctions serrées via l'activation et la relocalisation des caténines et E-cadhérines provoquant l'activation de la Pi3 kinase et l'expression des gènes de différenciation (Tu et al., 2008; pour revue, voir Tu and Bikle, 2013).

### 3. Rôle du calcium dans la cicatrisation et la migration des kératinocytes

La cicatrisation de l'épiderme est un processus complexe mettant en jeu à la fois la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes. Ce processus se déroule en 3 étapes (Fig.25). Durant la phase inflammatoire, le sang coagule et forme un caillot contenant les cellules de la réaction immunitaire. Puis, la ré-épithélialisation a lieu au cours de la phase de prolifération grâce à la formation d'une nouvelle MEC par les fibroblastes d'une part, et à la prolifération et la migration des kératinocytes d'autre part. Enfin, la phase de remodelage forme à nouveau une barrière cutanée solide lorsque la blessure est totalement comblée et que les kératinocytes entame le processus de différenciation (Martin, 1997; Schäffer and Barbul, 1998; pour revue, voir Velnar et al., 2009).

Le calcium est important pour la cicatrisation de l'épiderme. C'est en 2002 que AB. Lansdown et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire dans la blessure au cours des trois phases de cicatrisation (Lansdown, 2002). Cette augmentation est accompagnée d'une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les kératinocytes ainsi que d'une redistribution intracellulaire du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les fibroblastes créant un gradient croissant de l'avant vers l'arrière (Hahn et al., 1992; Gough and Taylor, 1993). En effet, nous avons déjà expliqué comment le  $\text{Ca}^{2+}$  influence la prolifération et la différenciation des kératinocytes et qu'il est aussi bien impliqué dans la migration cellulaire, mais qu'en est-il de la migration des kératinocytes? Ces cellules sont capables de migrer dans deux directions. Elles migrent de manière « passive » verticale de la couche basale vers la surface de l'épiderme au cours du processus de différenciation mais aussi de manière « active » horizontale notamment lors de la ré-épithélialisation cicatricielle. Comme nous l'avons vu pour les cellules épithéliales en général, les kératinocytes sont fixés à la lame basale par des hémidesmosomes et des adhésions focales mettant en jeu ici les intégrines spécifiques  $\alpha_6\beta_4$ ,  $\alpha_2\beta_1$  et  $\alpha_3\beta_1$  respectivement (Carter et al., 1990). Il a été démontré par J.E. Oh et ses collaborateurs que cette dernière est moins exprimée dans l'une des deux cellules filles lors de la division asymétrique des kératinocytes permettant le détachement de cette cellule poussée vers la couche suprabasale et débutant alors le processus de différenciation (Oh et al., 2002), les intégrines et notamment l'isoforme  $\beta_4$ , étant nécessaire à la survie des kératinocytes (Dowling et al., 1996).



melanocytes - major related function & reference	
	Tumor suppressor gene (but minor role compared to other factors); Ca <sup>2+</sup> homeostasis; melanogenesis (Devi et al., 2009, 2013; Guo et al., 2012; Oancea et al., 2009)
	Ca <sup>2+</sup> induced apoptosis (Orfanelli et al., 2008)
	Melanophore function (detoxification) (Iuga and Lerner, 2007; McNeill et al., 2007)
	Ca <sup>2+</sup> signaling, suppressor of cell viability (Slominski, 2008; Yamamura et al., 2008)
	Nociception (cutaneous signals), Ca <sup>2+</sup> influx, no effect on (Ca <sup>2+</sup> mediated) melanogenesis (Choi et al., 2009)
	extraocular phototransduction that results in early melanin synthesis (Bellono et al., 2013; Oehler et al., 2012)
	Melanocyte survival (mutation leads to loss of melanin, loss of hair and pigmentation) (Xu et al., 2007)
	Ca <sup>2+</sup> signaling and melanogenesis (Stanisz et al., 2012)
	No major function determined (Stanisz et al., 2012)
	No major function determined (Stanisz et al., 2012)
	Expressed (Stanisz et al., 2012)
	Ca <sup>2+</sup> signaling and melanogenesis (Stanisz et al., 2012)













keratinocytes - major related function & reference	
	Keratinocyte differentiation (Cai et al., 2006; Tu et al., 2005; Woelfle et al., 2010)
	(Cation channel) (Tu et al., 2005)
	Keratinocyte differentiation (Fatherazi et al., 2007; Tu et al., 2005; Woelfle et al., 2010),
	(Cation channel) (Tu et al., 2005)
	Keratinocyte differentiation (Müller et al., 2008; Sun et al., 2012; Woelfle et al., 2010)
	(Cation channel) (Beck et al., 2008)
	Heat and UV induced MMP activation, rearrangement of extracellular matrix (photoaging) (Denda et al., 2001; Inoue et al., 2002; Lee et al., 2012)
	Skin barrier formation, regulation of transglutaminases and keratinocyte cornification (Akazawa et al., 2013; Cheng et al., 2010; Yoshioka et al., 2009)
	Thight junction strengthening, skin barrier formation (Akazawa et al., 2013; Kida et al., 2012; Sokabe et al., 2010; Sokabe & Tominaga, 2010)
	Keratinocyte differentiation (Lehen'kyi et al., 2007)
	Expressed (Gwack et al., 2008), Ca <sup>2+</sup> -switch induced keratinocyte differentiation (Numaga-Tomita & Putney, 2013); cell migration (Jans et al., 2013)
	No major function determined
	No major function determined
	Ca <sup>2+</sup> signaling (Ross et al., 2008; Ross et al., 2007); cell migration (Jans et al., 2013); Ca <sup>2+</sup> -switch induced keratinocyte differentiation (Numaga-Tomita & Putney, 2013)
	No major function so far determined

Figure 26: Profil d'expression des canaux TRP, Orai1/2/3 et des protéines de détection du calcium Stim1/2 dans les kératinocytes et mélanocytes de l'épiderme. (revue de Saul S. et al., 2013).

La migration horizontale polarisée (dans un sens défini) n'est possible que pour les UHPK. Le rôle des FA est bien établi dans cette motilité tandis que les hémidesmosomes seraient plutôt engagés dans l'ancrage stable et puissant des kératinocytes à la lame basale (DiPersio et al., 1997; Hodivala-Dilke et al., 1998) et seraient d'avantage impliqués dans la résistance de l'épiderme aux contraintes mécaniques (pour revue, voir Hopkinson et al., 2014). Concernant les intégrines des FA, il a été démontré que lors de la cicatrisation, de nouvelles isoformes des intégrines d'adhésion focale qui favorisent la migration sont exprimées, les  $\alpha_v\beta_5$ ,  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_9\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$  (pour revue, voir Watt, 2002; Margadant et al., 2010) tandis que l'expression de la  $\alpha_3\beta_1$  diminue. Or, celle-ci ralentit la ré-épithélialisation *in vitro* et *in vivo* (deHart et al., 2003; Margadant et al., 2009).

## 4. Le calcium et les canaux calciques dans des pathologies dermatologiques bénignes et cancéreuses

### i. Les canaux calciques, clés d'un épiderme sain et cibles dans les dermatoses

Le premier canal de la famille des TRP à avoir été détecté dans l'épiderme humain est TRPV1 en 2001 par Mitsuhiko Denda (Denda et al., 2001). Depuis, quelques autres canaux TRP ont été mis en évidence dans l'épiderme humain sains et dérégulés dans certaines pathologies dermatologiques (pour revues, voir Denda and Tsutsumi, 2011; Tóth et al., 2014; Bíró et al., 2007; Saul et al., 2014).

- **TRPVs** : Les canaux TRPV1, TRPV2, TRPV3 (Fusi et al., 2014, Sulk et al., 2012, TRPV4 (Radtke et al., 2011) et TRPV6 sont exprimés dans l'épiderme humain. TRPV1, initialement responsable des sensations douloureuses est activé par la chaleur (>43°C), les UVs, les pH acides et la capsaïcine (un alcaloïde du piment rouge). Ce canal est exprimé dans les kératinocytes où il est globalement pro-inflammatoire et s'oppose à la réparation de l'épiderme en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant l'apoptose dans les kératinocytes. Son expression augmente significativement dans l'épiderme exposé aux UVs et participe au phénotype inflammatoire lors de prurits et de pathologies cutanées comme les dermatites, les rosacées et l'acné. TRPV3 et TRPV4 sont des canaux activés à environ 30°C. Les souris transgéniques TRPV3<sup>-/-</sup> et TRPV4<sup>-/-</sup> ont toutes les deux une barrière épidermique défectueuse avec un pelage bien particulier (poils ondulés et vibrisses frisées) pour la première ou une différenciation insuffisante avec très peu de jonctions adhérentes dans la seconde (Asakawa et al., 2006; Cheng et al., 2010; Moore et al., 2013; Akazawa et al., 2013). La régulation pharmacologique de ces canaux montre que l'activation de TRPV4 accélère la régénération de l'épiderme alors que TRPV3 n'a pas d'effet direct bien que son activation provoque la synthèse de monoxyde d'azote (NO) par les kératinocytes qui migrent plus rapidement, ce qui est bénéfique à la ré-épithélialisation d'une blessure (Miyamoto et al., 2011). TRPV4 est également sensible à la pression osmotique ce qui pourrait en faire le détecteur du flux d'eau dans l'épiderme (Denda et al., 2007b).



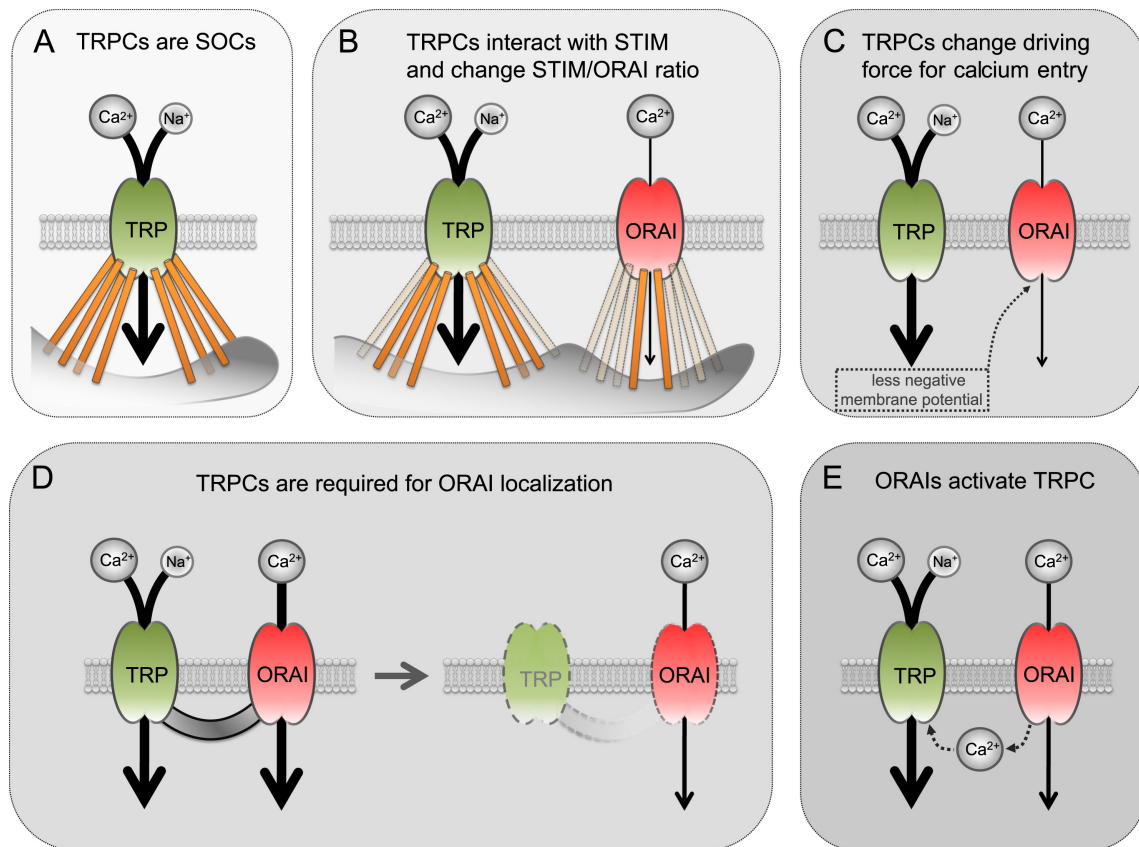


Figure 27: Schéma illustrant cinq hypothèses d'interaction entre les canaux TRP et Orai à savoir que certains TRP peuvent être activés par les protéines Stim (A), leur activation modifie alors le ratio Stim/Orai et donc l'influx de calcium par Orai (B). Les TRP étant des canaux cationiques non sélectifs, l'influx d'ions  $\text{Na}^+$  va modifier la force motrice du calcium et réduire l'influx calcique par Orai (C). Les TRP peuvent également servir de point d'ancrage du cytosquelette à la MP et participer à la localisation des canaux Orai (D). Enfin, l'influx calcique par Orai exerce un rétrocontrôle sur certains canaux TRP (E). (revue de Saul S. et al., 2013)

L'épiderme des souris TRPV6<sup>-/-</sup> est plus fin surtout au niveau des couches granuleuse et squameuses avec des dermatites (Bianco et al., 2007). Ce canal, dont l'expression est stimulée par la vitamine D (van de Graaf et al., 2004), n'est présent qu'à partir des couches suprabasales de l'épiderme où il participe à la différenciation des kératinocytes (Lehen'kyi et al., 2011b). L'expression des canaux TRPV1, 2 et 3 varie également en cas de rosacées cutanées (Sulk et al., 2012).

- **TRPA1** : est un canal activé par le froid (<17°C), ou par des substances irritantes (moutarde, formaldéhyde, nicotine...) qui participe activement à la formation et au maintien de la barrière cutanée en induisant la sécrétion des granulocytes et l'expression de protéines d'adhésion nécessaires à la différenciation. Cependant, tout comme TRPV1, l'activation de ce canal est pro-inflammatoire. L'expression de ce canal augmente dans les kératoses actiniques (solaires) (Fusi et al., 2014).

- **TRPMs** : De nombreux membres de cette sous-famille sont exprimés dans les mélanocytes de l'épiderme et sont impliqués dans le développement des mélanomes (Guo et al., 2012) mais, pour l'instant, TRPM8 est l'un des seuls à avoir été étudié dans la biologie des kératinocytes. C'est également un canal activé par le froid (<26°C), le menthol ou l'icilline, qui accélère la régénération de la barrière épidermique in vivo (Denda et al., 2010).

- **TRPCs** : Tous les canaux de cette sous-famille ont été détectés dans les kératinocytes et préférentiellement dans les kératinocytes différenciés où ils participent à la différenciation terminale. Ces canaux sont tous activés par l'hydrolyse du PIP<sub>2</sub> mais par des voies différentes (pour revue, voir Cheng et al., 2013), par exemple par le DAG pour TRPC7 (Beck et al., 2006a), TRPC3 et TRPC6 (Hofmann et al., 1999), par des triterpènes pour TRPC6 (Woelfle et al., 2010; Müller et al., 2008) et peuvent être impliqués dans le SOCE comme TRPC1 et TRPC4 (Tu et al., 2005; Fatherazi et al., 2007). Tous ces canaux sont moins exprimés dans le psoriasis, TRPC6 diminue dans les dermatites atopiques (Sun et al., 2012) et le psoriasis (Leuner et al., 2011) tandis que l'influx calcique permis par TRPC1 est bien plus important dans la maladie de Darier provoquant une hyper- et dyskératose (Pani et al., 2006b).

- **Orai1** : Les premières données sur le canal Orai1 dans l'épiderme ont été obtenues par constatation morphologique de la peau des souris Orai1<sup>-/-</sup> qui est très fine avec perte de poils (Gwack et al., 2008). Par la suite, il a été montré que ce canal est impliqué dans la synthèse de mélanines, la prolifération des mélanocytes (Stanisz et al., 2012) et des kératinocytes (Numaga-Tomita and Putney, 2013). Orai1 paraît donc être un acteur essentiel à la formation de la barrière cutanée d'autant plus que certains variants génétiques de Orai1 détectés chez l'homme prédisposent aux dermatites atopiques (Chang et al., 2012).

- **Interactions entre les TRP et Orai** : La découverte de ces deux familles de canaux est encore relativement récente et une nouvelle approche commence à émerger offrant une multitude d'interactions possibles entre eux. La co-expression de ces canaux dans les kératinocytes font de ces cellules un excellent modèle d'étude très récemment développé dans la revue de Stephanie Saul et al., 2013 (Saul et al., 2014). L'auteur décrit 5 modèles d'interactions mettant principalement en jeu TRPC4, Orai1 et STIM1 (Fig.27): 1- Stim1 peut directement activer certains TRPC (Fig.27 A); 2- ce qui va modifier le ratio entre Orai1/STIM1 qui influence l'activité de Orai1 (Fig.27 B);

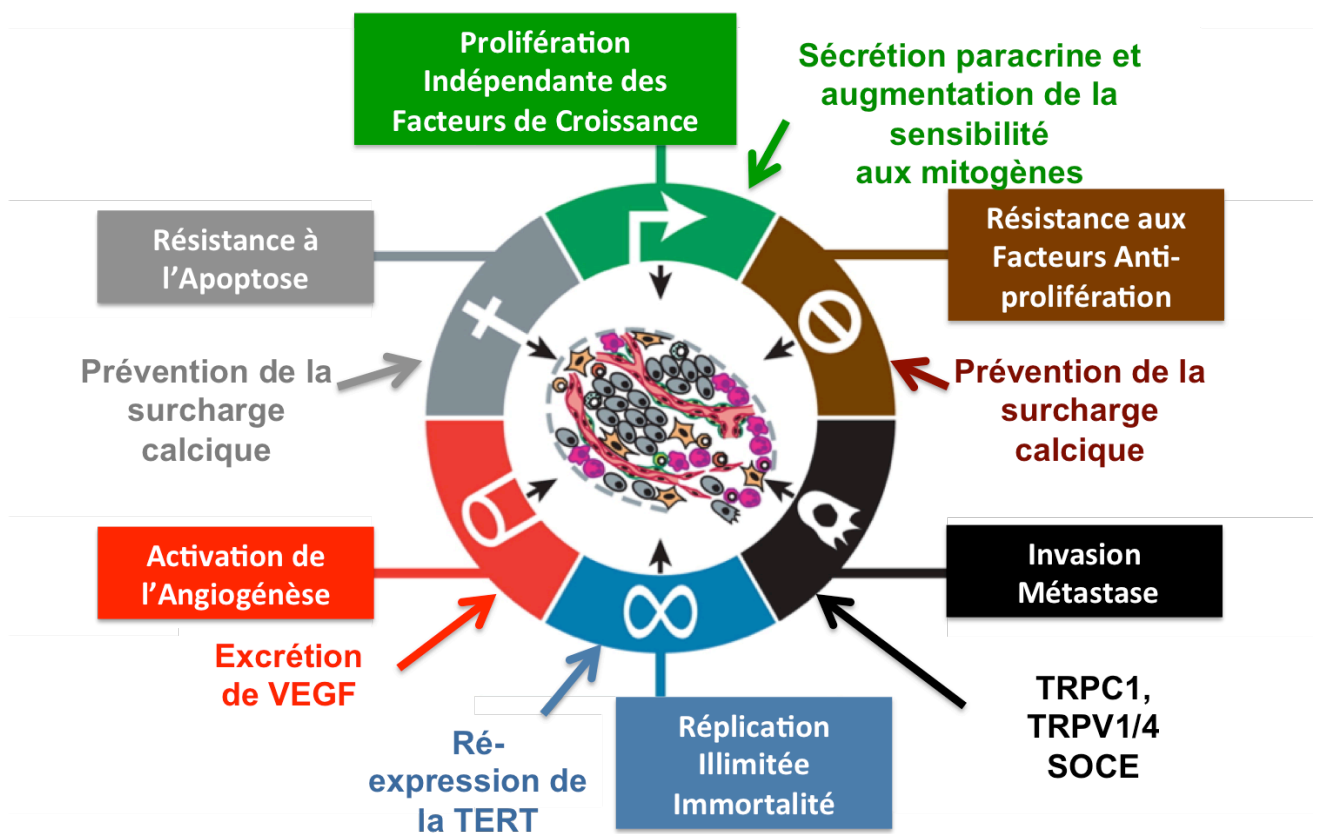


Figure 28 : Implication du calcium dans les caractéristiques du cancer, d'après Hanahan D. & Weinberg RA., 2000.

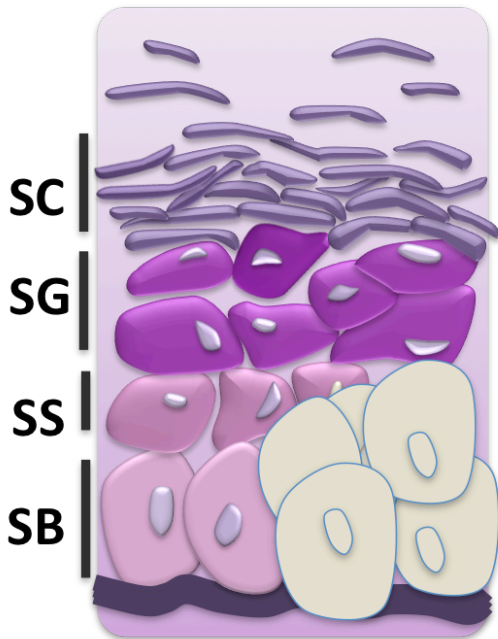
3- or, les TRP comme TRPC1, C4 et TRPM1 sont les canaux les moins sélectifs pour le calcium laissant largement entrer le sodium qui va dépolariser la membrane, diminuer la force motrice du calcium et donc réduire l'influx calcique par Orai1 (Fig.27 C); 4- Il a été montré que TRPC4 est dirigé vers la membrane via les protéines du cytosquelette et sert de point d'ancrage du cytosquelette à la membrane, ce qui induit une relocalisation de la septine requise pour la localisation de Orai1 et l'interaction entre Orai1 et STIM1 (Fig.27 D); 5- Orai1 peut activer les canaux TRPCs dont la plupart sont sensibles au calcium et/ou modifier la sélectivité de TRPC4 qui, en retour selon l'hypothèse 3, va exercer un rétrocontrôle négatif sur Orai1 (Fig.27 E). Il est également connu dans d'autres types cellulaires que les TRPC peuvent s'hétéromériser et être régulés par Orai1 qui modifie alors leurs propriétés électrophysiologiques (Hellwig et al., 2005; Schilling and Goel, 2004; Cioffi et al., 2012).

## ii. Le calcium et les canaux calciques dans les cancers cutanés des kératinocytes

### Rôles du calcium dans les caractéristiques du cancer

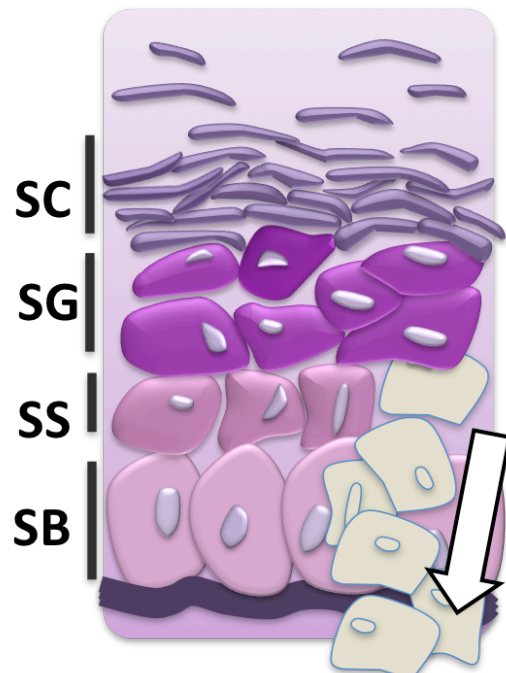
Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération importante et anarchique de cellules qui envahissent et détruisent les tissus sains (Figure 4) puis se disséminent dans l'organisme et forment les métastases. Il découle d'un processus appelé carcinogénèse qui est décrit en trois étapes: l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation correspond à l'altération de l'ADN par un agent carcinogène d'origine chimique, biologique (virus comme dans le cas des papillomavirus, parasites) ou physique (radiations ionisantes et UV). Cette altération est irréversible. Les cellules endommagées ne se divisent plus normalement. La promotion correspond au développement des cellules initiées dans certains tissus déclenché par un agent dit « promoteur de carcinogénèse ». Enfin, la progression des cellules cancéreuses forme des lésions néovascularisées ce qui assure aux cellules tumorales l'apport de nutriments, d'oxygène et des possibilités de dissémination. Or, les cellules cancéreuses se distinguent physiologiquement des cellules saines par 6 caractéristiques (Fig.28) établies par Hanahan et Weinberg (pour revue, voir Hanahan and Weinberg, 2000; Hanahan and Weinberg, 2011), soit: (1) une capacité réplivative illimitée avec (2) une prolifération indépendante des facteurs de croissance et (3) résistante aux inhibiteurs de prolifération, (4) les cellules résistantes à l'apoptose (5) favorisant l'angiogénèse et enfin (6) progressant vers les stades métastatiques par acquisition d'un potentiel invasif. Aussi, l'un des premiers signes de cancer est une hypercalcémie humorale liée à l'expression, par les cellules cancéreuses, d'une protéine semblable à la PTH (PTH-rp) et qui a les mêmes effets sur l'homéostasie calcique (Broadus et al., 1988). De plus, nous avons vu que le calcium est déterminant dans les différents processus de la physiologie cellulaire. C'est 11 ans après Hanahan et de nombreuses publications que N. Prevarskaya (pour revue, voir Prevarskaya et al., 2011) a détaillé comment les canaux ioniques, et principalement les canaux perméables au calcium, interviennent dans les caractéristiques du cancer.

### Cancer Baso cellulaire (BCC)



1<sup>ère</sup> cause de cancer  
80% des cancers de la peau  
Ne métastase pas

### Cancer Spino cellulaire (SCC)



2<sup>de</sup> cause de cancer  
16% des cancers de la peau  
Peut métastaser

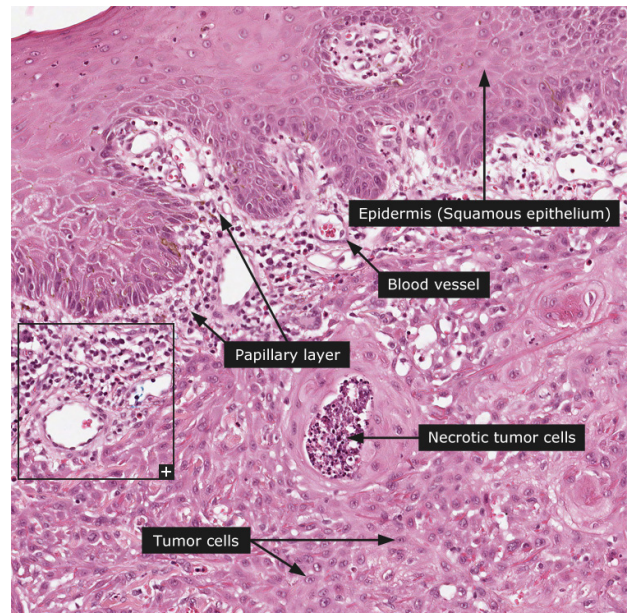
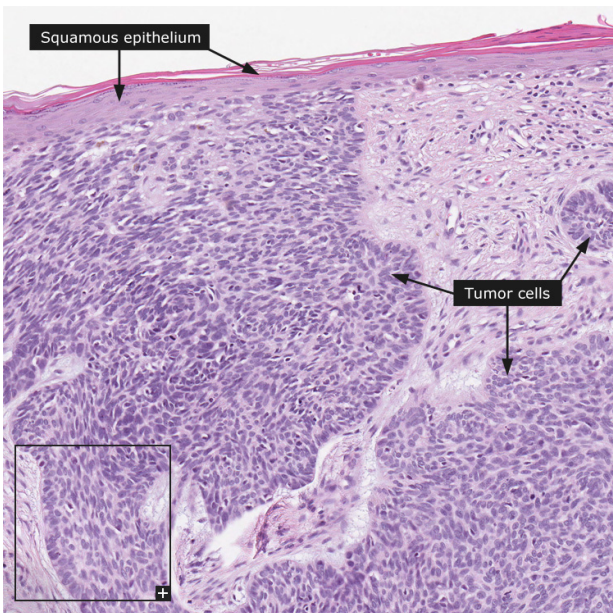


Figure 29 : Photographies de coupes transversales de cancers cutanés baso- et spino-cellulaire colorées au trichrome et accompagnées de schémas simplifiés de ces cancers. (Source :<http://www.proteinatlas.org/dictionary/cancer/skin+cancer+1>).

Il y est montré que le remodelage des canaux ioniques comme les canaux TRP dans les cellules cancéreuses peut stimuler la sécrétion paracrine de facteurs de croissance favorisant la survie cellulaire (Insulin Growth Factor – IGF) et la vascularisation (Vascular Epithelial Growth Factor - VEGF).

### **Implication du calcium dans des cancers cutanés baso- et spino-cellulaires**

En vieillissant, la peau perd ses caractéristiques morphologiques et structurales et par conséquent toutes les fonctions physiologiques qu'elle remplit sont affectées (voir II-A). Cela s'observe par l'apparition de diverses pathologies liées à l'âge dont les lésions pré-malignes du lentigo malin et de la kératose actinique, les lésions malignes des carcinomes basocellulaires (BCC), spinocellulaires (SCC) et les mélanomes, aussi bien que les modifications bénignes de la peau telles que des kératoses séborrhéiques, des sécheresses cutanées (xéroses), le creusement de rides profondes dans une peau atrophiée et inélastique, la télangiectasie (rougeurs dues à des dilatations vasculaires), lentiginos (tâches brunes), ou d'autres modifications pigmentaires.

Le cancer de la peau touche de plus en plus de personnes en France et en Europe. On observe une augmentation de 5 à 7% par an en Europe. En France, 50 000 carcinomes et 7 000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués par an. Dans les populations à phototype clair, une augmentation par 2 du nombre de cancers de la peau entre 2000 et 2015 a été estimée. Les études épidémiologiques concluent que 50% des personnes de plus de 65 ans auront au moins un cancer de la peau au cours de leur vie (<http://www.skincancer.org/skin-cancer-information/skin-cancer-facts>).

Les carcinomes représentent 90% des cancers de la peau et les plus fréquents touchent les kératinocytes mais ils peuvent aussi se développer à partir des cellules de Merkel, des glandes sébacées et des glandes sudoripares. Ces deux carcinomes des kératinocytes progressent lentement, ils ne sont pas mortels, touchent les plus de 50 ans, mais le fait qu'ils ne soient pas douloureux retarde la consultation chez le médecin et leur traitement. Les mélanomes ne représentent que 10% des cancers de la peau mais sont bien plus agressifs et sont responsables de 75% des causes de décès par cancers de la peau.

➤ **Le carcinome basocellulaire (BCC)** est le carcinome le plus fréquent (Spates et al., 2003). Il se caractérise par l'apparition d'une tâche blanchâtre à partir d'environ 45 ans puis progresse en un ulcère au niveau du visage, de la chevelure ou du cou dans 75% des cas (Snow et al., 1994). Il est deux fois plus fréquent chez l'homme et généralement décelé entre 45 et 65 ans (von Domarus and Stevens, 1984; Martin et al., 2000) et l'incidence suit une courbe exponentielle avec l'âge (Bulliard et al., 2009). Cette tumeur se développe au niveau de la couche basale de l'épiderme et reste nodulaire mais peut parfois infiltrer le derme (Fig.29). Cependant, il reste le carcinome cutané le moins agressif car il métastase très rarement (0,03%), après 9 ans en moyenne (Lo et al., 1991; von Domarus and Stevens, 1984) et approximativement 20% des BCC régressent spontanément ce qui les rend d'un grand intérêt scientifique. Il résulte de l'activation de la voie Hedgehog (Xie et al., 1998; Hahn et al., 1996; Johnson et al., 1996) dans les cellules progénitrices de la couche basale de

l'épiderme interfolliculaire et infundibulaire (Youssef et al., 2010). Dans ces kératinocytes cancéreux, la diminution d'expression des canaux TRPC1 et TRPC4 est à l'origine d'une perte de la capacité de différenciation induite par le calcium (Beck et al., 2008). Or, le TriSulfide d'Allyl (DATS), contenu dans l'extrait d'ail, a un effet anti-tumoral sur les BCC en stimulant l'apoptose des cellules cancéreuses suite à une accumulation de ROS intracellulaires, une modification du potentiel de la membrane mitochondriale ainsi qu'un stress réticulaire associé à une grande mobilisation calcique (Wang et al., 2012).

➤ **Le carcinome spinocellulaire (SCC)** comptera, selon des estimations récentes, plus de 700 000 nouveaux cas chaque année aux Etats-Unis, et le taux d'invasions métastatiques est tel que le SCC cause déjà autant de décès que le mélanomes et les carcinomes du rein et du pharynx (Karia et al., 2013). Ce carcinome se présente sous la forme d'une lésion aux bords irréguliers et métastase au niveau des ganglions lymphatiques à proximité. Le SCC naît de la couche épineuse de l'épiderme et envahit la couche basale puis le derme.

Il est connu depuis 1984 que le  $Ca^{2+}$  ne stoppe pas la croissance des cellules issues de SCC initiant seulement la différenciation (Brysk et al., 1984) ce qui n'est dû ni à une diminution de la sensibilité au calcium extracellulaire ni, contrairement au BCC, à une diminution de l'influx calcique mais à un défaut dans la voie de transduction activant la différenciation (Pillai et al., 1991). En effet, il semblerait qu'au cours de la progression tumorale, les cellules SCC perdent l'inhibition exercée par la MAP Kinase p38, sur la voie Erk1/2 qui stimule l'expression calcium-dépendante de la métalloprotéinase de la matrice MMP9 (Mukhopadhyay et al., 2004), ainsi que l'expression de la PKC $\alpha$  induite par le calcium et nécessaire à l'expression de l'IVL et de la TGM (Yang et al., 2003). Il a pourtant été montré que l'expression de TRPV4 diminue dans les stades précoces des lésions tumorales suite à l'augmentation de l'excrétion paracrine d'IL-8 (Fusi et al., 2014).

De plus, ces cellules sécrètent la protéine type hormone PTH (PTH-rP) à l'origine d'une hypercalcémie qui agit de manière paracrine et stimule la libération de fibronectine (un substrat de MMP9 dans la MEC) à la suite d'une augmentation de calcium cytoplasmique via l'activation de la PLC (Orloff et al., 1996). Or, selon une étude de Bradley PJ & Hoskin D. en 2006 (Bradley and Hoskin, 2006), les patients atteints d'un carcinome cutané tête/cou et présentant une calcémie anormalement élevée ont un faible pronostic vital et il est préconisé de coupler à une radio- ou chimio-thérapie adaptée, un traitement diminuant la calcémie afin d'accroître les chances de rémission des patients (Bradley and Hoskin, 2006; Nicolae and Schipor, 2010). Il semblerait donc que pour les cellules SCC, le calcium stimule l'invasion plutôt que la différenciation. Cela a été montré en utilisant le carboxyamido-triazole, un inhibiteur aspécifique de l'influx calcique, sur des lignées de cellules SCC mais aussi de cancer du sein et de la prostate, ce qui diminue effectivement l'expression des MMP2 et MMP9 et réduit le potentiel invasif des cellules tumorales (Wu et al., 1997; Lambert et al., 1997; Wasilenko et al., 1996). Le polymorphisme d'un seul nucléotide du domaine cytoplasmique du CaSR est nécessaire et suffisant à la sécrétion de la PTH-rP dans le SCC pulmonaire car la diminution du seuil d'activation du récepteur déclenche plus facilement la

sécrétion de la PTH-rP, ce qui exerce un rétrocontrôle positif entre la PTH-rP et le calcium (Lorch et al., 2011).

Chez l'homme la perte d'une copie de SERCA2 provoque la maladie de Darier (Burge and Wilkinson, 1992) tandis que la souris SERCA2<sup>+/-</sup> est caractérisée par une forte prédisposition au SCC (Liu et al., 2001) passant par les mêmes voies que la maladie de Darier chez l'Homme avec une grande sensibilité des kératinocytes aux variations de calcium affectant à la fois leur prolifération et leur différenciation (Li et al., 1995; Lowry et al., 1996; Zhao et al., 2001). Les mutations des autres pompes calciques réticulaires (SERCA) ou membranaires (PMCA) n'ont pas d'effet notable sur l'épiderme (pour revue, voir Prasad et al., 2004).

TRPC6 est très exprimé dans les SCC érophagiens, associé à un faible pronostic vital (Zhang et al., 2013b), où il serait impliqué dans la prolifération cellulaire si bien que son inhibition stoppe le cycle cellulaire en G2/M (Shi et al., 2009; Ding et al., 2010). Dans le cas de SCC tête/cou, il y a aussi une forte amplification génomique du site chromosomique 11q21-q22.2 correspondant au gène codant TRPC6 bien que l'inhibition de l'expression du gène ne provoque que la diminution du potentiel invasif tumoral et pas de la prolifération cellulaire (Bernaldo de Quirós et al., 2013). Or, TRPV6 est un canal constitutivement actif et l'augmentation potentielle de celui-ci à la membrane suite à l'augmentation de son expression pourrait engendrer un large influx calcique qui n'induirait pas la voie de différenciation, défectueuse dans les cellules SCC, mais plutôt le potentiel invasif peut être via la synthèse de MMP9 et la dégradation de la fibronectine. Cette année, Zhu H. et ses collaborateurs ont révélé Orai1 comme marqueur de faible pronostic vital pour un SCC oesophagien en expliquant que l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules SCC est due à l'augmentation de l'expression de Orai1 à l'origine d'une fréquence d'oscillation calcique anormalement élevée par rapport à des cellules épithéliales saines (Zhu et al., 2014).

Enfin, dans une revue de Greco DS. parue en 2012, l'auteur montre que des désordres endocriniens à l'origine d'une hypercalcémie prédisposent non seulement au développement de SCC mais également de lymphomes et/ou de défaillances rénales chroniques.

Nous avons vu jusqu'ici que le calcium est impliqué dans un grand nombre de mécanismes cellulaires permettant de maintenir l'homéostasie et le bon fonctionnement tissulaire mais dont la dérégulation peut conduire au développement de pathologies plus ou moins invalidantes. Cela fait des canaux et autres acteurs de la signalisation calcique des cibles de choix dans bon nombre de pathologies que nous pourrions connaître au cours de notre vie. En effet, depuis le jour de notre naissance, le vieillissement de notre organisme est programmé par des facteurs génétiques auxquels s'ajoutent des facteurs extérieurs, environnementaux ou comportementaux, qui modulent le dysfonctionnement progressif des organes. Or, de nombreuses pathologies liées à l'âge présentent une signature calcique aberrante par rapport à l'état physiologique ce qui est largement détaillé dans la revue de L. Missiaen (Missiaen et al., 2000). Nous allons montrer dans la suite que l'homéostasie calcique est dérégulée au cours du vieillissement et que cela peut avoir un impact sur la physiologie cellulaire.



# Calcium regulation

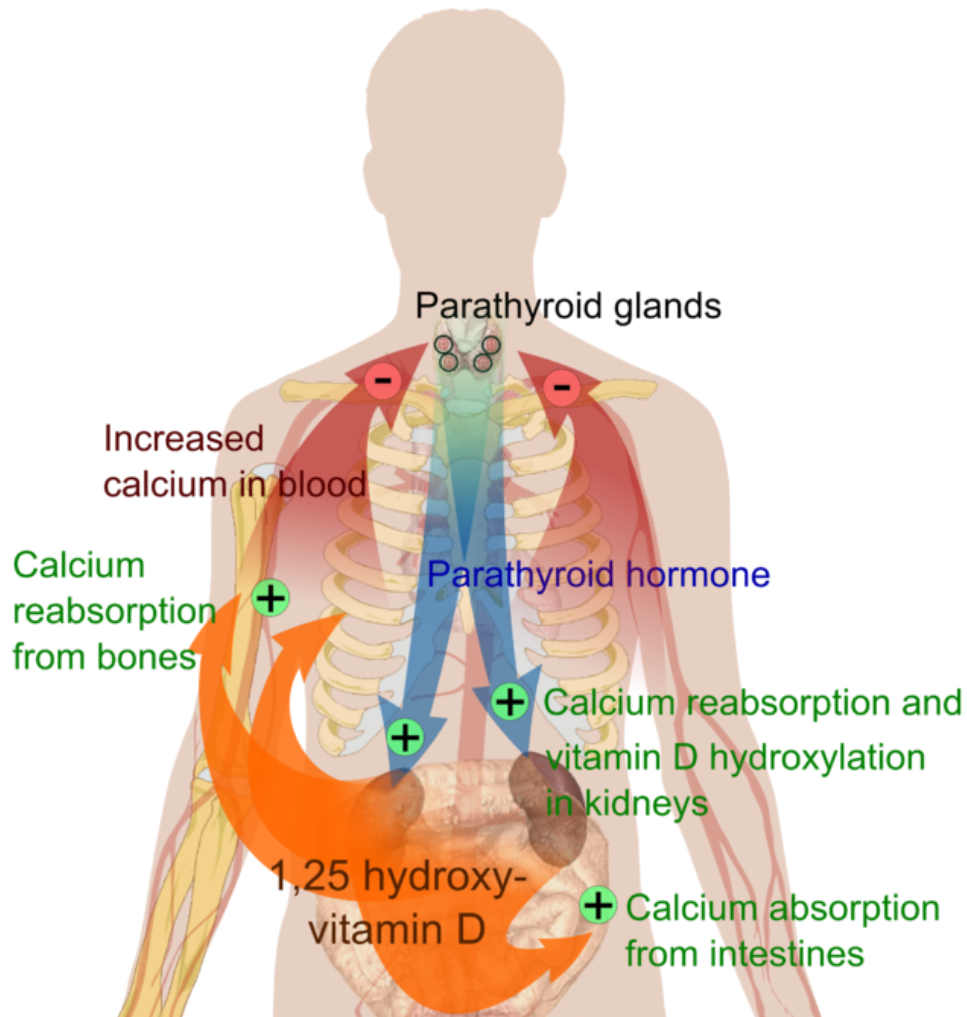


Figure 30 : Schéma de la régulation du taux plasmatique de calcium par les hormones parathyroïdiennes et la 1,25 hydroxyvitamine D. (Source : Page 1094 (The Parathyroid Glands and Vitamin D) in: Walter F., PhD. Boron (2003). Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach. Elsevier/Saunders. pp. 1300. ISBN 1-4160-2328-3).

### III. IMPLICATION DU CALCIUM DANS LE VIEILLISSEMENT

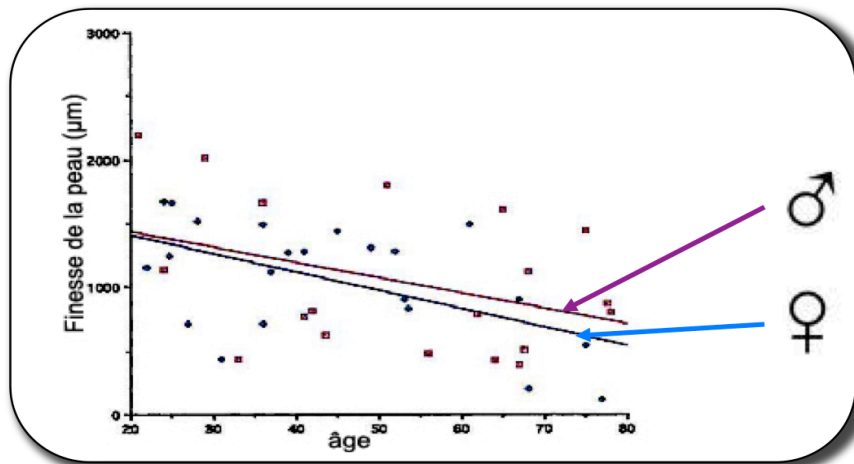
#### A. Augmentation du calcium plasmatique avec l'âge

##### 1. Régulation du calcium plasmatique

Le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmatique est régulé par l'absorption intestinale, la filtration rénale ainsi que par la minéralisation osseuse. En effet, le  $\text{Ca}^{2+}$  que nous absorbons par notre alimentation (et surtout dans l'eau que nous buvons) passe dans le sang par absorption intestinale. Ainsi, lorsque nous consommons 200 mg/jour de  $\text{Ca}^{2+}$  nous en absorbons entre 15 et 40% (Sheikh et al., 1988). Puis, le calcium est filtré par les reins qui régulent la réabsorption du calcium dans le plasma afin de maintenir un taux moyen compris entre 90 mg/L et 105 mg/L. Généralement dans les conditions physiologiques les glomérules filtrent environ 10 g/jour de  $\text{Ca}^{2+}$  dont seulement 1 à 3% sont excrétés dans les urines (Friedman and Gesek, 1993). Dans le sang, 50% du  $\text{Ca}^{2+}$  est sous forme libre ionisée et 50% est sous forme liée (à des protéines 40% et complexes inorganiques 10%). De plus, les os contiennent 98 à 99% du  $\text{Ca}^{2+}$  de notre organisme ce qui en fait la plus importante réserve et un « organe » crucial dans l'homéostasie calcique. La régulation du calcium plasmatique est principalement sous le contrôle des hormones hypercalcémiantes PTH (ParaThyroïde Hormone), de la forme active de la vitamine-D (1,25-dihydroxycholécalférol) et de la calcitonine hypocalcémiante (Fig.30). La PTH et la 1,25-dihydroxycholécalférol augmente le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sang en stimulant l'absorption du  $\text{Ca}^{2+}$  par le duodénum, la réabsorption rénale en augmentant notamment l'expression du canal calcique TRPV5 et en initiant la différenciation des ostéoclastes provoquant l'ostéolyse. Cependant, à des concentrations physiologiques, il a été montré que la vitamine D favorise la minéralisation osseuse. La PTH favorise l'hydroxylation de la 25-hydroxy-vitamine D par les reins en 1,25-dihydroxycholécalférol qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de PTH par les glandes parathyroïdiennes. La calcitonine diminue le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmatique en inhibant les ostéoclastes et agit indirectement sur l'absorption intestinale en inhibant l'activation de la vit-D par les reins et diminue leur réabsorption de  $\text{Ca}^{2+}$ . La minéralisation osseuse est également sous contrôle d'hormones féminisantes (pour revue, voir Talmage et al., 2000; Taylor and Tovey, 2012).

##### 2. Vieillessement des organes à l'origine de l'augmentation du calcium plasmatique au cours du vieillissement

La première observation de l'augmentation du calcium plasmatique avec l'âge (hommes et femmes de plus de 50 ans) a été faite par A. Elkeles en 1957. Il est ressorti de ces travaux la théorie du « shift of calcium » laquelle relie la déminéralisation osseuse à l'augmentation de calcium ionisé dans le sang et le dépôt de calcium sur les organes mous provoquant entre autre l'artériosclérose (Elkeles, 1957).



- ❖ Affinement d'environ 7% tous les 10 ans
  - ❖ Amincissement de l'épiderme et du derme
- **Barrière physique affaiblie**  
→ **Sensibilité accrue**

Figure 31 : Amincissement de l'épiderme au cours du vieillissement, d'après Robert et al., 2009.

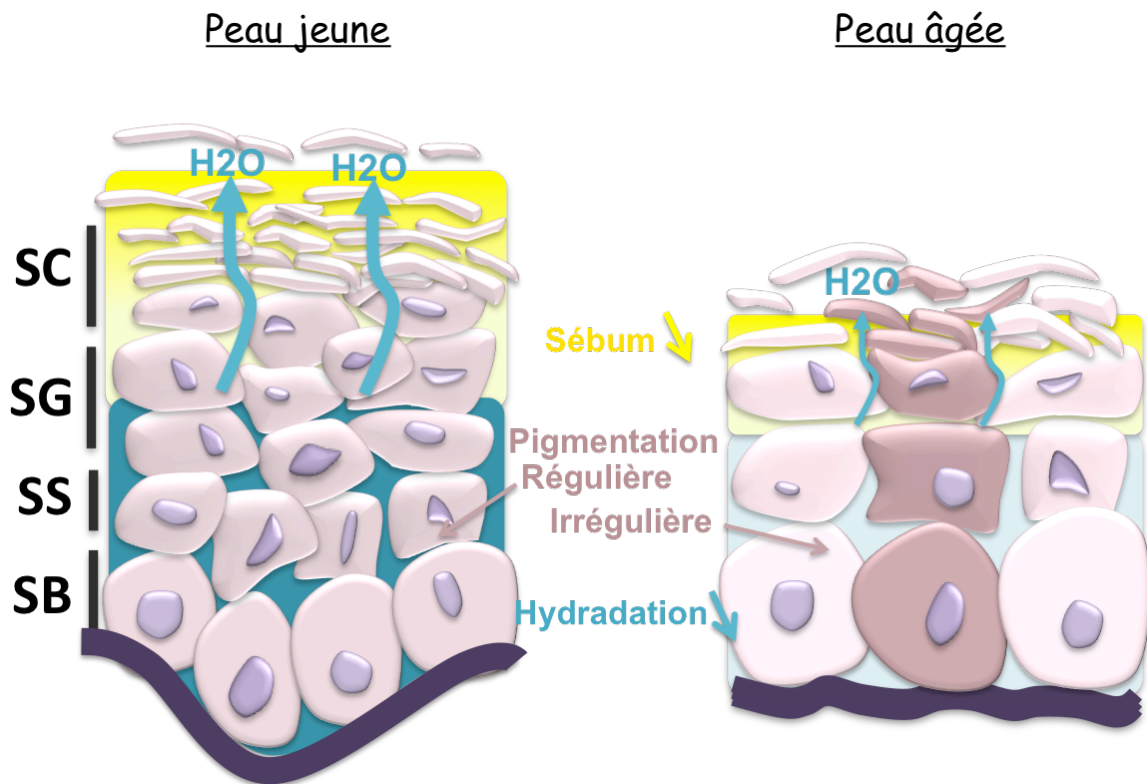


Figure 32 : Schéma de la physiologie de l'épiderme au cours du vieillissement.

En effet, il a été montré par la suite qu'au cours du vieillissement, le système endocrinien est perturbé soit, à cause d'une perte neuronale régulant l'axe hypothalamo-hypophysaire soit, par des dysfonctionnements des organes impliqués dans la synthèse hormonale, en résulte une augmentation plasmatique en PTH, une diminution de la vitamine D et, par conséquent, une hypercalcémie (pour revue, voir Park and Yeo, 2013).

- **La thyroïde et les glandes parathyroïdiennes**

L'hypertrophie thyroïdienne et l'hypoparathyroïdisme sont deux des 3 pathologies endocriniennes les plus fréquentes après la ménopause (Minisola, 2012). L'hyperparathyroïdisme peut être primaire, lorsqu'elle est due à une suractivité de la glande elle-même, ou secondaire lorsque cela est provoqué par le dysfonctionnement d'un autre organe tel qu'une déficience en vit-D ou une insuffisance rénale chronique. Cela induit une sécrétion excessive de PTH et donc une calcémie.

- **Os et cartilage**

Avec le vieillissement des ostéocytes et le statut hormonal favorisant les ostéoclastes, l'os subit progressivement une importante déminéralisation conduisant à son affaiblissement et à l'ostéoporose entraînant de nombreuses fractures chez les personnes de plus de 65 ans.

- **Le rein**

Le rein est l'organe dont les modifications morfo-anatomiques sont les plus flagrantes avec l'âge. En effet le volume du cortex et le nombre de glomérules diminuent ainsi que le taux de filtration qui baisse de 50% après 80 ans. L'absorption de calcium alimentaire n'étant plus suffisante, cela stimule encore la PTH et l'ostéolyse. De plus, l'activation de la vit-D, sous l'effet de la PTH dans le rein, diminue avec l'âge et par conséquent le rétrocontrôle de la sécrétion de PTH aussi (Gallagher, 2013).

- **La peau**

Après 20 ans, toutes les couches de la peau s'affinent de plus en plus, en moyenne de 6,7% tous les 10 ans, ce qui est aggravé par l'exposition aux UVs (Fig.31) (Boss and Seegmiller, 1981; Branchet et al., 1990; pour revue, voir Waller and Maibach, 2005; Robert et al., 2009). En effet, il y a une diminution de nombre de kératinocytes et de la vitesse de renouvellement de l'épiderme avec le vieillissement. Tandis que la taille moyenne des cellules basales augmente, les kératinocytes des couches supra-basales deviennent plus courts et plus épais (Grove, 1989). La jonction dermo-épidermique s'aplatit avec une perte des papilles dermiques et donc une diminution de la surface d'absorption, une diminution de la résistance aux contraintes mécaniques et un détachement derme-épiderme facilitant la formation des rides (pour revue, voir Lavker et al., 1986; Levakov et al., 2012). Il n'y a pas de différence dans la fonction de barrière cutanée mais un ralentissement net de la reconstruction après une agression physique ou chimique (Ghadially et al., 1995a). La production de sébum diminue tout comme la production de NMF réduisant alors la capacité de rétention d'eau et l'hydratation de la couche cornée ce qui est sans doute à l'origine de la diminution de la TWEL (Farwick et al., 2014). L'activité enzymatique des mélanocytes diminue de 8 à 20% tous les 10 ans provoquant une pigmentation irrégulière (pour revue, voir Ortonne, 1990) (Fig.32). De plus, il y a également une réduction de moitié du nombre de cellules de Langerhans entre 25 et 70 ans ce qui retarde les réactions allergiques et provoque un affaiblissement des défenses immunitaires cutanées (Szewczuk and Campbell, 1980).

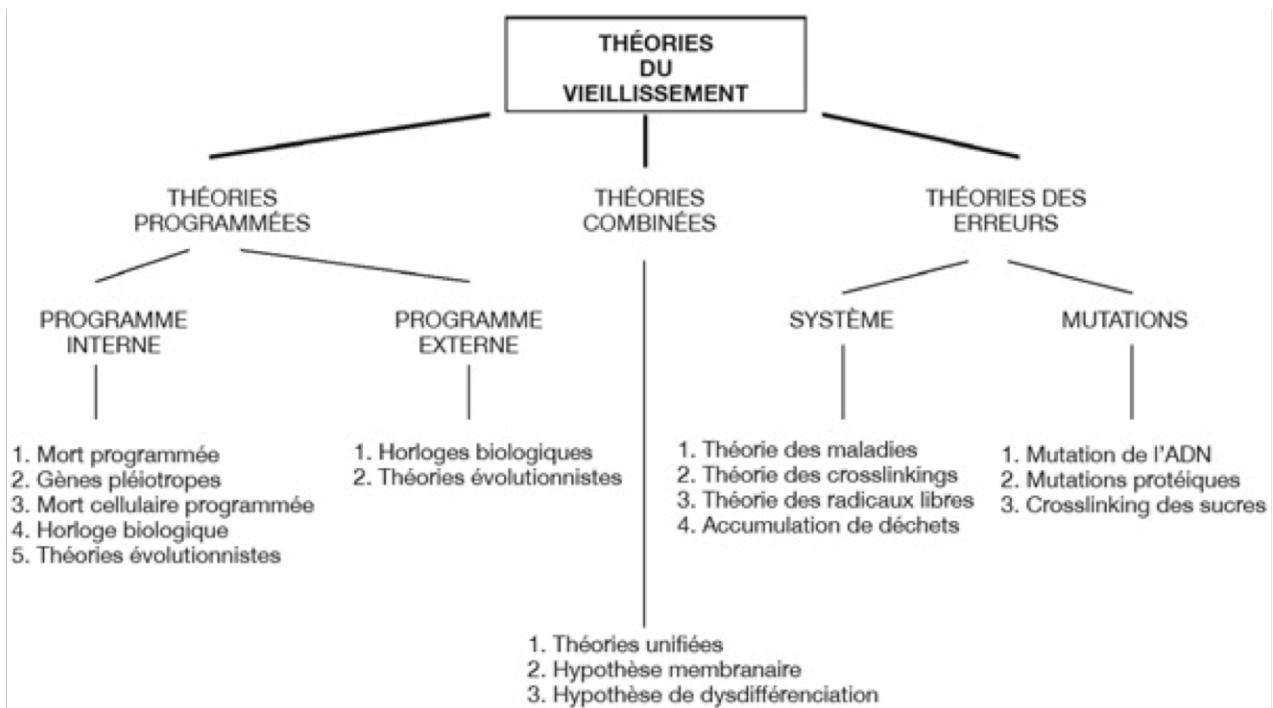


Figure 33 : Les théories du vieillissement (Schéma traduit de Semsei et al., 2000)

Toutes ces modifications entraînent des démangeaisons plus fréquentes tout comme une faible sensibilité retardant les sensations douloureuses après 50 ans, chez les femmes, ce qui accroît le risque de blessure qui, en plus d'une réduction de la vitesse de cicatrisation, peut poser de gros problèmes de santé allant jusqu'à la mortalité post-opératoire (Grove, 1989). Enfin, il a été montré que l'épiderme facial synthétise moins de vitamine D chez les femmes de plus de 50 ans (Chang et al., 2010).

## **B. Le vieillissement : théories et caractéristiques cellulaires**

Le vieillissement est caractérisé par une perte progressive de l'intégrité physiologique causant des dysfonctionnements et augmentant la vulnérabilité face à la mort. La recherche sur le vieillissement a vraiment fait un bond depuis les années 2000 lorsque I. Semsei a compilé les différentes théories de « la nature du vieillissement » (Semsei, 2000). A ce moment, il y avait deux grandes théories du vieillissement, la théorie programmée et la théorie des erreurs. La première est gouvernée par des facteurs externes et internes qui déterminent une horloge biologique du vieillissement tandis que la seconde serait la cause de facteurs de destruction provoquant des erreurs de réplication et une dérégulation de la réparation des mutations provoquant la sénescence cellulaire. Dans cette revue, l'auteur développe la théorie combinée, sommation des facteurs internes et externes agissant de concert dans le vieillissement (Fig.33).

Treize ans après les théories de Semsei et de nombreuses publications sur le sujet, l'équipe de G. Kroemer (López-Otín et al., 2013) a efficacement ressorti 9 caractéristiques du vieillissement (Fig.34). Celles-ci doivent satisfaire 3 critères : 1- Se manifester au cours du vieillissement "normal", 2- L'aggravation expérimentale doit accélérer le vieillissement, 3- L'amélioration expérimentale doit ralentir le vieillissement et ainsi allonger la durée de vie en bonne santé, ce dernier critère étant plus difficile à vérifier. Toutes ces caractéristiques sont basées sur la théorie de l'endommagement à l'ADN et ont été classées en 3 groupes : Les caractéristiques primaires, à l'origine de l'endommagement, les caractéristiques secondaires antagonistes, en réponse à l'endommagement et les caractéristiques intégratives, responsables du phénotype vieillissant.

### **1. Caractéristiques primaires du vieillissement cellulaire**

Le point commun entre toutes ces caractéristiques est qu'elles sont sans équivoque négatives pour la survie cellulaire et donc favorisent le vieillissement.

#### **i. L'instabilité génomique**

Elle est due à l'endommagement de l'ADN et à l'accumulation d'erreurs lors de la réplication suite au dysfonctionnement des systèmes de réparation de l'ADN et des points de contrôle du cycle cellulaire ce qui s'amplifie au cours du temps (Moskalev et al., 2013).



Figure 34 : Les caractéristiques du vieillissement. (Traduit de Lopez-Otin C. et al., 2013)

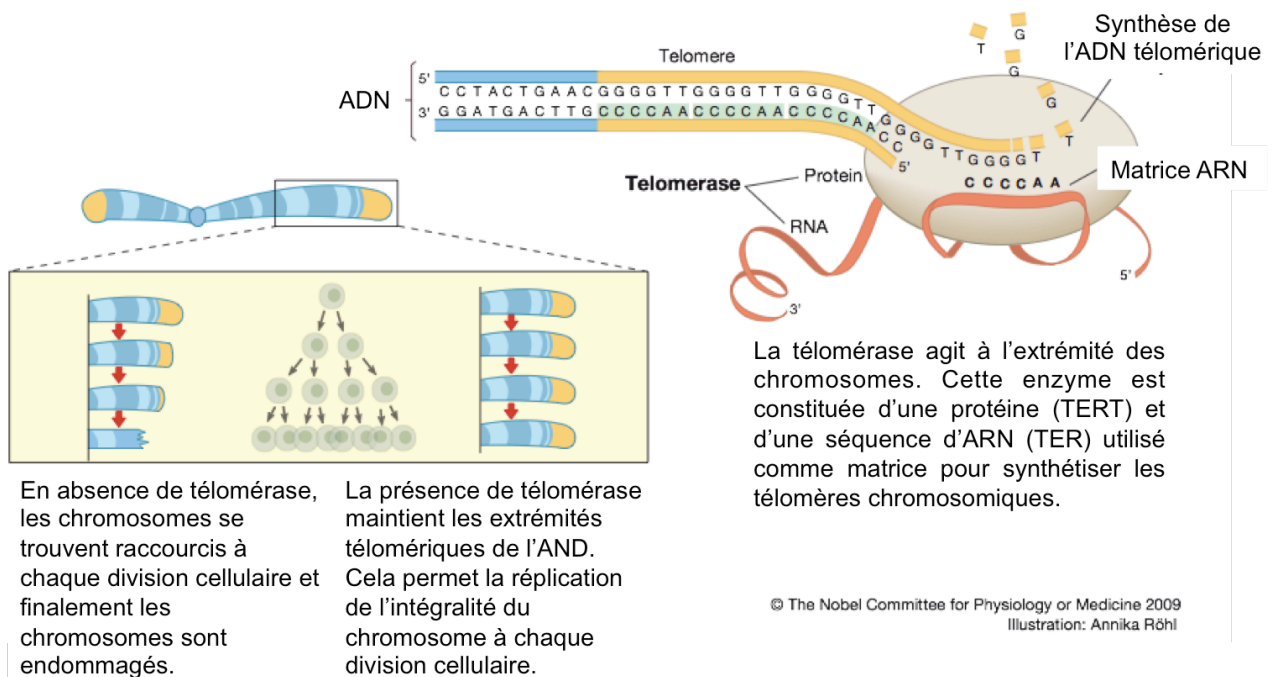


Figure 35 : Raccourcissement télomérique au cours des divisions cellulaires (Traduit de © The Nobel Committee for Physiology or Medicine, 2009, illustration de Annika Röhl.)

Il a été notamment montré que la plupart des erreurs dans l'ADN mitochondrial, chez la souris adulte, sont le résultat d'un dysfonctionnement de réplication lié à l'ADN polymérase gamma et non pas ceux de l'accumulation de ROS, ce qui affecte progressivement la chaîne respiratoire mitochondriale (Ameur et al., 2011; pour revue, voir Sevini et al., 2014). Il peut alors y avoir une accumulation des différentes mutations (délétion, addition, « mismatch », insertion de transposons), des « cross-over », la formation d'épingle à cheveux, de tours dans les double-brins, de cassures double- ou simple-brin ou encore le raccourcissement progressif des télomères (extrémités des chromosomes) qui déstabilisent l'ADN. Ainsi, la surexpression chez la souris de BubR1, une enzyme impliquée dans le point de contrôle cellulaire avant séparation des chromatides, protège les cellules de l'aneuploïdie, du cancer et allonge la durée de vie (Baker et al., 2013). Les modifications architecturales du noyau en cas de laminopathies déstabilisent également l'ADN à l'origine d'un syndrome de vieillissement prématuré (progéria) (Worman, 2012).

## ii. Le raccourcissement télomérique

Les télomères sont des séquences non codantes hautement répétitives du motif –TTAGGG– se situant à chaque extrémité des chromosomes. Ils forment une boucle (T-Loop) stabilisée par des protéines de la famille TRF (Telomeric Repeat Binding Factor) permettant la protection et la stabilité de l'ADN ainsi que l'accrochage des chromosomes au noyau et cytosquelette nucléaire. C'est la télomérase, une transcriptase inverse qui est en charge de la réplication des télomères au cours de la mitose. Cependant, il a été montré que l'activité de cette télomérase diminue avec l'âge qui n'est presque plus exprimée dans la plupart des cellules somatiques adultes expliquant le raccourcissement progressif des télomères (Blackburn et al., 2006; Blasco, 2007). Cette enzyme a été découverte en 1985 par Elizabeth Blackburn et Carol Greider (Greider and Blackburn, 1985), récompensées par le prix Nobel de physiologie et médecine en 2009 (Fig.35). La vitesse de raccourcissement télomérique est bien corrélée à l'espérance de vie des espèces, ce qui a été largement étudié chez les oiseaux, la bernache nonette pouvant vivre jusqu'à 22 ans ne perd en moyenne que 5 bases télomériques par an (Pauliny et al., 2012) et l'océanite cul-blanc qui vit extrêmement longtemps pour un oiseau n'a pas de raccourcissement télomérique mais un allongement (Hausmann et al., 2003). Précédemment, il avait déjà été prouvé que l'expression ectopique de la télomérase confère l'immortalité aux cellules sans provoquer de cancer (Bodnar et al., 1998). La survie des souris déficientes en télomérase vieillissant prématurément est aussi restaurée par la réactivation de l'expression génique de cette enzyme (Jaskelioff et al., 2011). L'activation pharmacologique ou la surexpression de la télomérase dans les souris adultes sauvages allonge la durée de vie (Bernardes de Jesus et al., 2011; Bernardes de Jesus et al., 2012). Enfin, chez l'Homme, des données récentes ont montré que le raccourcissement télomérique est fortement corrélé au risque de décès précoce (Boonekamp et al., 2013).

## iii. L'altération épigénétique

De nombreuses modifications épigénétiques ont été détectées au cours du vieillissement cellulaire et tissulaire (Talens et al., 2012) (Fig.36).



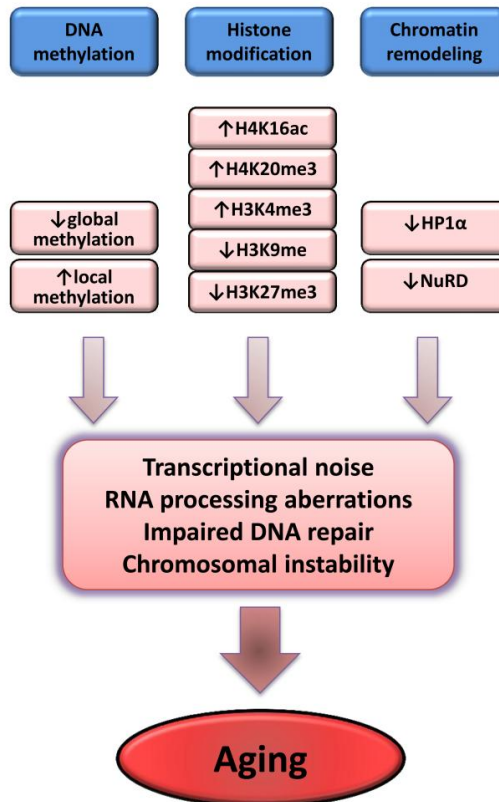


Figure 36 : Altérations épigénétiques accélérant le vieillissement, altération de l'acétylation et/ou la méthylation de l'ADN, des histones ou d'autres protéines de liaison à la chromatine (revue de Lopez-Otin C., et al., 2013)

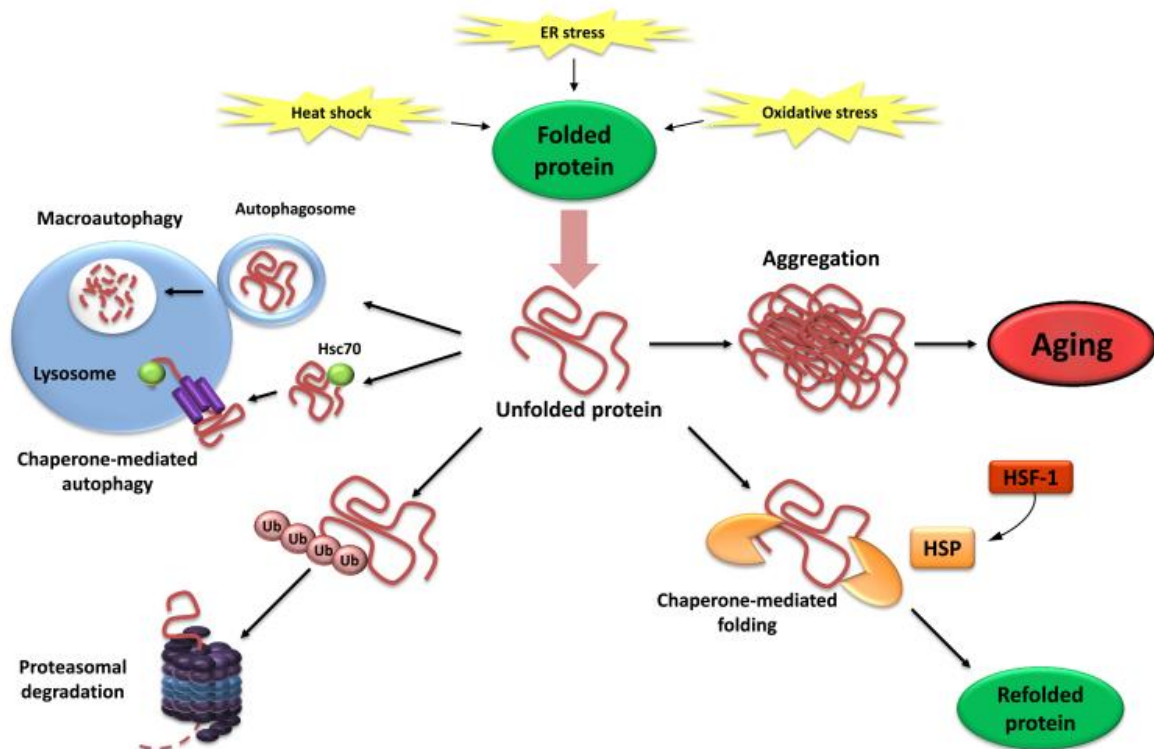


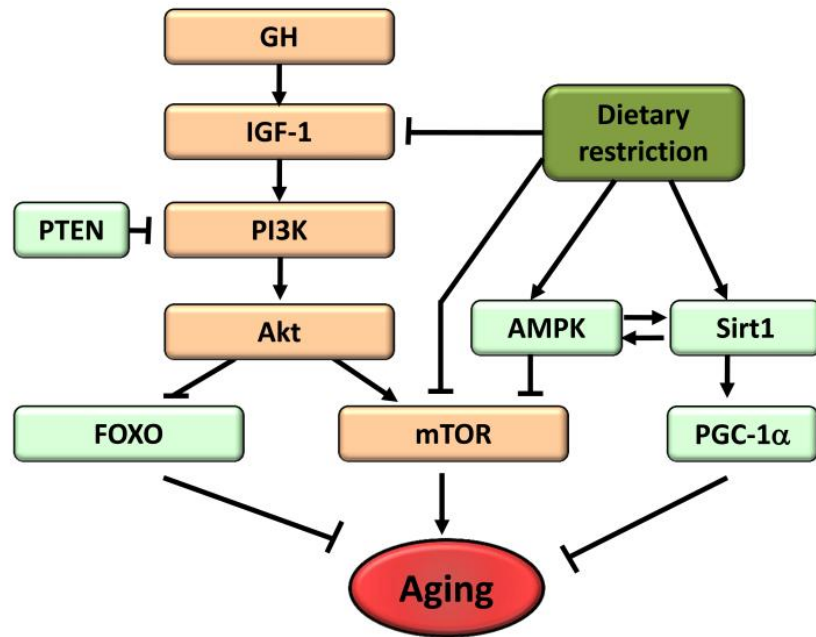
Figure 37 : Une prise en charge déficiente des protéines non fonctionnelles par les systèmes de dégradation (Protéasome, autophagie) ou de repliement (chaperonines, Hsp) provoque leur agrégation toxique pour la cellule (revue de Lopez-Otin. Et al., 2013).

Cela inclut des variations de la méthylation de l'ADN, des modifications post-traductionnelles des histones et un remodelage chromatinien. Ainsi, l'augmentation de l'acétylation de l'histone H4K1, la triméthylation de H4K20 et de H3K4 ou, au contraire, la diminution de la triméthylation de l'histone H3K27 sont des marqueurs épigénétiques du vieillissement (Fraga and Esteller, 2007; Han and Brunet, 2012). Les sirtuines, qui représentent une famille d'enzymes déacétylases ou ADP-ribosyltransférases, ont aussi été identifiées comme des protéines anti-âge et notamment *Sir-2*, l'unique gène codant pour les deux Sirtuines chez les levures, mouches et vers dont la surexpression augmente la longévité (Kaeberlein et al., 1999; Rogina and Helfand, 2004; Tissenbaum and Guarente, 2001). Chez les mammifères, il y a sept Sirtuines distribuées dans les organites (1, 2, 6, 7 dans le noyau ; 1, 2 cytoplasmiques et 3, 4, 5 dans les mitochondries) et nombreuses d'entre elles permettent de retarder le vieillissement chez la souris (Houtkooper et al., 2012; Sebastián et al., 2012). Quant à la méthylation de l'ADN, elle semble être impliquée mais les études sont encore contradictoires et ne seront pas développées ici. Enfin, certaines protéines impliquées dans la conformation de l'ADN sont impliquées dans le vieillissement comme par exemple la protéine HP-1 (Heterochromatin Protein 1) qui inhibe l'expression génique lorsqu'elle est liée à l'hétérochromatine. Lorsqu'une mutation délétère a lieu sur ce gène cela réduit la durée de vie chez la drosophile alors qu'au contraire, sa surexpression allonge la durée de vie de celle-ci (Larson et al., 2012). De manière générale, la modification architecturale de l'ADN favorise en moyenne l'euchromatine et donc la transcription de gènes associés au vieillissement impliqués notamment dans l'inflammation, le stress mitochondriale et la dégradation lysosomale (de Magalhães et al., 2009).

#### iv. Dérégulation de l'homéostasie protéique

Les modifications du transcriptôme liées à l'âge sont sans doute en partie responsables de la modification de l'homéostasie protéique, ou protéostasie c'est à dire le maintien de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation du protéome, qui est retrouvé lors du vieillissement et de certaines pathologies liées à l'âge (Powers et al., 2009; Koga et al., 2011). Il y a notamment une accumulation de protéines mal conformées (Unfolded Protein) dans certaines pathologies liées à l'âge comme les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou la cataracte (Powers et al., 2009) (Fig.37). Cela implique notamment la diminution avec l'âge de la synthèse des chaperonines lors de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) (Calderwood et al., 2009a), ce qui est soutenue par de nombreux modèles animaux. Par exemple, des invertébrés transgéniques surexprimant des chaperonines ont une plus longue durée de vie (Morrow et al., 2004; Walker and Lithgow, 2003). Il a aussi été montré chez des souris déficientes en Hsp (Heat Shock Protein), une famille de protéines associées et régulatrices des chaperonines, ont un phénotype progérique (vieillesse précoce), tandis que les souches de souris ayant une durée de vie plus longue montrent une surexpression de certaines protéines Hsp (Min et al., 2008; Swindell et al., 2009). Concernant la protéolyse, les deux systèmes impliqués, l'autophagie lysosomale et la voie de l'ubiquitine, ont une activité décroissante avec l'âge (Rubinsztein et al., 2011; Tomaru et al., 2012).

A



B

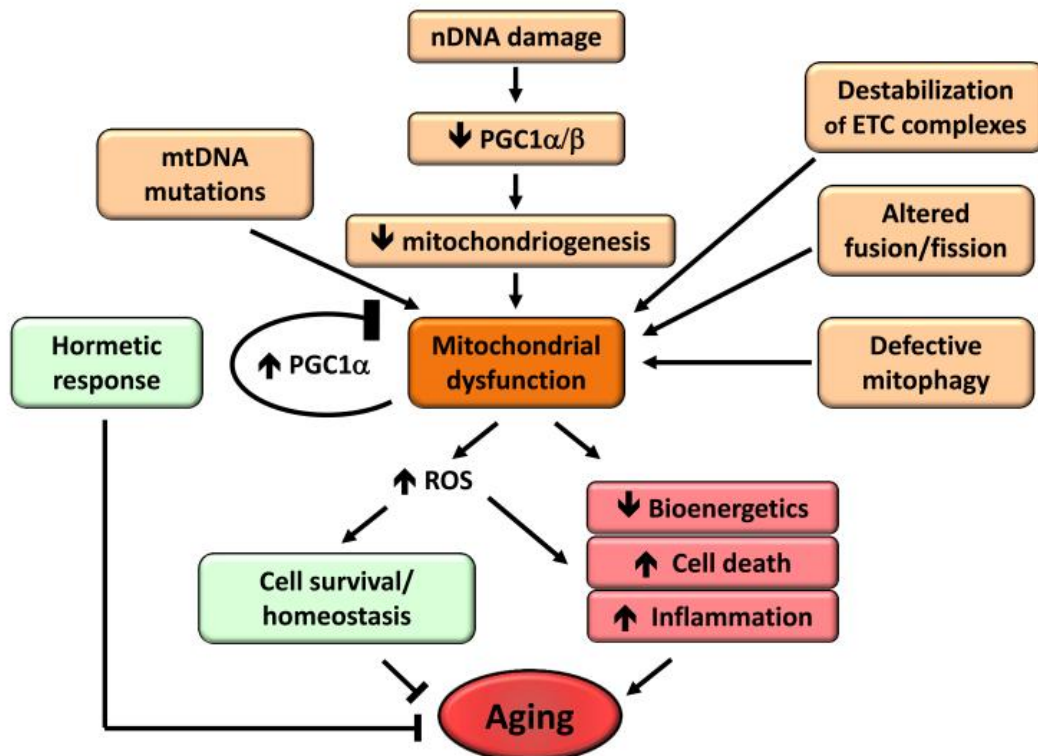


Figure 38 : Implication du métabolisme énergétique au cours du vieillissement, via l'effet d'une restriction alimentaire sur la voie des facteurs de croissance comme l'IGF (A) ou le dysfonctionnement des mitochondries (B). ETC, chaîne respiratoire mitochondriale (revue de Lopez-Otin. Et al., 2013).

L'utilisation des activateurs pharmacologiques rapamycine, inhibiteur de mTOR, et spermidine retarde l'apparition du vieillissement dans les modèles non mammifères (Bjedov et al., 2010; Eisenberg et al., 2009) ainsi que chez la souris (Wilkinson et al., 2012; Matsumoto et al., 2011; Soda et al., 2009). Plus de détails sur l'autophagie et le vieillissement peuvent être trouvés dans la revue de l'équipe de G. Kroemer (Rubinsztein et al., 2011).

## 2. Caractéristiques secondaires du vieillissement cellulaire

Contrairement aux caractéristiques primaires, celles-ci sont bénéfiques à faible intensité et délétères à forte intensité.

### i. Dérégulation de la détection des éléments nutritifs

Le tout premier modèle animal de vieillissement retardé date de 1983 sur des lignées de vers *Caenorhabditis elegans* ayant des mutations spontanées leur permettant de vivre plus longtemps. La plupart d'entre elles étaient liées à une incapacité partielle à se nourrir ce qui avait ouvert la voie aux futures recherches sur la privation nutritive et l'allongement de la durée de vie (Klass et al., 1983). La restriction alimentaire a aussi un effet bénéfique sur la durée de vie en bonne santé des singes Rhésus (Colman et al., 2009; Fontana et al., 2010; Mattison et al., 2012). Chez les invertébrés, l'effet bénéfique de la restriction alimentaire passe en partie par la voie de signalisation de l'IGF-1/ insuline (régulée par les taux de glucose dans le sang), induisant l'expression du facteur de transcription FOXO mais cela reste à être vérifié chez les mammifères (Kenyon et al., 1993; Slack et al., 2011). La voie du facteur anabolisant mTOR est sensible aux fortes concentrations en acides aminés et il a été montré que l'inhibition de mTORC1 (mTOR Complex 1) permet d'augmenter la durée de vie des invertébrés (Johnson et al., 2013) et des souris (Lamming et al., 2012). Contrairement aux voies précédentes détectant une richesse énergétique (glucose ou acides aminés), les voies de l'AMPK et des Sirtuines détectent des baisses énergétiques avec une élévation des taux d'AMP ou de NAD<sup>+</sup> respectivement et leur activation ou surexpression allonge la durée de vie chez les invertébrés mais aussi chez la souris (Anisimov et al., 2011; Mair et al., 2011; Onken and Driscoll, 2010) (Fig.38 A).

### ii. Stress mitochondrial

De manière générale, il y a une diminution de la fonctionnalité de la chaîne respiratoire mitochondriale au cours du vieillissement cellulaire à l'origine d'une réduction de synthèse d'ATP. En effet, le découplage de la membrane externe mitochondriale par le 2-4-dinitrophenol (2-4 DNP) ou la surexpression de la UCP1 (Uncoupling Protein 1) permet d'allonger la durée de vie de la drosophile et de la souris (Caldeira da Silva et al., 2008; Fridell et al., 2009; Gates et al., 2007; Mookerjee et al., 2010).

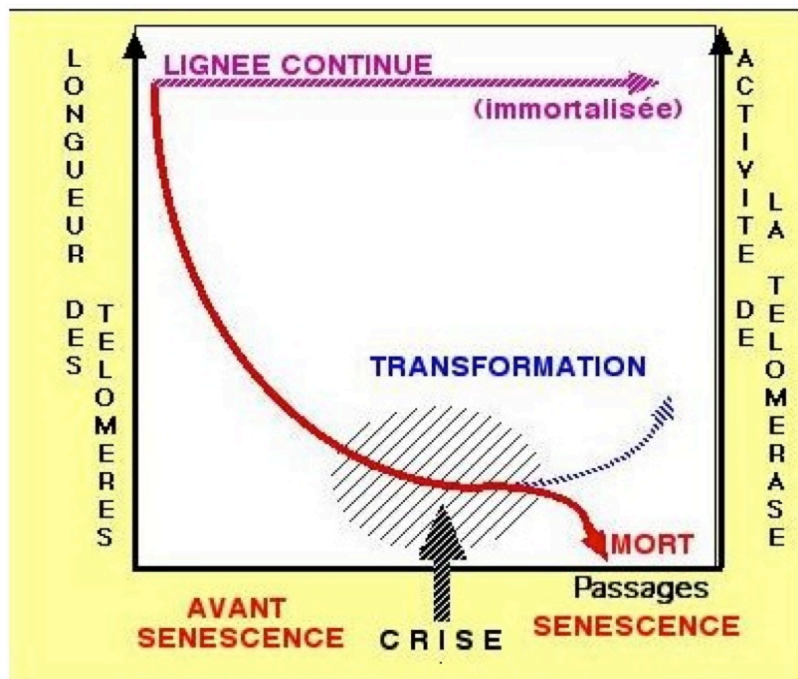


Figure 39: Diminution de la longueur des télomères et de l'activité de la télomérase au cours de la prolifération cellulaire, jusqu'à l'arrivée à la « crise » ou limite de Hayflick.

De plus, les premières études sur l'évolution des mitochondries au cours du vieillissement montrent une perte de leur activité avec une production importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine d'une détérioration mitochondriale et cellulaire. Cependant, cette « théorie des radicaux libres mitochondriaux » (Hekimi et al., 2011) a été remise en question ces 5 dernières années suite à l'étude de différents modèles animaux pour lesquels une augmentation de ROS allonge la durée de vie (*Caenorhabditis elegans*) ou n'a pas d'effet (*Mus musculus*) (Van Raamsdonk and Hekimi, 2009; Zhang et al., 2009). Par la suite, des manipulations génétiques ont montré que c'est directement le dysfonctionnement mitochondrial, sans production de ROS, qui accélère le vieillissement (Kujoth et al., 2005; Trifunovic et al., 2004). Aussi, le dysfonctionnement des mitochondries par une mutation délétère de la polymérase- $\gamma$  contribue au vieillissement des souris (Edgar et al., 2009). C'est alors que des résultats récents (Sena and Chandel, 2012) proposent les ROS plutôt comme des facteurs de survie induits par le stress mitochondrial au cours du vieillissement suivant le principe d'hormesis selon lequel la cellule répond à des traitements toxiques modérés par des mécanismes compensatoires bénéfiques surpassant la simple réparation (Calabrese et al., 2011) (Fig.38 B). Cependant, à terme, les dysfonctionnements des mitochondries peuvent aussi induire l'apoptose et l'inflammation (Kroemer et al., 2007) ou encore une altération de la signalisation cellulaire et de la communication entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Raffaello and Rizzuto, 2011).

### iii. Sénescence cellulaire

Les cellules somatiques saines n'ont pas une capacité répliquative indéfinie, elles finissent par s'arrêter en phase G1 de manière irréversible ce qui les différencie des cellules quiescentes, c'est la sénescence. Ce processus a été décrit *in vitro* par Hayflick et Moorhead dès 1961 (Hayflick and Moorhead, 1961) qui ont observé une diminution de la prolifération des fibroblastes humains au cours de passages successifs et ont qualifié ce phénomène de sénescence répliquative. Les cellules ont un nombre limité de divisions et entrent en sénescence lorsqu'elles ont atteint la « limite de Hayflick » c'est à dire lorsqu'elles ne parviennent plus à répliquer correctement leur ADN. Par la suite Hayflick (Hayflick, 1965) a relié cela au raccourcissement des extrémités télomériques ce qui a été confirmé par (Bodnar et al., 1998) (Fig.39). Ces résultats ont été depuis largement reproduits dans toute sorte de cellules d'origine humaine ou animal puis corrélés au vieillissement *in vivo* (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al., 2007). Cependant, la grande difficulté était de trouver des marqueurs spécifiques de la sénescence utilisables *in vivo*. Ainsi, il a été montré en culture que les cellules sénescents surexpriment les répresseurs p21, et p53 du cycle cellulaire et plus particulièrement p16 bien que ceux-ci ne soient pas des marqueurs absolument spécifiques de la sénescence puisqu'ils augmentent aussi dans d'autres cas d'arrêt du cycle comme en cas d'apoptose ou de différenciation. Ce n'est qu'en 1995 que l'équipe de Dimri a identifié l'activité de la  $\beta$ -galactosidase (Senescence Associated- $\beta$ Gal ou SA- $\beta$ -Gal) à pH 6.0 comme un marqueur spécifique de la sénescence *in vitro* et du vieillissement de la peau *in vivo* (Dimri et al., 1995; Wang et al., 2009). Cette enzyme lysosomale est impliquée dans la digestion autophagique pour laquelle le pH optimal est d'environ 5. Lors de la sénescence, il y a une augmentation de l'expression de cette enzyme

liée à une augmentation de l'autophagie ce qui rend son activité détectable à pH 6. Pendant longtemps ce marqueur a été considéré comme très spécifique mais il est remis en question régulièrement depuis les travaux de l'équipe de Cristofalo en 2000 (Severino et al., 2000), d'où la nécessité d'utiliser plusieurs marqueurs. Cela dit la grande majorité des articles parus depuis 1995 sur le sujet s'accordent sur l'accumulation de cellules sénescentes dans les tissus au cours du vieillissement de l'organisme tout en ne montrant pas une corrélation absolue entre l'âge administratif et le taux de cellules sénescentes donnant en quelque sorte l'âge physiologique de l'individu. Cela montre que nous ne sommes pas égaux génétiquement face au vieillissement d'autant plus que des facteurs extérieurs peuvent largement induire une sénescence prématurée des cellules. D'autres stimuli liés à l'âge sont capables de déclencher la sénescence indépendamment du raccourcissement des télomères comme une suractivation de l'activité mitotique, l'endommagement de l'ADN non-téломérique ou la dé-répression des gènes *INK4a/ARF*. L'augmentation de ces deux derniers facteurs est détectable au cours du vieillissement chronologique (Collado et al., 2007). Les caractéristiques du vieillissement vues précédemment ont toutes un rôle à jouer sur l'induction de la sénescence. Une étude récente a listé plus de 50 altérations oncogéniques ou mitotiques capables d'induire la sénescence (Gorgoulis and Halazonetis, 2010) mais les premières voies découvertes p16<sup>INK4a</sup>/pRb et p19<sup>ARF</sup>/p53 restent les principales dans la plupart des organes analysés (Krishnamurthy et al., 2004; Ressler et al., 2006). A l'inverse, les souris mutantes ayant un syndrome progérique, lié à une augmentation du taux persistant de dommages à l'ADN, ont un nombre anormalement élevé de cellules sénescentes et leur phénotype est amélioré en supprimant les effets de p16 ou p53 (Cao et al., 2003; Varela et al., 2005; Baker et al., 2011). Finalement la sénescence, qui a longtemps été considérée comme un processus délétère pour l'organisme peut aussi être vue comme un mécanisme de préservation évitant l'accumulation de cellules défailtantes et donc anti-oncogénique jusqu'au point où les cellules progénitrices ne parviennent plus à assurer le renouvellement cellulaire, et ainsi l'homéostasie et les fonctions tissulaires (pour revue voir Kuilman et al., 2010 et Rodier and Campisi, 2011).

### 3. Caractéristiques intégratives du vieillissement cellulaire

Qui affectent directement l'homéostasie tissulaire et son fonctionnement.

#### i. Epuisement des cellules souches

Il est vrai que le déclin du potentiel régénératif des tissus est une caractéristique des plus remarquables lors du vieillissement. L'usure fonctionnelle progressive des cellules souches adultes a été démontrée pour les cellules hématopoïétiques humaines (Shaw et al., 2010) et murines (Rossi et al., 2007), et dans d'autres niches chez la souris telles que le cerveau (Molofsky et al., 2006), les os (Gruber et al., 2006) ou les fibres musculaires (Conboy and Rando, 2012). Cette perte fonctionnelle des cellules souches (SC) a été corrélée à une accumulation de dommages à l'ADN (Rossi et al., 2007), à un raccourcissement télomérique (Flores and Blasco, 2010; Sharpless and Depinho, 2007) et à l'augmentation protéique de

l'inhibiteur du cycle cellulaire p16<sup>INK4α</sup> (Janzen et al., 2006). Les drosophiles surexprimant PGC1 (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), un facteur de transcription des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique de la mitochondrie, vieillissent prématurément (Rera et al., 2011) et chez la souris p21<sup>-/-</sup>, l'épuisement fonctionnel des SC est plus précoce. Maintenir la quiescence des SC permet alors d'allonger la durée de vie. Cependant, en plus de ces facteurs intrinsèques, il existe des facteurs extrinsèques régulant le maintien ou la levée de quiescence des SC. En effet, des études de perfusions croisées entre une souris jeune et une souris âgée montrent un rajeunissement des SC musculaires en restaurant l'activation due la voie de signalisation du Notch qui est exprimé *de novo* (Conboy et al., 2005; Villeda et al., 2011). Il est donc possible de rajeunir les SC et des études récentes suggèrent que ce processus peut retarder le vieillissement de l'organisme ce qui est bien détaillé dans la revue de Rando et Chang (Rando and Chang, 2012).

## ii. Perturbation de la communication intercellulaire

Nous avons déjà vu dans cette introduction que certaines voies de signalisation hormonales sont perturbées au cours du vieillissement de l'organisme et notamment les voies rénine-angiotensine, adrénaline, insuline-IGF1. Cela modifie l'environnement cellulaire dans un sens généralement pro-inflammatoire chez les mammifères (Salminen et al., 2012) et par conséquent les propriétés mécaniques et fonctionnelles des tissus. Ce phénotype pro-inflammatoire a de nombreuses causes comme l'accumulation de dommages tissulaires pro-inflammatoires accompagnée d'une diminution de la réponse immunitaire, le secrétôme pro-inflammatoire des cellules sénescents qui produisent beaucoup de cytokines (IL-8,) et métalloprotéinases de la MEC (MMP), la suractivation de la voie NF-κB ou encore un défaut de l'activité autophagique. Cela a pour conséquence d'activer des voies pro-inflammatoires comme l'inflammasome NLRP3 menant à une surproduction d'IL-1β, TNF et d'interférons (Green et al., 2011; Salminen et al., 2012). Or, un environnement pro-inflammatoire inhibe la prolifération des cellules souches de l'épiderme (Doles et al., 2012). La voie NF-κB est particulièrement suractivée dans le vieillissement, c'en est même devenue un marqueur (Lee et al., 2012), et elle réduit la sécrétion de GnRH par les neurones impliqués dans la signalisation hypothalamo-hypophysaire ce qui conduit à de nombreux dysfonctionnements physiologiques liés à l'âge dont nous avons déjà parlé précédemment comme la fragilité osseuse, l'atrophie cutanée, la faiblesse musculaire et une baisse de neurogénèse (Zhang et al., 2013a). En effet, une régulation génique ou pharmacologique de la voie NF-κB sur des souris transgéniques à vieillissement prématuré provoque le rajeunissement des tissus étudiés (Adler et al., 2007; Tilstra et al., 2012). D'autres régulateurs de l'inflammation ont été reliés au vieillissement *in vivo* comme le facteur AUF-1 (p38 ou heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-AU-rich element RNA binding protein 1), responsable de la dégradation des mRNA de cytokines et du maintien des télomères en stimulant l'expression de la TERT (Pont et al., 2012), ou les sirtuines en déacétylant la sous-unité catalytique du NF-κB réprimant alors la transcription de ses gènes cibles (Kawahara et al., 2009; Rothgiesser et al., 2010). C'est par de tels mécanismes que les tissus « communiquent » entre eux et peuvent retarder ou synchroniser le vieillissement des autres. Ainsi, de plus en plus



d'équipes travaillent sur le rajeunissement en ciblant la communication intercellulaire ou systémique. Ils utilisent notamment la restriction alimentaire (Piper et al., 2011) ou l'administration régulière d'aspirine comme « fontaine de jouvence » (Rothwell et al., 2011; Strong et al., 2008).

Finalement, nous avons pu constater à travers la description des différentes caractéristiques du vieillissement que celles-ci s'entrecroisent et que le vieillissement de l'organisme est dû à de nombreuses défaillances cellulaires s'accumulant au cours du temps et provoquant la sénescence cellulaire dans les différents tissus qui ne parviennent plus à se régénérer et à assurer leur rôle physiologique. Ces cellules ayant un sécrétôme pro-inflammatoire, bouleversent non seulement le microenvironnement cellulaire mais également le système endocrinien ce qui a un impact systémique sur tout l'organisme.

Jusqu'à présent, nous avons décrit le  $Ca^{2+}$  comme un second messenger universel intervenant dans la majorité des voies de signalisation cellulaire et montré que l'homéostasie calcique est modifiée au cours du vieillissement. Ainsi, la modification de la signature calcique peut être impliquée dans de nombreuses caractéristiques du vieillissement et notamment dans la sénescence répllicative.

## C. Qu'est ce que la sénescence ?

### 1. Age *in vivo* et Sénescence *in vitro*

*In vitro*, la culture primaire des cellules diploïdes connaît trois phases : la phase I où la culture s'établit et durant laquelle la prolifération est lente, la phase II à croissance exponentielle, puis la phase III au cours de laquelle la prolifération ralentit progressivement jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la limite de doublement de population (DP) cellulaire ou limite de Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961). C'est au cours de la phase III que les cellules, incapables d'encore se diviser, entrent dans le processus de sénescence. Selon Hayflick, le nombre de doublement de population avant d'atteindre la sénescence à partir de cellules fœtales est d'environ  $50 \pm 10$  quelque soit l'organe d'origine (sauf le cœur) et les fibroblastes perdent 50 paires de bases par doublement de population. Par la suite, il a été montré qu'il est possible d'atteindre 70 DP pour les cellules endothéliales ombilicales qui perdent environ 90 bases par cycle et sont sénescents lorsque les télomères ne font plus que 5000 bases (Hastings et al., 2004).

Cependant, dès la naissance et indépendamment de l'âge à la naissance, le raccourcissement des télomères s'accélère par rapport à la vie fœtale (Holmes DK et al., 2009). Ainsi, chez l'adulte, le nombre de réplifications avant d'atteindre la sénescence varie en fonction de la provenance des cellules mais pour un tissu donné il est possible d'estimer la durée de vie de l'individu à partir du potentiel réplcatif des cellules *in vitro* et notamment pour les fibroblastes (pour revue, voir Yegorov and Zelenin, 2003).

Donc en général, l'âge du donneur est déterminant pour la capacité proliférative des cultures primaires ce qui avait déjà été constaté par Steinhardt en 1985 à partir des fibroblastes (Steinhardt, 1985). Les kératinocytes sont un peu à part: les kératinocytes primaires adultes atteignent la sénescence après 13 DP sur plastique et 81 DP sur une couche nourricière de fibroblastes 3T3, quelque soit l'âge du donneur, seuls comptent les doublements de population *in vitro* (Kang et al., 2000b). En effet, les kératinocytes font partie des rares cellules somatiques adultes à encore exprimer la télomérase ce qui est peut être à l'origine de cette différence (Bickenbach et al., 1998). Cependant, d'autres processus peuvent être à l'origine d'une sénescence « prématurée » sans que la longueur télomérique critique ne soit atteinte et de plus en plus d'études récentes *in vivo* montrent que c'est un mécanisme crucial dans l'inhibition tumorale.

## 2. L'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence

Les cellules sénescents ne se divisent plus, elles sont bloquées en phase G1 et incapables de franchir le point de restriction R pour avancer en phase S répliative. La sénescence peut être « naturelle », due à la limite de Hayflick ou « prématurée » à cause d'inducteurs de stress. Ces deux voies d'induction de la sénescence partagent les mêmes caractéristiques et certaines voies de signalisation cellulaire. En effet, la déstabilisation de l'ADN par le raccourcissement télomérique ou l'accumulation d'erreurs et de dommages à l'ADN par des ROS ou encore un dysfonctionnement progressif de la réplication déclenche l'activation des kinases ATM et ATR de la réponse à l'endommagement de l'ADN (DDR- DNA Damage Response) (d' Adda di Fagagna et al., 2003). Ces kinases sont à l'origine de la phosphorylation activatrice de la p53 qui va, à son tour, activer p21<sup>CIP1</sup>, inhibiteur des complexes CyclineE/cdk2, Cycline D/cdk4 et Cycline D/cdk6. Cela va alors empêcher l'hyperphosphorylation de la pRb et la libération du facteur d'élongation EF-2 à l'origine de la transcription des enzymes et autres facteurs nécessaires à la réplication de l'ADN au cours de la phase S (Dulić et al., 1993; Stein et al., 1999) (Fig.40). Il est donc crucial de tenir compte des conditions de culture cellulaire car elles peuvent déclencher une sénescence « prématurée » (Sherr and DePinho, 2000). En effet, la culture cellulaire en condition d'hypoxie permet d'augmenter le nombre de doublement de population des fibroblastes embryonnaires de souris avant d'atteindre la sénescence (Parrinello et al., 2003). Or, l'utilisation de doses sub-léthales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induit la sénescence (Chen and Ames, 1994; Chen et al., 1998) alors que l'utilisation d'un anti-oxydant comme GSH permet d'échapper à la sénescence induite par les ROS (Chen et al., 1995; Yuan et al., 1995; Wiel et al., 2014). Donc l'effet de l'hypoxie sur le retard de sénescence dépend d'avantage que de l'oxygène. En effet, les ROS peuvent provoquer des points focaux de dommage à l'ADN (Passos et al., 2010) ou intervenir dans la cascade de transduction de p21 et p53 (Itahana et al., 2003; Iwasa et al., 2003), cependant la nature exacte de ces mécanismes n'est pas encore bien claire (Lu and Finkel, 2008).

La surexpression d'oncogènes ou des mutations délétères de gènes suppresseurs de tumeur peuvent aussi entraîner une sénescence « prématurée » indépendante de la longueur des télomères, c'est l'OIS (Yaswen and Campisi, 2007).

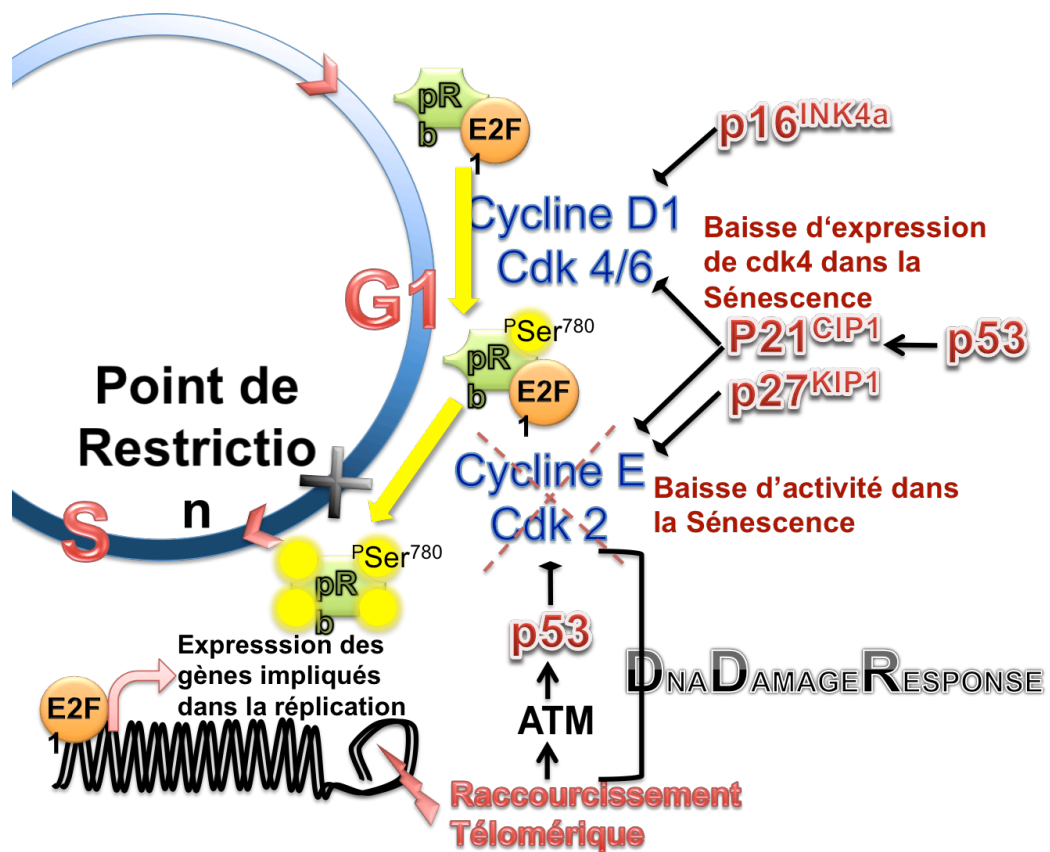


Figure 40: Arrêt des cellules sénescents en phase G1 du cycle cellulaire induit par les protéines inhibitrices des complexes Cycline/Cdk.

En effet, l'étude de mutants HRAS a montré que la surexpression de cette oncogène seul dans des cellules primaires induit une sénescence qui ne peut être levée par la ré-expression de TERT mais dépend des voies p53, p21 et p16 (Franza et al., 1986; Serrano et al., 1997). Cependant tous les oncogènes passent par des voies spécifiques comme le montre l'étude de l'équipe de Pearson R.B. (Astle et al., 2012a) ayant comparé les voies Ras/MAPK et PI3K/AKT induisant la sénescence. Ras est une petite GTPase activée par les récepteurs couplés aux protéines G tels que l'EGFR et le gène ras est muté dans la grande majorité des cancers chez l'Homme. Des mutations activatrices de Ras induisent tout d'abord une accélération de la prolifération via les MAPK et l'induction de facteurs pro-prolifératifs comme Elk-1 amplifiée par Erk1/2, exerçant un rétrocontrôle positif sur cette boucle, qui favorise alors l'expression de ligands de l'EGFR à action paracrine et activant ainsi à nouveau Ras (Roberts and Der, 2007; Campbell, 2014). Il a été montré que cette période de sur-prolifération endommage l'ADN qui, dans les cellules compétentes, induit la DDR et l'activation de la p53 à l'origine de la sénescence induite par Ras et la voie des MAPK (Di Micco et al., 2006). Cependant, Erk1/2 est également responsable de la libération du cytochrome c, induisant l'apoptose, et de l'activation de mTOR, bloquant la protéostasie. Parallèlement, une mutation activatrice de la PI3K ou de AKT tout comme une inhibition de PTEN induit immédiatement la sénescence en favorisant l'accumulation de la p53 suite à l'activation du complexe mTORC1. En effet, ce complexe régule l'expression de p53 et inhibe la MDM2 (E3 ubiquitin-protein ligase) impliquée dans la dégradation de p53 par Ubiquitination (Hannan et al., 2011). Ainsi, lorsqu'un cancer est dû à une suractivation de AKT celle-ci est généralement couplée à une mutation délétère de p53 bloquant l'OIS (Astle et al., 2012b). Un autre exemple d'OIS est celui du *Vhl* (Von Hippel–Lindau tumor suppressor), codant un complexe protéique impliqué dans l'ubiquitination, dont la perte d'expression induit la sénescence par la voie du pRb et p400 (Young et al., 2008). Cependant, la sénescence n'est pas un état stable infini tout comme la transition entre la prolifération et l'entrée en sénescence est progressive avec un ralentissement du cycle cellulaire.

### 3. Caractéristiques physiologiques et morphologiques des cellules en sénescence

Une fois que les cellules sont entrées en sénescence, commence un processus de croissance hypertrophique dépendant de facteurs de croissance et du complexe mTORC1. Ce complexe a déjà été impliqué dans la régulation de la taille des cellules et des animaux ainsi que de leur durée de vie. En effet, une surexpression de mTOR est responsable de la grande taille de la reine des abeilles qui vit 3 à 5 ans contre quelques mois pour les ouvrières, alors qu'une diminution de 75% de l'expression de TOR dans les souris réduit significativement leur taille et leur longévité (pour revue, voir Xu et al., 2014 et Wei et al., 2013). Une étude récente a montré que les kératinocytes épidermiques grossissent au cours du vieillissement, avec une surface moyenne de 48  $\mu\text{m}^2$  entre 20-29 ans, 60  $\mu\text{m}^2$  entre 30-59 ans et 70  $\mu\text{m}^2$  entre 60-79 ans bien que le rapport noyau/cytoplasme reste de 0,35 quelque soit l'âge (Liao et al., 2013).

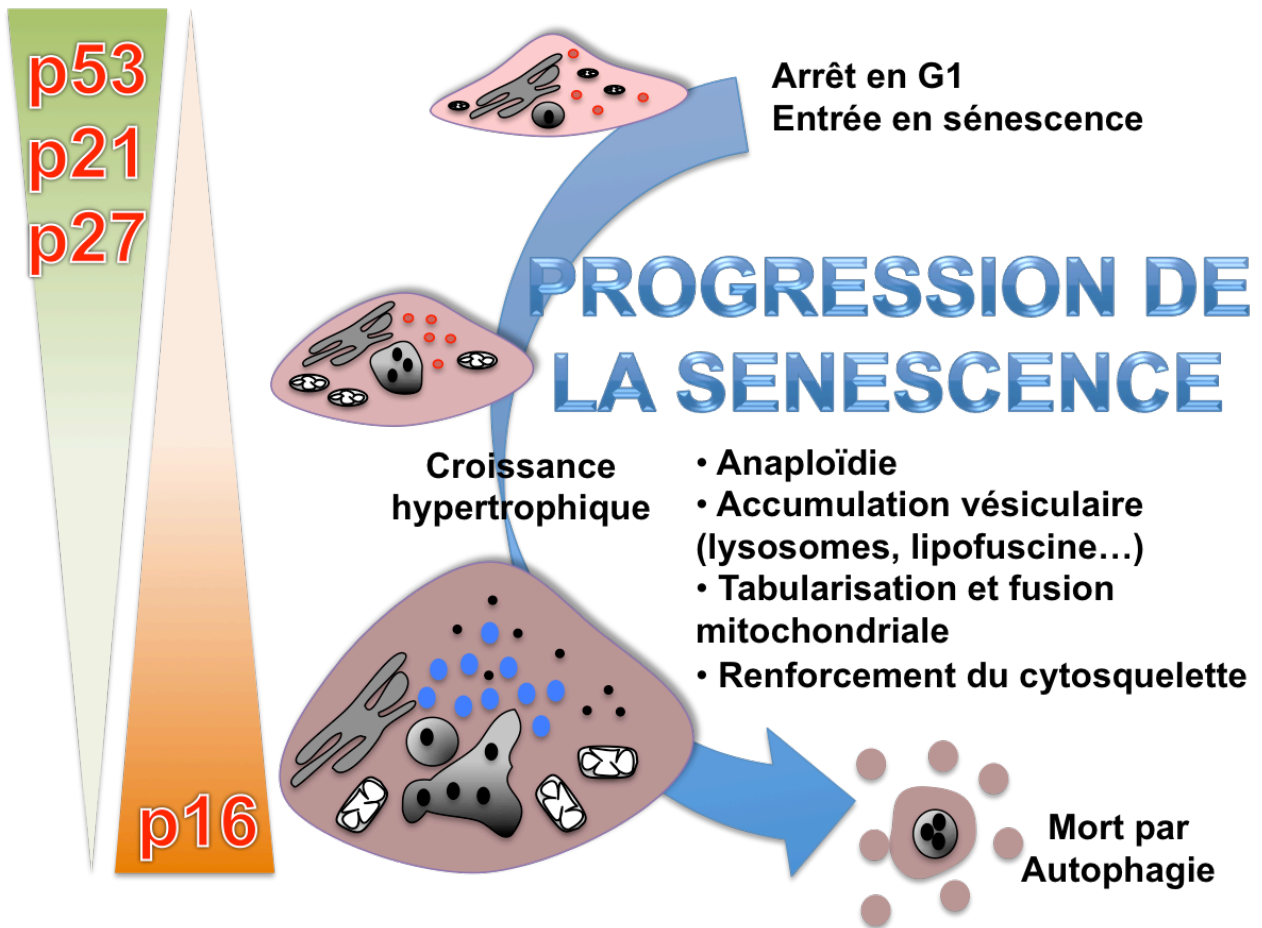


Figure 41: Modifications morphologiques et métaboliques des cellules au cours de la sénescence.

Les cellules sénescents sont aussi reconnaissables par la perte de la structure de la chromatine qui devient plus condensée. Le noyau est souvent plurilobé et les cellules deviennent aneuploïdes avec un ADN fortement endommagé, une diminution du taux d'euchromatine et la formation de points focaux d'hétérochromatine dépendants de l'histone H3 méthylée en Lys9. Il y a une augmentation des protéines de liaison à l'hétérochromatine notamment au niveau des promoteurs E2F régulant l'expression de gènes pro-prolifération (Narita et al., 2003; pour revue, voir Funayama and Ishikawa, 2007). Cette configuration de la chromatine et la régulation épigénétique intervenant sont l'une des clés de l'irréversibilité de la sénescence et cela provoque un transcriptôme bien spécifique aux cellules sénescents et notamment pro-inflammatoire (cytokines pro-inflammatoires, Cycloxygénases, métalloprotéinases de la MEC et facteurs de croissance) typique du sécrétôme des cellules sénescents (SAPS) (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009; pour revue, voir Campisi, 2005). Parallèlement, il y a une augmentation du nombre de vacuoles de sécrétion et autophagiques due au maintien de la réponse UPR qui stimule l'autophagie dépendante des chaperonines mais qui ne peut être menée à terme suite à l'augmentation de mTOR. L'augmentation de la masse lysosomale est cruciale pour le principal marqueur de sénescence utilisé qu'est la SA-β-Galactosidase et l'arrêt de l'autophagie permet de maintenir les cellules plus longtemps à l'état de sénescence (Dörr et al., 2013) (Fig.41). Cependant cela provoque l'accumulation de ROS dans la cellule induisant un stress oxydatif et également l'accumulation d'agrégats protéiques tels que la lipofuscine dans les lysosomes ayant perdu leur activité catalytique ou d'autres protéines intervenant dans les maladies neurodégénératives.

## **D. Implication du calcium dans les caractéristiques cellulaires du vieillissement**

### **1. Le calcium et les canaux calciques impliqués dans le vieillissement *in vivo***

Avec une durée de vie moyenne de quinze jours à 25°C (Larsen et al., 1995), le *C. elegans* est un modèle pratique pour étudier les facteurs intrinsèques et extrinsèques du vieillissement. Deux gènes ont tout d'abord été fortement liés à l'espérance de vie de ces métazoaires, *age1* codant pour la PI<sub>3</sub>K et *daf-2* codant un récepteur à l'insuline (Klass, 1983; Dorman et al., 1995) puis la liste s'est agrandie à plus de 80 gènes. Or, ces deux voies déclenchent une augmentation de Ca<sup>2+</sup> cytoplasmique. Par la suite, la voie de la calcineurine, une kinase dépendante du complexe calcium/calmoduline, a été largement impliquée dans les modèles mutés *age-1* ou *daf-2* en activant la voie CREB régulant l'homéostasie du métabolisme énergétique et le stress réticulaire (pour revue, voir Lee et al., 2013). Une augmentation du Ca<sup>2+</sup> dans le milieu de vie des *C. elegans* accélère le vieillissement, augmente les réactions de réponses aux stress cellulaires et raccourcit la durée de vie, ce qui est amoindri lorsque le récepteur à l'insuline est muté (Wang et al., 2010).

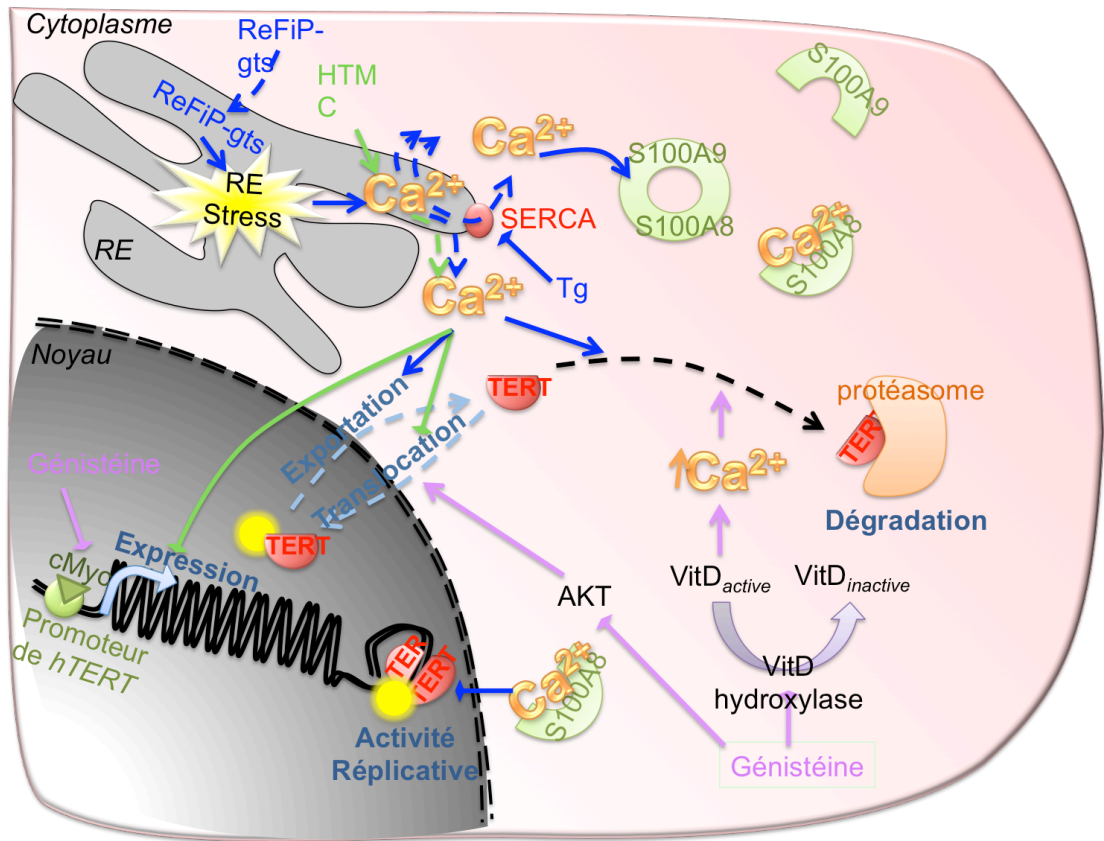


Figure 43: Voies de régulation de la télomérase par le calcium.

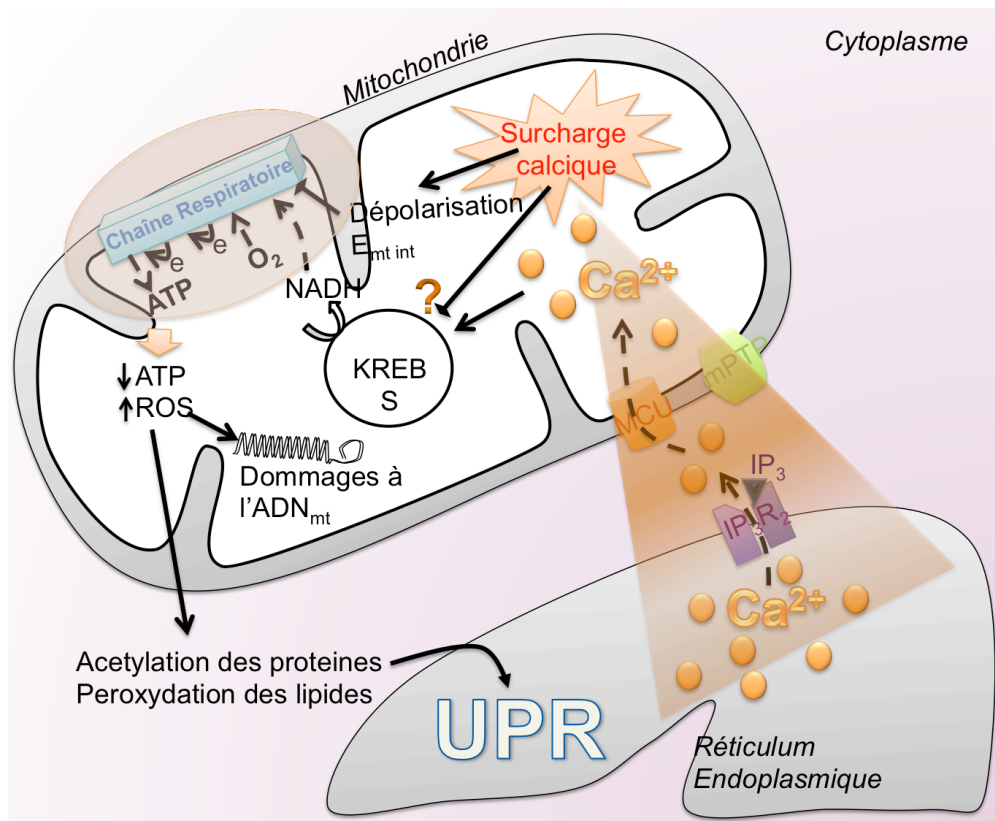


Figure 44 : Régulation du métabolisme énergétique par le calcium.

Pour les invertébrés poïkilothermes comme pour les mammifères homéothermes, vivre dans un environnement un peu plus froid permet d'augmenter l'espérance de vie (Pour revue voir Conti, 2008) cependant les mécanismes sont encore vagues. Il a récemment été démontré chez *C. elegans* que le canal calcique TRPA1 détecte les basses températures (15-20°C) et l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'ensuit active une PKC classique (calcium-dépendante) puis à l'activation de la voie Daf-16/Foxo, connue pour allonger la durée de vie des invertébrés par la signalisation IIS (Insulin-IGF1 Signaling) (Xiao et al., 2013), c'est donc une nouvelle voie parallèle à celle du jeûne. La protéine Klotho (kl) a été découverte en 1997 et qualifiée de « protéine de jeunesse » car la souris transgénique  $\text{kl}^{-/-}$  ne vit que 2 mois contre 3 ans pour une souris sauvage et présente très rapidement les signes physiologiques du vieillissement dont une modification du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmatique accompagnée d'ostéoporose (Kuro-o et al., 1997). La protéine Klotho est une  $\beta$ -glucuronidase transmembranaire présente principalement sur la membrane plasmique des cellules rénales et dont le domaine extracellulaire enzymatique modifie le N-Glycan des canaux TRPV5 et TRPV6 leur permettant de rester sur la membrane plasmique (Chang et al., 2005; pour revue, voir Manya et al., 2010). Au cours du vieillissement, il y a également une diminution de l'expression des protéines chélatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  (Calbindine, CB et parvalbumine, PV) dans l'hippocampe cérébral des souris associée à une réduction de l'activité métabolique basale et cette détérioration liée à l'âge est accélérée dans les souris  $\text{CB}^{-/-}$  ou  $\text{PV}^{-/-}$  (Moreno et al., 2012). Or, encore une fois, le vieillissement est caractérisé par un défaut de protéostasie avec accumulation d'agrégats protéiques entraînant de nombreuses pathologies liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer et la maladie d'Huntington. Ainsi, l'utilisation de traitements visant à diminuer les taux de calcium intracellulaire, comme le Lithium, Bcl-2, FK506 et la vitamine D, permet de réduire les symptômes de certaines pathologies neurodégénératives (pour revue, voir Berridge, 2013).

## 2. Régulation de la TERT par le calcium

Peu de données sont disponibles sur ce sujet, pourtant il a été montré depuis 1998 que le calcium inhibe l'activité de la télomérase dans les kératinocytes (Bickenbach et al., 1998). Depuis, quelques voies de régulation de la télomérase impliquant la signalisation calcique ont été découvertes (Fig.43). Tout d'abord le calcium peut inhiber directement l'activité de la télomérase dans un extrait cytoplasmique en se liant au complexe S100A8/S100A9 et dans les HaCaT (lignée de kératinocytes). Cette inhibition est déclenchée par la Thapsigargine à l'origine d'une vidange calcique réticulaire mais n'a pas d'effet sur l'expression de TERT (Rosenberger et al., 2007). De plus, les cellules cancéreuses ré-expriment pour la plupart la TERT ce qui rend les lignées cellulaires cancéreuses particulièrement utiles pour l'étude de l'activité de la télomérase.

Ainsi, l'utilisation de lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire ont permis de montrer que certaines molécules qui inhibent l'activité de la télomérase sont liées à la signalisation calcique. Par exemple, l'inhibition de l'activité de la télomérase par la protéine fongique reFIP-gts passe par l'augmentation cytoplasmique de calcium puisque l'utilisation d'un chélateur calcique bloque cette inhibition. En effet, la reFIP-gts s'accumule dans le RE provoquant, par un stress réticulaire, une libération de calcium à l'origine de l'exportation



nucléaire de la télomérase et de sa dégradation par le protéasome (Liao et al., 2007). L'inhibition de la télomérase par le HTMC (2'-hydroxy-2,3,4',6'-tetraethoxychalcone) met également en jeu le calcium qui, cette fois, bloque la translocation de la télomérase vers le noyau et inhibe l'expression de hTERT (Rao et al., 2010). Enfin, la génistéine inhibe la croissance des cellules cancéreuses prostatiques humaines en supprimant l'activité de la télomérase (Ouchi et al., 2005) par des mécanismes transcriptionnels, en bloquant l'expression du facteur de transcription de hTERT, cMyc, et post-transcriptionnels, en inhibant la voie AKT qui phosphoryle la télomérase et induit sa translocation vers le noyau (Jagadeesh et al., 2006). Or la génistéine est un inhibiteur de la vit-D hydroxylase (Farhan et al., 2003) qui régule les taux de calcium notamment dans les cellules cancéreuses prostatiques. Donc il est possible que l'effet inhibiteur de la génistéine passe également par une augmentation de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme.

### 3. Régulation du métabolisme énergétique par le calcium

Les mitochondries sont les principaux organites du métabolisme énergétique de la cellule car elles sont à l'origine de la synthèse d'ATP. Dans les mitochondries, le calcium intervient directement dans le métabolisme oxydatif en régulant les enzymes isocitrate-, oxoglutarate- et pyruvate-déhydrogénases (Fig.44). Ainsi, l'augmentation transitoire de calcium dans la mitochondrie active le cycle de Krebs et la production de NADH utilisé dans la chaîne respiratoire et à l'origine de la production d'ATP (pour revue, voir Murgia et al., 2009). Or, au cours de la sénescence prématurée (OIS), le  $Ca^{2+}$  libéré du RE via les  $IP_3R2$  est récupéré par les mitochondries via le MCU au niveau des MAMs (Mitochondrial-Associated membranes) (Wiel et al., 2014a). Cette relocalisation calcique provoque une surcharge mitochondriale, l'ouverture du pore de transition (mPTP, mitochondrial Permeability Transition Pore), la dépolarisation de la membrane interne mitochondriale, le découplage de la chaîne respiratoire, la diminution de la production d'ATP associée à une diminution de la consommation d' $O_2$  et l'augmentation de la production de ROS. L'augmentation des ROS provoque aussi la carbonylation des protéines et donc la réponse UPR (pour revue, voir Paradies et al., 2014).

### 4. Régulation de la protéostasie par le calcium

C'est au sein du RE qu'ont lieu la plupart des modifications post-traductionnelles des protéines notamment le repliement par les chaperonines présentes dans le lumen. De nombreuses chaperonines possèdent des sites de liaison du calcium, comme la calréticuline, la calnexine, ERp57 et ORP150, qui tamponnent le calcium intra-luminal et dont l'activité est régulée par la fixation du calcium. Donc le calcium affecte directement les modifications post-traductionnelles des protéines. Il a notamment été montré que l'augmentation de la concentration de calcium dans le RE, en bloquant les canaux RyR ou en suractivant les SERCA, permet d'améliorer la conformation des protéines via l'activation des chaperonines (Ong et al., 2010). Une autre chaperonine très étudiée est Grp78 (Bip). Celle-ci intervient lors d'un stress réticulaire provoqué notamment par l'agrégation de protéines mal conformées détectée par le point de contrôle qualité du RE et participe ensuite à la réponse UPR

(Unfolded Protein Response). En effet, Grp78 se lie aux protéines agrégées et libère les trois effecteurs de la réponse UPR: PERK, IRE1 et ATF6 (Zhang and Kaufman, 2006). L'activation de PERK inhibe la traduction via E2F $\alpha$  et phosphoryle NRF2 pour stimuler la réponse anti-oxydante, alors que IRE1 et ATF6 stimulent l'expression des chaperonines comme Grp78, Grp94 et PDI (Prostko et al., 1993, Kaufman, 1999). Grp78 déclenche également la dégradation des protéines agrégées par le protéasome en empruntant la voie ERAD (ER Associated Degradation) (Hampton, 2002). Ces trois types de réponses sont protectrices et ont pour but de corriger le stress réticulaire qui, lorsqu'il persiste, déclenche la voie NF- $\kappa$ B pro-apoptotique (Szegezdi et al., 2006; pour revue voir Naidoo, 2009). De plus, la liaison de Grp78 aux protéines provoque une fuite de Ca<sup>2+</sup> par les translocons ce qui à cours terme, stimule l'activation de la dégradation des protéines par le protéasome et par la microautophagie via les chaperonines dépendantes du calcium, mais à long terme induit l'apoptose.

# PROBLEMATIQUE & OBJECTIFS

L'homéostasie calcique résulte d'un équilibre fragile entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes dans lequel le  $\text{Ca}^{2+}$  joue le premier rôle. Ainsi, toute modification de cet état d'équilibre par une perturbation de l'homéostasie calcique peut, à plus ou moins long terme, provoquer des dermatoses souvent accompagnées d'une modification du gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'épiderme.

De nombreux canaux calciques ont déjà été étudiés dans le maintien et la réparation de la barrière cutanée mais leurs fonctions précises dans les kératinocytes et les voies de transduction dépendantes du calcium ne sont pas très claires. De plus, au cours du vieillissement, ce gradient est également perturbé et l'incidence de certaines dermatoses et cancers cutanés augmente. Or, les cellules ne sont intrinsèquement pas éternelles et le  $\text{Ca}^{2+}$  est clairement impliqué dans les caractéristiques du vieillissement cellulaire.

Cependant, à l'heure actuelle, peu de recherches sont menées sur l'implication du calcium dans le vieillissement de l'épiderme et plus précisément dans la sénescence des kératinocytes.

C'est la raison pour laquelle nous avons étudié:

**1) L'évolution de l'expression des marqueurs de prolifération, différenciation et sénescence au cours du vieillissement de l'épiderme humain.**

Comment évolue l'épiderme au cours du temps, la balance prolifération/différenciation est-elle stable ?

La sénescence répliquative des kératinocytes joue-t-elle un rôle crucial dans le vieillissement de l'épiderme ?

Quelles sont les voies de transduction dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  impliquées dans ces différents processus ?

**2) L'évolution de l'expression des outils de la signalisation calcique au cours du vieillissement intrinsèque de l'épiderme.**

Quel est le profil d'expression des canaux TRP et d'autres protéines impliquées dans la signalisation calcique ?

Sont-ils impliqués dans la différenciation, la sénescence ou dans d'autres processus cellulaires des kératinocytes ?

**3) Le rôle de l'entrée capacitive de calcium (SOCE) dans les kératinocytes de l'épiderme.**

Quelle est la nature moléculaire des canaux calciques impliqués dans le SOC des kératinocytes ?

Comment varie-t-il au cours du vieillissement cellulaire ?

Quel est son rôle dans les kératinocytes et dans l'homéostasie de l'épiderme ?

# MATERIELS & METHODES

Le Matériels et Méthodes décrit ci-dessous regroupent l'ensemble des modèles animaux ou cellulaires et des techniques utilisées au cours de cette thèse. Je me suis personnellement impliquée dans chacune d'elles excepté le patch-clamp, l'immunohistologie sur les échantillons cliniques et l'observation des lésions osseuses chez les souris qui ont été réalisés par des collaborations internes ou externes. Le « Matériels et Méthodes » relatif à chaque article est inclus dans celui-ci dans les chapitres « Résultats » et « Annexes ».

## I. Modèles animaux utilisés et prélèvements humains

### A. Souris Swiss-Nude et xénogreffes

Les expériences *in vivo*, soins, hébergement, procédure de mise à mort et protocoles expérimentaux utilisés ont été autorisés par le comité d'éthique et le ministère de l'agriculture et réalisés dans l'animalerie de l'université de Lille1 (C59-00913) sous la direction du Dr. Lehen'kyi V. (59-009270).

#### Xénogreffes (voir Annexe)

Les souris immunodéficientes swiss-nude (Charles Rivers) âgées de 6 semaines ont été greffées par injection sous-cutanée de  $2 \cdot 10^6$  cellules dans du gel matriciel (50% V/V, Matrigel®). Tout au long du développement des tumeurs, le poids des souris est suivi afin de déterminer le poids relatif d'une tumeur et de décider de retirer ces animaux de l'expérimentation s'ils présentent une variation de poids de plus de 10% par rapport au poids initial. Ils sont sacrifiés par injection de barbituriques (pentobarbital 150 mg/kg i.p.) à la fin de l'expérience ou dès qu'une souris montre un état de pénibilité (apathie, défaut de déplacement) ou d'affaiblissement marqué, ou encore présente une tumeur en «boule» de plus d'1 cm<sup>3</sup> ou d'une lésion cutanée de plus de 4 mm de diamètre. Dès qu'une souris d'un groupe développe une tumeur importante nécessitant l'euthanasie, toutes les souris du même groupe sont sacrifiées. Enfin, les tumeurs sont disséquées, mesurées, pesées, incluses dans la parafine afin de réaliser des analyses histologiques ou lysées dans les tampons adéquats pour les analyses protéomiques et transcriptionnelles (extraction des protéines et ARN respectivement).

#### Injection IP de siARN

Dès que les tumeurs sont en phase exponentielle de croissance, les souris greffées reçoivent quotidiennement une injection intra-péritonéale de siRNA (120 µg/kg dilué dans du PBS stérile). Les souris sont sacrifiées après 17 jours de traitement et les tumeurs utilisées comme décrit au dessus.

### B. Souris Orai1<sup>-/-</sup>

Les souris sont maintenues dans les locaux spécifiques de l'institut LIAI (La Jolla Institut of Allergy and Immunology) de San Diego, Californie, et utilisées selon les protocoles approuvés et en vigueur dans le LIAI.

L'extinction du gène *orai1* a été réalisée par recombinaison homologue dans les cellules souches embryonnaires (SCE) B6/3 issues de souris C57BL/6 (Taconic Artemis GmbH). Les souris chimériques avec l'allèle *orai1* modifié ont été obtenues par injection des clones SCE hétérozygotes *Orai1<sup>neo/+</sup>* dans les blastocystes (comme décrit dans Gwack Y, et al., 2008). Toutes les souris ont été génotypées par PCR. L'ADN génomique a été extrait par la solution Quick Extract DNA extraction DNA solution (Epicentre) et amplifié par PCR en utilisant le tampon de réaction 10x, des dNTPs (0,2mM), la Taq Choice (1,25U, Applied Biosystems), 5µl et les amorces (1µM) (qsp 25µl avec H<sub>2</sub>O DNase-RNase free):

WT Forward 5'-GGGTGTGGCGTATGCAAATAACCT-3' ;

WT Reverse 5'-ACTCGAGCCGGTCTCCC-3',

KO Reverse 5'-TCGTACCACCTTCTTGGGACTTGA-3' (IDT)

et les conditions de PCR suivantes : 5min à 95°C, 40 cycles (20s 95°C, 30s 65°C, 2min 72°C), 2min 72°C, ∞ 4°C. Les produits de PCR sont ensuite chargés avec du Bromure d'ethidium BET sur gel d'agarose 2% W/V (Fig.45).

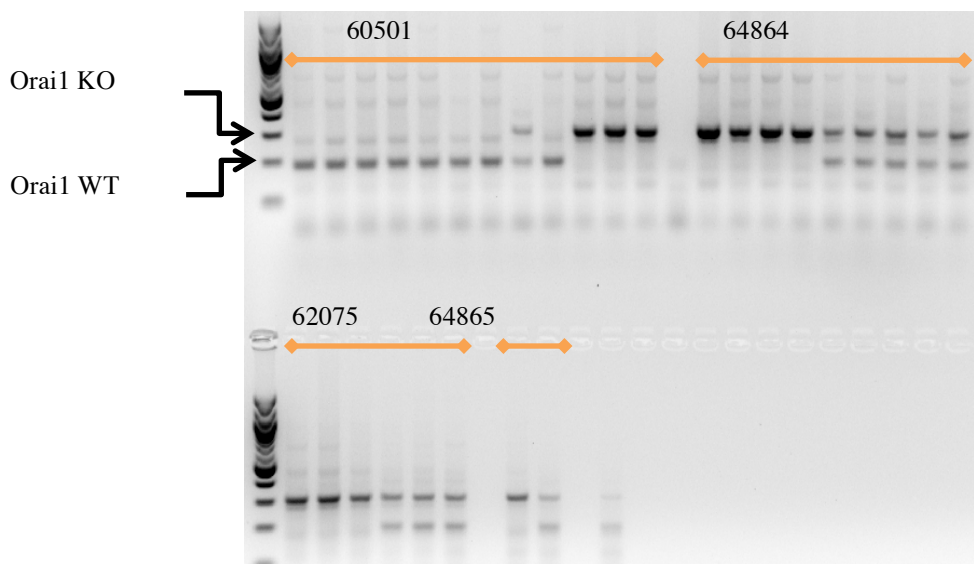


Figure 45 : Photographie d'un gel d'agarose montrant les produits d'amplification par PCR résultant du génotypage des souriceaux de 4 portées issues du croisement de 4 couples de souris hétérozygotes.

## C. Métastases osseuses

Les clones stables de PC3-TRPV6-Luciférase puis ont été directement injectés dans la moëlle osseuse du tibia de souris immunodéficientes. Des radiographies ont été effectuées sur les souris en utilisant un système de rayons X (Faxitron X-ray). Les souris portant des tumeurs ont également été observées par imagerie bioluminescente du petit animal (Berthold) 15 min après injection de Luciférine. Les lésions ostéolytiques ou ostéoblastiques ainsi que l'invasion tumorale (déterminée par bioluminescence) ont été mesurées par un système d'analyse d'image sur ordinateur. Ces expériences ont été réalisées par l'équipe du Prof. Clézardin du laboratoire UCBL-INSERM UMR1033, Lyon dont la procédure a été publiée en 2007 (Zhao Y, et al., 2007)

## D. Echantillons de peau humaine

Les échantillons de peau humaine ont été fournis soit par le Prof. Gosset, chef du service d'Anatomo-pathologie de l'hôpital Saint Vincent, Lille, et la collaboration de chirurgiens de l'hôpital réalisant des dermolipectomies abdominales ou des exérèses de sinus pilonidaux soit sous forme d'ARN par le Dr. Thierry Oddos, du département de recherche et développement chez Johnson&Johnson Santé Beauté France. Les patients inclus dans cette étude sont des femmes majeures non fumeuses et à phototype clair ([Tableau 1](#)).

Patient	Sexe	Age	Patient	Sexe	Age
1	F	67	11	F	18
2	F	26	12	F	30
3	F	42	13	F	31
4	F	39	14	F	31
5	F	19	15	F	33
6	F	49	16	F	59
7	F	28	17	F	63
8	F	46	18	F	66
9	F	30	19	F	70
10	F	64	20	F	70

[Tableau 1](#): Liste des patients inclus dans l'étude transcriptomique par PCR quantitative et fournis par l'hôpital Saint Vincent, Lille et Johnson & Johnson Santé Beauté France.



## II. Culture cellulaire

### A. Kératinocytes primaires et lignées cellulaires de kératinocytes

#### Isolement de l'épiderme cutané humain

La pièce cutanée recueillie par les chirurgiens de l'hôpital Saint Vincent de Paul de Lille, est placée dans du PBS stérile complété par 1% de Pen/Strep v/v (5000 U/ml/5000µg/ml, Gibco®) puis placée à 4°C pour le transport jusqu'au laboratoire. La pièce est ensuite rincée au PBS stérile complété par 1% de Pénicilline/Streptomycine v/v (5000 U/ml/5000µg/ml, Gibco®), gentamycine 50µg/ml puis coupée en morceaux de 5mm disposés, épiderme en dessous, dans une boîte de pétri (culture bactérienne) et couverts de PBS stérile Pen/Strep 1% complété par de la dispase à 4mg/ml toute une nuit à 37°C ou dispase 2mg/ml et collagénase I 2mg/ml pendant 6h à 37°C. Après ce traitement enzymatique, l'épiderme est délicatement détaché du derme et placé dans des eppendorffs contenant les solutions de lyse.

#### Culture des kératinocytes humains et murins

- Les hPKa sont des kératinocytes primaires humains provenant initialement de dermolipectomies chez l'adulte (Gibco®) Après décongélation des ampoules cryogénisées, les cellules sontensemencées à une densité de 25 000 cellules / cm<sup>2</sup> dans du milieu Keratinocytes SFM (Serum Free Medium) complété par 5ng/ml d'EGF (Epidermal Growth Factor) et 50µg/ml de BPE (Bovine Pituitary Extract) (Gibco®). Le lendemain le milieu est changé par du Defined Keratinocytes SFM (dKSFM) complété par des facteurs de croissance (pas de BPE), plus spécifique aux kératinocytes pour éviter le développement des fibroblastes résiduels, et pauvre en calcium <0,1mM afin de maintenir les kératinocytes à l'état indifférencié. Les kératinocytes sont placés dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est changé 3 fois par semaine et les cellules sont passées lorsqu'elles atteignent environ 80% de confluence en utilisant une solution de trypsine-EDTA (0,25%, Gibco®).
- Les kératinocytes primaires de souris sont établis à partir de la peau des souris néonatales sacrifiées. Celle-ci est rincée au PBS stérile complété par 1% de Pen/Strep v/v (5000 U/ml/5000µg/ml, Gibco®), gentamycine 50µg/ml (Gibco®). Puis, le prélèvement est coupé en morceaux de 5mm disposés, épiderme en dessous, dans une boîte de pétri (culture bactérienne) et couverts de PBS stérile Pen/Strep 1% complété par de la dispase (5mg/ml) et de la collagénase I (8mg/ml) pendant 3h à 37°C, auquel est ajoutée de la trypsine-EDTA (0,25%, Gibco®) pendant 15 min à 37°C. Le tout est ensuite neutralisé par du milieu CnT-07, PCT (CellINTEC®), filtré sur pore de 40µm, centrifugé 5 min à 1000 rcf et re-suspendu dans le milieu CnT-07, PCT (CellINTEC®) puis disposé dans un flask T25 pendant 1 semaine à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Ensuite le milieu est remplacé par le CnT-57, PCT (CellINTEC), afin de sélectionner les kératinocytes et changé tous les trois jours. Les cellules sont ensuite traitées comme les kératinocytes primaires humains à la seule différence des milieux utilisés.

### Protocole de différenciation des kératinocytes : « Calcium Switch »

Afin d'induire la différenciation, le milieu de culture pauvre en calcium <0,1 mM des cellules confluentes est remplacé par du dKSFM supplémenté par du CaCl<sub>2</sub> à hauteur de 1,7mM. L'expression des marqueurs précoces de différenciation peut être détectée dès deux jours après l'ajout de calcium, mais l'expression des marqueurs de différenciation terminale est optimale après 6 jours.

### Protocole de sénescence répllicative des kératinocytes

La sénescence intrinsèque des kératinocytes est atteinte selon le protocole de Hayflick c'est à dire par passages successifs des cellules afin d'atteindre la limite répllicative pour un maximum de cellules présentes. L'enzyme utilisée pour les passages est alors la Stempro accutase (Gibco®) qui ne clive que les protéines de la matrice extracellulaire et donc endommage moins les cellules, cependant elle est aussi moins efficace que la trypsine mais un temps d'attente trop long (plus de 10 minutes) dégrade les cellules qui n'adhéreront plus. A chaque passage, le nombre total de cellules (N) est compté et permet, en connaissant le nombre de cellules ensemencées initialement, de déterminer le nombre de doublement (dp) de population selon la formule :  $dp = \ln(N/n) / \ln(2)$ .

Généralement, la sénescence de la quasi-totalité des cellules adhérentes est obtenue au 3<sup>ème</sup> passage.

### Test SA-β-Galactosidase

Le test de sénescence SA-β-Galactosidase est réalisé grâce au kit du même nom de chez Millipore. La procédure consiste à fixer les cellules adhérentes 2 minutes dans une solution de fixation diluée dans le PBS, puis après 3 rinçages de 5 minutes au PBS, les cellules sont recouvertes d'une solution tampon à pH 6.0 (entre 5.9 et 6.1 très précisément) contenant le substrat coloré X-Gal jaune qui, lorsqu'il est clivé devient bleu. Les cellules sont alors

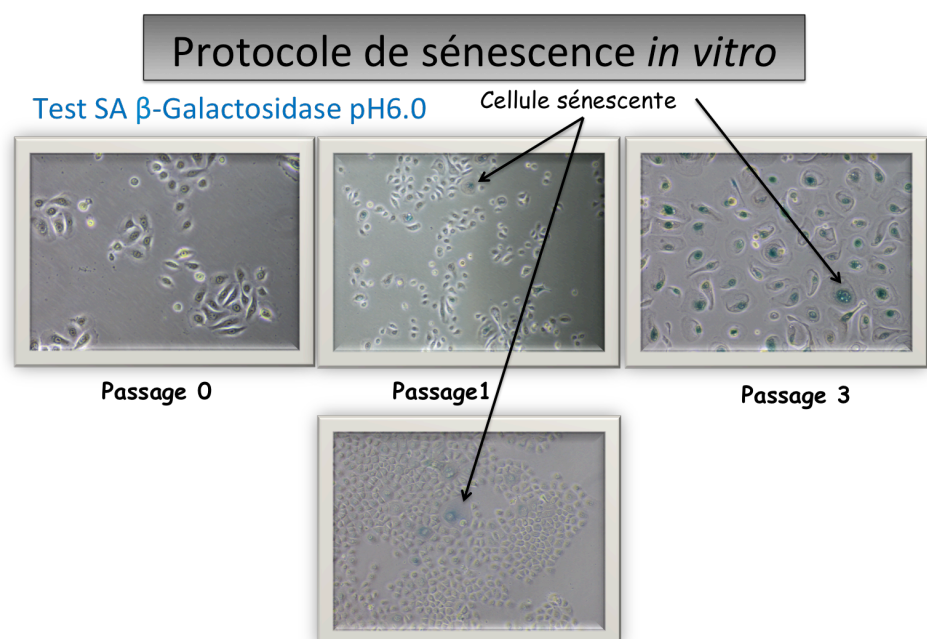


Figure 46 : Photos des hPKa testées à la SA-Galactosidase au cours des protocoles de sénescence et de différenciation

placées dans un incubateur dont l'atmosphère n'est pas enrichie en CO<sub>2</sub>. Le lendemain les cellules sont observées au microscope optique, les cellules bleues étant sénescents (Fig.46).

## **B. Cellules cancéreuses prostatiques**

### Culture des cellules cancéreuses prostatiques:

Pour ces travaux, nous avons utilisé quatre lignées cellulaires épithéliales provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, USA):

- Les cellules HEK (Human Embryonic Kidney) sont des cellules humaines non cancéreuses issues de la transformation dans les années 70 de cellules embryonnaires de rein par l'adénovirus 5.
- Les cellules LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate) sont des cellules cancéreuses prostatiques hormono-sensibles, établies en 1977 à partir d'une métastase ganglionnaire lymphatique supra-claviculaire d'origine prostatique chez un patient caucasien âgé de 50 ans.
- Les lignées DU145 et PC3 sont hormono-réfractaires établies à partir de métastases cérébrale, pour la première, et osseuse, pour la seconde, chez des hommes atteints de PCa âgés respectivement de 65 et 62 ans.

Les différentes lignées sont cultivées en flask de 75 cm<sup>2</sup> (T.75 Nunc), dans un incubateur à 37°C sous une atmosphère saturée en humidité et enrichie à 5% de CO<sub>2</sub>. Les milieux complets utilisés pour les lignées cellulaires cancéreuses prostatiques sont constitués de RPMI-1640 (Gibco) pour les LNCaP, DU145 et PC3, et de DMEM pour les HEK supplémentés par 10% de Serum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Seromed), 2 mM de L-Glutamine et 100 µg/mL de Kanamycine (Sigma). Le milieu est changé tous les 2 à 3 jours sous hotte PSMII et les cellules subissent un passage environ 1 fois par semaine avant d'arriver à confluence. Pour cela, elles sont décollées du support plastique et individualisées par trypsination (Trypsine-EDTA 0,25%) stoppée par l'ajout de milieu complet.

### Nucléofection de plasmides et sélection de clones stables

Dans chaque lignée cellulaire ci-dessus, nous avons créé des clones stables surexprimant le canal TRPV6 (pIRES-TRPV6) et des clones stables contrôles (pIRES) par nucléofection de plasmides extraits et purifiés par le kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel), pIRES contenant une séquence codant TRPV6 (2,9 kpb) pour le premier et pIRES vide pour le second. Un million de cellules sont nucléofectées par ajout de 2 µg de plasmide qsp 100 µL de tampon adapté selon le kit de nucléofection Amaxa GmbH®. Le plasmide pIRES est un vecteur d'expression dans les cellules mammifères contenant un gène de résistance à la néomycine permettant la sélection des cellules ayant intégré le plasmide par ajout dans le milieu de culture de G418 (Gentamycine) à 400 µg/mL. Les clones issus de la sélection sont ensuite récupérés un par un et isolés, puis la sur-expression de TRPV6 a été vérifiée de façon à garder 4 clones stables entretenus par ajout dans le milieu de culture de G418 à 100 µg/mL et congelés.

### Induction de la différenciation neuro-endocrine des LNCaP

Afin d'induire la différenciation neuroendocrine des cellules LNCaP, le milieu RPMI traditionnel est remplacé par du milieu déstéroïdé. Pour cela le SVF est incubé une nuit à 4°C et sous agitation avec du charbon actif (100g/l, Sigma). Le lendemain, le sérum est purifié par 2 centrifugations (30min à 10 000 rcf 4°C puis 20min 10 000 rcf à 4°C) et une filtration (pores de 0,22 µm) sous hotte aspirante. Le sérum est ensuite conservé sous forme d'aliquots à -20°C.

## **III. Biologie moléculaire**

### **A. Transfections de siARN**

Le siARN (small interfering) est un ARN interférent permettant d'éteindre l'expression d'un gène en induisant la dégradation de son ARNm complémentaire par prise en charge par le complexe DISC. Les siARN sont incorporés par lipofection de cellules adhérentes.

siARN	Numéro d'accèsion	Séquence ciblée 5' – 3'
Luciférase	AB_490793	CUUACGCUGAGUACUUCGA(dTdT)
TRPV6	NM_018646	CCUGCUGCAGCAGAAGAGG(dTdT)
TRPV6-2	NM_018646	GACTCTCTATGACCTCACA(dTdT)
ANXI	NM_000700	ACUCCAGCGCAAUUUGAUG(dTdT)
Orai1	NM_032790	UGAGCAACGUGCACAAUCU(dTdT)
STIM1	NM_003156	GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)
FAK	NM_153831.3	GAACCUCGCAGUCAUUUAU(dTdT)
TRPC1	NM_003304	GGGUGACUAUUUAUUGGUU(dTdT)
AR	NM_000044	GACUCAGCUGCCCAUCCA(dTdT)
Rac1	NM_006908	GAUAAAGACACGAUCGAGA(dTdT)
TRPC4	NM_016179	AATGGCTCAGTTCTATTAC(dTdT)
TRPC7	NM_020389	CGAGAAGGGCACCAGTCTG(dTdT)
Orai3	NM_152288	CCUUAGUCCAGCUUCCAUAU(dTdT)

Tableau 2 : Liste des siARNs utilisés (Eurogentec Co.)

Pour cela, les cellules sont transfectées avec 40 nM de siARN-Luciférase (siCT), si ARN-TRPV6 (siTRPV6) ou encore siARN-Annexine I (siANXI) à l'aide du kit HiPerfect (Qiagen®). Les séquences des siARN utilisés dans cette étude sont indiquées dans le [tableau 2](#).

### **B. Extraction d'ADN, des ARN<sub>totaux</sub> et transcription inverse**

#### Lyse des tissus

Dans le cas de tissus, ceux-ci sont découpés en petits morceaux disposés dans un tube contenant des billes en céramique (precelys kit CK28 ou CK14) et la solution de lyse. Les

tubes sont ensuite secoués par le Precelys 24 (3 cycles de 20s à 6500 vibrations/min séparés de 30s) à 4°C grâce à l'utilisation simultanée du Cryolys (Bertin) sous pression et contenant de l'azote liquide. Les tubes sont centrifugés (5min, 10 000 rcf, 4°C) et le surnageant est traité selon les protocoles suivants.

#### Extraction d'ADN génomique

Les cellules sont lysées dans la solution de lyse (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, SDS 1%) contenant la protéinase K (200 µg/mL) (Macherey) et incubées toute la nuit à 37°C. Le lendemain, une extraction d'ADN génomique classique est réalisée par ajout (v/v) de phénol/chloroforme/AIA (25 :24 :1) (Biorad) puis une précipitation à l'aide d'éthanol absolu et 0,05 mM d'acétate Na<sup>+</sup> pendant 2 h à -80°C. L'ADN précipité est centrifugé puis rincé à l'éthanol 75°. Le culot est ensuite séché puis dissout dans 15 µL de tampon TE (Tris-EDTA).

#### Extraction des ARN totaux

Les extractions des ARN<sub>totaux</sub> des prélèvements d'épiderme humain et des hPKa sont effectués en utilisant le kit Qiagen RNeasy® (Qiagen). Les ARN<sub>totaux</sub> sont dosés et rétrotranscrits avec le kit RT<sup>2</sup> First Strand (Qiagen), puis la qualité des ADNc est vérifiée en utilisant les plaques de contrôle qualité Human RT<sup>2</sup> RNA QC PCR array (Qiagen). L'ARN des lignées cellulaires est extrait au Trizol®. Les cellules sont tout d'abord lysées dans ce réactif puis l'addition de phénol/chlorophorme permet de séparer les acides nucléiques hydrosolubles dans la phase aqueuse. Ensuite l'ajout d'isopropanol provoque la précipitation des acides nucléiques qui seront lavés à l'éthanol 75% avant d'être séchés et redissouts dans l'eau milli-Q®. Les ARN sont dosés au spectromètre et leur qualité est vérifiée grâce au ratio 260/280 (compris entre 1,6 et 2) ainsi que sur gel d'agarose 2%. Afin de dégrader l'ADN génomique résiduel, 2 µg d'acides nucléiques sont traités 1 h à la désoxyribonucléase I (DNase I). Les ARN purifiés sont incubés 10 minutes à 70°C avec des amorces hexamériques aléatoires (Applied Biosystems) et tandis que ceux-ci sont protégés par des inhibiteurs de RNases (Applied Biosystems), ils subissent une transcription inverse par l'ARN polymérase MULV (Applied Biosystem, 50 U/µL) grâce à l'addition de dNTP (0,5 µM).

## C. PCR semi-quantitative

50ng d'ADNc obtenus équivalents des ARN sont amplifiés par PCR semi-quantitative grâce au kit AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) selon le protocole du thermocycleur (Perkin Elmer®) (Tableau 3) et en utilisant les amorces sens et antisens (Tableau 4). Les produits de PCR sont analysés après migration sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium (0,5 µg/mL), puis visualisés sous UV (Mini-Lumi®) et les images sont enregistrées en utilisant le logiciel Gelcapture® (Bio-Imaging System).

Etapes	activation	dénaturation	hybridation	extension	extension finale
Cycles	1	40			1
SQ	95°C	95°C	60°C	72°C	72°C
	5min	5min	30s	15s	7min
Q	95°C	95°C	60°C		65-95°C
	30s	30s	30s		Courbe de fusion

Tableau 3: Protocoles des thermocycleurs de PCR semi-quantitative (SQ) et quantitative en temps réel (Q)

## D. PCR quantitative en temps réel

No	Nom (Accession No)	Sens (5'...- 3')	Antisens (5'...- 3')	Taille (b.p)
1.	STIM1 (NM_003156)	TGTGGAGCTGCCTCAGTATG	CTTCAGCACAGTCCCTGTCA	112
2.	Orai1 (NM_032790)	ATGGTGGCAATGGTGGAG	CTGATCATGAGCGCAAACAG	115
3.	HPRT (NM_000194)	GGCGTCGTGATTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTTCAGTCTT	134
4.	Orai1 (NM_032790)	CTTCAGTGCCTGCACCACAG	CCTGGAAGTGTCTGGTTCAGTC	450
5.	$\beta$ -Actin (NM_001101)	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	209
6.	KRT1 (NM_006121)	GCTCCCATTTTGTTCGAGT	GTCTCGAGAAAGGGAGCAAA	110
7.	TGMI (NM_000359)	TCACTGTTTCATTGCCTCCA	CCCTCACCAATGTCGTCTTC	117
8.	FLG (NM_002016)	TTTCGTGTTTGTCTGCTTGC	CTGGACACTCAGGTTCCCAT	103
9.	IVL (NM_005547)	ACTGAGGGCAGGGGAGAG	TCTGCCTCAGCCTTACTGTG	121
10.	TRPV6 (NM_018646)	ATGGTGTGCGGCTCATCAGTG	GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCG	255
11.	AR (NM_000044)	TGTCCATCTTGTCTGCTTCG	CTGGAGTTGACATTGGTGAAGG	448
12.	S100A11 (NM_005620)	CAGCCCTACAGAGACTGAGC	CCTTGAGGAAGGAGTCATGG	277
13.	ANX I (NM_000700)	CTGTGAAGTCATCCAAAGGTG	CTTCAGTTCCTCTCTGTAGACC	412
14.	RAC1 (NM_006908)	GCTTATGGGATACAGCTGGAC	CTCTTCCTCTTCTTCACGGG	399
15.	TRPC4 (NM_016179)	CTGAGTTTGTGGTGCCACCATG	GTAATCCCAGGACTTCAAAGCGG	482
16.	TRPC1 (NM_003304)	TTAGAGCTGGACTGGCCAAA	ATGCACATTGTGTTCTGCAA	95
17.	TRPC1 (NM_003304)	TTCTCTCCATCCTCTTCTCTCG	GCTCTCAGAATTGGATCCTCCTC	548
18.	Orai3 (NM_152288)	GGCCAAGCTCAAAGCTTCC	CCTGGTGGGTACTCGTGGT	112
19.	KRT10 (NM_000421)	ATCTGAAGCAGGATGTTGGC	GAGCCTCGTGACTACAGCAA	98
20.	TRPV6 (NM_018646)	TTGGCAGCTAGAAGGAGAGG	CCCAAGGAGAAAGGGCTAAT	145

Tableau 4: Séquences des amorces utilisées en PCR semi-quantitative (script droit) et quantitative en temps réel (*script italique*).

50 ng d'ADNc obtenus équivalents des ARN sont amplifiés et quantifiés selon le protocole du système de détection de q-PCR en temps réel CFX96 (Biorad) du Tableau 3 en utilisant le kit Mesa Green qPCR MasterMix Plus pour test SYBR (Eurogentec Co.) complété par les amorces (Invitrogen) énumérées dans le Tableau 4. Les résultats sont quantifiés en utilisant la méthode comparative du seuil Delta Delta C(T) décrite précédemment (Livak and Schmittgen,

2001). Dans le cas des analyses transcriptomiques, nous avons utilisé des plaques de qPCR contenant déjà les amorces des cibles dans chaque puits (Tableau 5),

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TRPC1	TRPC3	TRPC4	TRPC5	TRPC6	TRPC7	TRPV1	TRPV2	TRPV3	TRPV4	TRPV5	TRPV6
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TRPA1	TRPM1	TRPM2	TRPM3	TRPM4	TRPM5	TRPM6	TRPM7	TRPM8	MCOLN1	MCOLN2	MCOLN3
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
PKD1	PKDREJ	PKD1L1	PKD1L2	PKD1L3	PKD2	PKD2L1	PKD2L2	ORAI1	ORAI2	ORAI3	ATP2B1
25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
ATP2B2	ATP2B3	ATP2B4	CASR	PANX1	PANX3	STIM1	STIM2	ATP2A2	ATP2A3	RYSR1	RYSR2
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
RYSR3	ITPR1	ITPR3	HSPA5	MCU	CS	SOD2	ATP2C1	SQSTM1	MAP1LC3B	BCL2	NOS1
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
NOS3	KL	SHC1	TERT	GLB1	CDKN1A	CDKN2A	PCNA	FLG	KRT10	KRT5	CASP3
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
RB1	TP53	SP1	JUN	JUND	TFAP2A	TFAP2C	TFAP2E	CREB1	NFATC1	NFATC2	NFATC3
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
AKT1	MTOR	PPARG	ADCY10	TMEM158	HPRT1	GUSB	TBP	B2M	HGDC	RTC	PPC
85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96

Tableau 5 : Schéma de la plaque Qiagen contenant les amorces des cibles étudiées dans les analyses transcriptomiques de l'épiderme humain.

Custom Human RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array. (CAPH12384D, Qiagen) en suivant à la lettre le protocole conseillé.

## **IV. Analyse protéomique**

### **A. Biotinylation des protéines membranaires, extraction et dosage des protéines totales**

Après un lavage au PBSB (PBS 10%, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5mM, pH 8), les cellules sont incubées avec une solution de PBSB-Biotine (1 mg/mL) pendant 30 minutes à +4°C puis incubées 2 minutes avec une solution de PBSB-BSA (20 ng/mL) sur glace. Après 2 rinçages au PBSB, les cellules sont lysées sur glace avec une solution RIPA (NaCl 150 mM, PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>/K 20 mM pH 7,2, Triton X-100 1%, Déoxycholate de sodium 1%, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM) complétée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma) 10 µL/mL *ex-tempera*, subissent une ultra-sonnication et sont centrifugées. Puis les surnageants sont récupérés et dosés par la méthode BCA (Pierce). 50 µg de protéines totales sont conservées et le reste est incubé avec 60 µL de billes streptavidine (Pierce) toute une nuit à +4°C. Le lendemain les billes sont lavées au PBS et les protéines membranaires sont récupérées dans le tampon Laemmli (Tris-HCl 125mM, pH6.8, SDS 4%, β-mercaptoethanol 5%, glycérol 20%, bleu de bromophénol 0,01%) pour l'électrophorèse SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis).

### **B. Co-immunoprécipitation**

Sur glace, 100µg de protéines totales (lysées comme précédemment mais sans Déoxycholate de sodium) sont incubées avec la quantité adéquate selon l'anticorps de la protéine à « pêcher » (entre 5-10µl pour un anticorps polyclonal et 2-5µl pour un anticorps monoclonal) toute la nuit à +4°C sous rotation. Le lendemain, 50 µl de billes de sépharose couplées aux protéines A et G (Santa Cruz) sont rincées au PBS avant d'y ajouter le lysat protéique et d'incuber le tout 4H à +4°C. Les lysats protéiques et les billes sont ensuite centrifugés 5min à 1000 rcf et +4°C puis rincés 3 fois au PBS avant de reprendre les billes dans 50µl de tampon Laemmli 2x et faire bouillir à 95°C pendant 5min avant de charger le surnageant dans les puits d'électrophorèse.

### **C. Électrophorèse en conditions dénaturantes et Immunodétection des protéines.**

Les protéines totales (50 µg) ou les protéines membranaires sont analysées par électrophorèse monodimensionnelle en conditions dénaturantes sur gel d'acrylamide 10%. Pour cela les protéines sont dénaturées et chargées négativement par le tampon Laemmli (SDS 10%, glycérol 50%, β-mercaptoethanol 25%, Tris-HCl 0,31M, bleu de bromophénol, pH

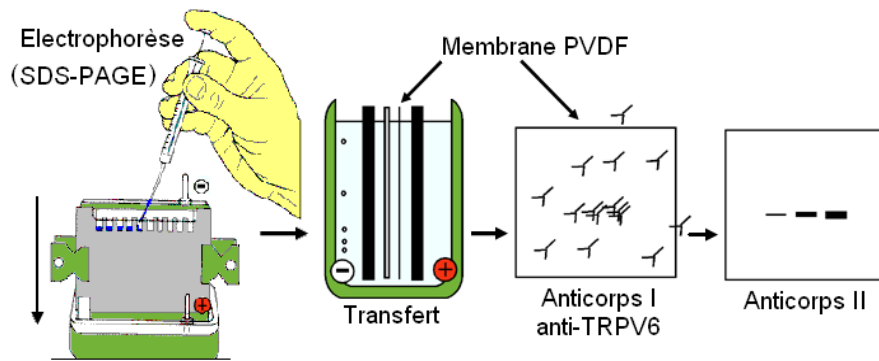


Figure 47: Les différentes étapes du « Western Blot »

6.8). Après migration, les protéines subissent un électrotransfert semi-sec (BioRad) sur membrane PVDF (Polyvynildienne Fluoride) (Fig.47). Les sites aspécifiques de la membrane sont saturés dans du TNT-lait 5% (Tris-HCl, pH 7,4, NaCl 140 mM et Tween 20 0,05% et lait en poudre écrémé) pendant 1 h. La membrane est ensuite incubée toute une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (polyclonal à 1:200<sup>e</sup> ou monoclonal à 1:1000<sup>e</sup>). Le lendemain, la membrane est rincée puis à nouveau incubée 1H à température ambiante avec l'anticorps secondaire (1 :10 000) couplé à la peroxydase (HRP). Enfin, la membrane est à nouveau rincée au TNT et révélée par chimioluminescence grâce au substrat Supersignal West Dura (Pierce), exposée au film BioMax Light (Eastman Kodak Co.) et la densité du signal est évaluée par le logiciel ImageJ. Les dilutions et références de chaque anticorps utilisés sont décrites dans le « matériel et méthode » correspondant.

## D. Immunodétection sur coupes de tissus ou cellules fixées

### Préparation et coupes des tissus paraffinés

Les tissus prélevés sont tout d'abord fixés dans le formaldéhyde 3,7% puis progressivement déshydratés par des bains successifs d'éthanol (de 30% à 100%). Le tissu est ensuite plongé dans quatre bains successifs dans la paraffine chaude puis inclus dans un bloc de paraffine. Des coupes de tissus de 4µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome et déposées sur lame de verre. Les tissus sont déparaffinés par 3 bains successifs dans un solvant organique (Claral) et 4 bains d'éthanol de titres décroissants pour réhydrater le tissu. Un bain de méthanol contenant du peroxyde d'hydrogène (0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) peut être ajouté pour supprimer l'activité des peroxydases endogènes en cas d'utilisation d'un anticorps couplé à la HRP. Les coupes sont rincées dans le PBS puis les épitopes sont démasqués (clivage des ponts disulfures créés par le fixateur) par différentes techniques selon les anticorps utilisés. La plus courante dans nos études a été la méthode thermique: les lames sont immergées dans du tampon citrate 10 mM à pH 6 et chauffées au micro-onde (3x4min et 1x5min). Une fois refroidies, les lames sont rincées dans le PBS et subissent le même protocole de marquage que les cellules avec des anticorps secondaires fluorescents ou couplés à la HRP auquel cas le DAB sera utilisé pour la révélation et le bleu azur comme coloration de fond.



Lorsque les marquages ont été réalisés au laboratoire d'anatomopathologie de l'hôpital Saint Vincent, les conditions utilisées sur le système automatisé Benchmark XT (Ventana Medical Systems) et détection IVIEW-DAB (N760-500; Ventana Medical Systems) sont décrites dans le [tableau 6](#). Pour les marquages de l'épiderme, la phosphatase alcaline a été préférée au DAB pour éviter tout faux positifs dus aux pigments marrons de mélanine.

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Pretreatment	Incubation (min)
PSA	Dako	Polyclonal Code A0562	1/500	CC2 STD	32
CD31	DAko	Mono JC70 A	1/25	CC2 COURT	32
Ki-67	Dako	Mono MIB-1	1/100	CC2 STD	32
Capase 3 cleaved	Cell Signaling Technology ( <a href="http://www.cellsignal.com">www.cellsignal.com</a> )		1/250	CC1 STD + AMPLI	32
Synaptosin	Abcam	Mono SP11	Previously diluted	CC1 COURT	24
CD56	Leica	Mono 1B6	1/10	CC2 STD	32

**Tableau 6 :** Conditions utilisées en marquage histologique automatisé sur système Benchmark XT (Ventana Medical Systems) et détection IVIEW-DAB (N760-500; Ventana Medical Systems)

### Immunofluorescence

Les cellules, cultivées sur lamelle de verre, sont fixées au Paraformaldéhyde (PAF) à 4%, 10 min à +4°C. Le PAF est ensuite bloqué par du PBS-Glycine 30mM, 5 min à température ambiante. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois 5 min au PBS-Gélatine (0,1 M) puis couvertes de solution de saturation (PBS-gélatine, Sérum d'âne 1%, BSA 1%, triton X-100 0,05% inutile si l'épitope est extracellulaire) contenant l'anticorps primaire à la dilution adéquate (entre 1/50<sup>e</sup> et 1 :200<sup>e</sup>) pendant 2H à 37°C. Trois rinçages de 10 minutes sont effectués à température ambiante (2 au PBS-gélatine et le dernier avec le tampon de saturation). Les lamelles sont incubées 1h à 37°C avec le tampon de saturation contenant l'anticorps secondaire fluorescent Alexa Fluor (Abcam) (1 :2000<sup>e</sup> pour le 488 nm et 1 :4000<sup>e</sup> pour le 555 nm). Enfin un premier rinçage au Tampon de saturation contenant du Dapi (1 :200<sup>e</sup>) est effectué 10 min à température ambiante suivi de deux autres rinçages au PBS-gélatine. Les lames sont finalement couvertes d'une lamelle de verre collée au Mowiol chauffé à 37°C puis analysées au microscope confocal (Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM510 connecté à microscope Zeiss Axiovert 200M avec ouverture numérique de 63 × 1.4). Les images sont analysées grâce au logiciel Carl Zeiss LSM Image.

## **V. Biologie cellulaire et test fonctionnel**

### **A. Etude de la prolifération cellulaire**

#### Cytométrie en flux et cycle cellulaire

La cytométrie en flux permet de discriminer les cellules suivants plusieurs paramètres, leur taille, leur granulosité ou divers fluorochromes incorporés préalablement dans les cellules. Pour analyser la répartition des cellules dans le cycle cellulaire, 1.10<sup>6</sup> cellules sont récupérées par trypsinisation, culotées, rincées au PBS et à nouveau centrifugées (1000 rcf, 5min), puis le culot est fixé au méthanol -20°C sous hotte aspirante pendant 10min. Après 3 rinçages au PBS, les cellules fixées sont incubées 2h à l'obscurité et à +4°C dans une

solution d'iodure de propidium (50µg/ml, IP, Sigma), un fluorochrome intercalant de l'ADN, à 25µg/ml dans du PBS et 100µl de RNase A (1mg/ml, Sigma). La répartition des cellules fixées et marquées par l'IP (entre les différentes phases, subG1 correspondant à l'apoptose, G0/G1, S et G2M) est mesurée à 520nm après excitation à 488nm par un cytomètre en flux FACScan (Becton-Dickinson) couplé à un logiciel d'aquisition (CellQuest).

#### Directe par comptage en cellule de Malassez

Initialement, trois puits de Ø 35 mm sont chargés de 30 000 cellules chacun. Les trois jours suivants, celles-ci sont détachées et individualisées par trypsinisation douce puis comptées en cellules de Malassez. Chaque puits fait l'objet de 6 comptages de cellules de Malassez entière.

#### Indirecte par dosage colorimétrique MTS-PMS

Le kit de mesure de prolifération utilisé (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation assay) est une méthode colorimétrique permettant de déterminer le nombre de cellules viables en prolifération. Ce kit est composé de MTS (sel tetrazolium) et de PMS (phenazine methosulfate) permettant la mesure de l'activité enzymatique des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives et qui, par l'intermédiaire du NADH,H<sup>+</sup>, réduisent le MTS incolore en présence de PMS donnant le formazan, produit coloré (Fig.48). La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture. Celle-ci est quantifiée par son absorbance à 490 nm grâce au spectrophotomètre de plaque (Molecular Devices). Initialement, 2 500 cellules sont chargées dans chacun des 36 puits de 4 plaques adaptées au lecteur puis le dosage est effectué quotidiennement pendant 4 jours.

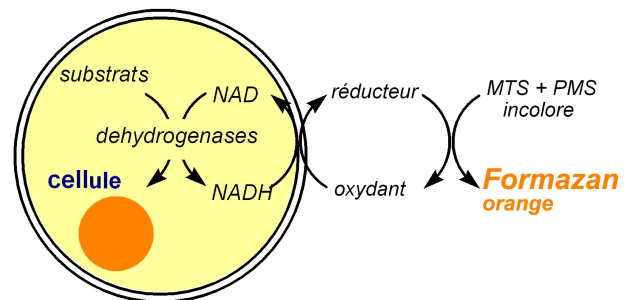


Figure 48: Réactions en jeu dans le test colorimétrique de MTS-PMS

## B. Tests de migration

### Test de blessure (Wound healing)

Des kératinocytes sont maintenus en culture jusqu'à atteindre 90% de confluence. A l'aide d'un cône pour micropipette, une bande de cellules est ensuite arrachée du support, formant la « blessure ». Le milieu de culture est remplacé et les cellules sont ensuite replacées dans l'incubateur. Les cellules vont alors migrer pour « cicatriser » la blessure. L'évolution du processus de migration est suivie dès la blessure et chaque jour suivant en prenant des photos de plusieurs champs vus au microscope optique.

### Etude de la migration polarisée par marquage de la membrane plasmique

Cette technique a pour but de suivre les déplacements d'une ou d'un groupe de cellules à l'aide d'un microscope confocale. Pour cela, les cellules sont cultivées sur des boîtes avec un fond en verre. Le jour de la manipulation, le marquage de la membrane plasmique est

réalisé à l'aide d'une sonde spécifique : CellMask™ Orange. C'est une molécule amphiphile, présentant une partie lipophile pour une bonne charge des cellules et une partie hydrophile chargée négativement pour un « ancrage » à la membrane plasmique. Le protocole consiste à mettre les cellules en contact avec une solution de CellMask™ Orange préparée à une concentration de 5µM dans du milieu K-SFM supplémenté pendant 10 minutes à 37°C. L'excès de sonde est ensuite lavé avec une solution HBSS, 3 fois 5 minutes, puis les images des cellules fluorescentes sont acquises en utilisant un microscope confocale Zeiss LSM 510. La molécule est excitée à 543 nm avec un laser HeNe et l'émission lumineuse est capturée au-dessus de 585 nm. Après avoir sélectionné une cellule isolée ou un groupe de cellule, une image est prise toutes les 36 secondes pendant 1 heure.

### Migration en chambre de Boyden (Transwell)

20.000 cellules sont déposées directement sur les inserts (Falcon) composés d'une membrane percée de pores de 8µm et surélevés par rapport au fond des puits (Fig.49). Après le traitement désiré, les cellules n'ayant pas migré sont enlevées en grattant le fond de l'insert à l'aide d'un coton tige, et les cellules ayant migré vers la face inférieure de la membrane sont fixées dans une solution de méthanol glacial (-20°C) pendant 10 minutes sous hotte aspirante. Les inserts sont lavés au PBS, pour ensuite être transféré dans une solution de Hoechst® (5 mg/mL), permettant de marquer le noyau des cellules, pendant 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité. Les filtres de chaque insert sont ensuite découpés et placés entre lame et lamelle de verre. Ils sont enfin observés au microscope à épifluorescence muni d'un filtre UV Zeiss ( $\lambda_{exc}=435nm$ ) pour compter toutes les cellules ayant traversé la membrane.

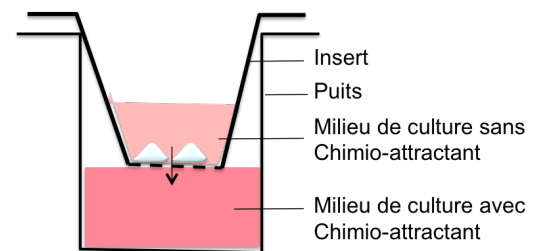


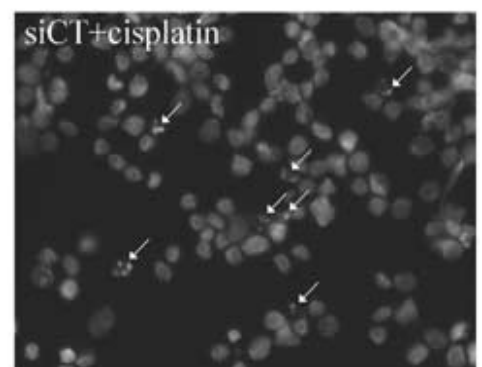
Figure 49: Schéma du dispositif utilisé pour le test de Transwell.

## C. Etude de la mort cellulaire par apoptose

Les différentes techniques présentées ci-dessous reposent sur les caractéristiques des cellules apoptotiques, à savoir la condensation de l'ADN (Hoescht®) et la fragmentation de l'ADN par des endonucléases (échelle d'ADN) laissant des extrémités libres reconnues par la transférase de déoxynucleotide terminal remplaçant le déoxyT par un déoxyUTP couplé à un marqueur fluorescent (TUNEL).

### Coloration des noyaux par la solution Hoechst®

Les taux d'apoptose sont estimés à partir du nombre de noyaux apoptotiques détectés par coloration Hoechst®. Le bisbenzimidazole (Hoescht, Sigma) est un agent intercalant de l'ADN permettant la visualisation de la chromatine en microscopie à fluorescence. Les cellules sont trypsinisées, récupérées en culot et fixées au méthanol glacé



107 Figure 50 : Détection des noyaux apoptotiques (fléchés) par coloration Hoechst.

sous hotte aspirante 10min puis, centrifugées sur cytopspine. Ensuite, les lames sur lesquelles sont fixées les cellules sont incubées 30 minutes à l'obscurité avec la solution Hoescht® (5 mg/mL) puis rincées. Enfin les lamelles sont montées sur lame (au glycergel®) et conservées à l'obscurité à 4°C. Les différentes morphologies des noyaux apoptotiques telles que la condensation péri-nucléaire de la chromatine, l'hyper-condensation de la chromatine et la formation de vésicules apoptotiques (Fig.50), sont observées au microscope à épifluorescence Zeiss ( $\lambda_{exc}=435nm$ ).

#### Echelle d'ADN

L'ADN génomique extrait selon la méthode vue précédemment et mélangé au tampon de charge (5X) et déposé dans un gel d'agarose 1,5%. La migration est réalisée dans le tampon TAE 0,5X pH 8,0 (Tris-Base 2M, Na acétate-3 H<sub>2</sub>O 1 mM, EDTA-Na<sub>2</sub> 50 mM) à 100V. Enfin le gel est observé sous UV (MiniLumi®) et les images sont obtenues à partir du logiciel Gel Capture®.

#### Test TUNEL

Le test de la Terminal deoxynucleotidyl transférase dUTP Nick End Labeling ou TUNEL est réalisée en utilisant le kit In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche) selon les instructions fournies par le fournisseur. Rapidement, les cellules adhérentes sur lamelles sont fixées 1h à température ambiante grâce à la solution fournie (ou fixées puis centrifugées par cytopspine), rincées au PBS et la solution de fixation est bloquée 10 min à température ambiante puis les cellules sont perméabilisées par ajout de la solution 2 min sur glace. Après 2 rinçages au PBS, les cellules sont incubées avec 50µl de solution de marquage 1h à 37°C dans le noir. Enfin les lamelles sont rincées 3 fois au PBS, fixées sur lame de verre grâce au glycergel et observées au microscope fluorescent (excitation à 450 nm et émission à 555 nm). Seules les cellules fluorescentes sont apoptotiques.

## **VI. Patch clamp et imagerie calcique**

### **A. Patch Clamp**

Le « patch clamp » est une technique d'électrophysiologie sur cellule unique qui consiste à isoler électriquement un fragment de la membrane plasmique de la cellule vivante en lui apposant une pipette de verre d'un diamètre de l'ordre du micromètre (10<sup>-6</sup> m) d'une manière étanche en appliquant une légère dépression dans cette pipette de verre.

Ce protocole permet alors d'imposer un potentiel en mesurant simultanément des fluctuations de courant de l'ordre du picoampère (pA, 10<sup>-12</sup> A) avec une fréquence très élevée (> 1 kHz). Plusieurs configurations sont possibles selon la nécessité de l'expérimentateur, soit l'activité d'un seul canal ionique (courant unitaire), à savoir les configurations « cellule attachée », « inside-out » et « outside-out », soit de tous les canaux situés dans la membrane plasmique (courant global) en configuration « cellule entière » (Fig.51). L'ensemble des expériences de Patch-Clamp des articles présentés par la suite a été réalisé en configuration cellule entière à température ambiante. Les courants ioniques transmembranaires sont mesurés à l'aide d'un amplificateur EPC9 (HEKA Electronic,

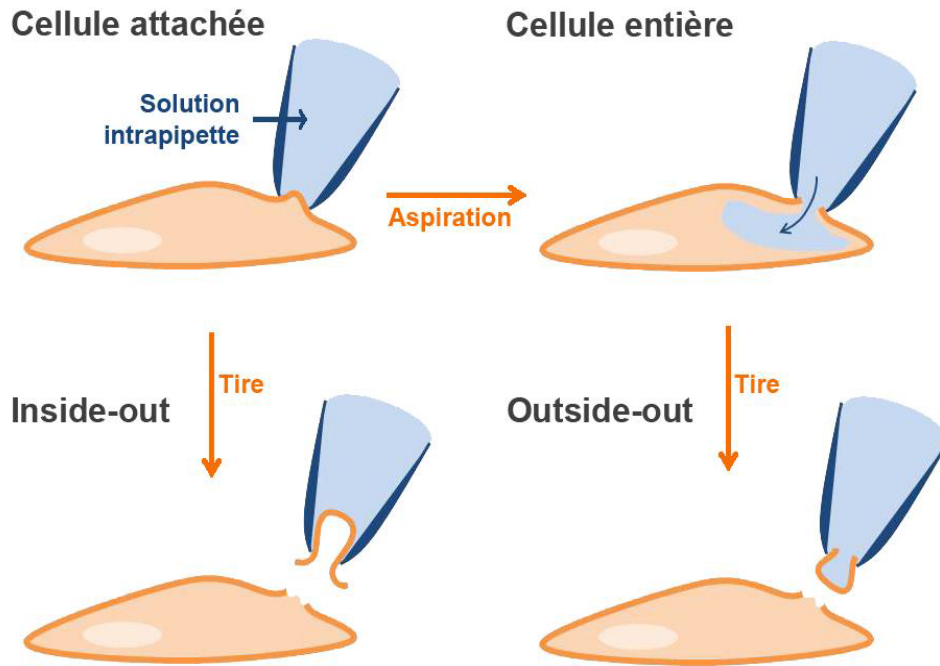


Figure 51: Représentation schématique des différentes configurations d'enregistrement en « Patch-Clamp » (Vandenberghe M., 2011)

Allemagne) couplé à un ordinateur et analysés grâce au programme Origin 7.0 (Microcal, Northampton, MA).

## B. Imagerie calcique

La technique d'imagerie calcique permet de détecter les variations de concentration calcique dans le cytoplasme de l'ensemble des cellules vivantes présentes dans le champ du microscope. Cette mesure quantitative est permise grâce à l'utilisation de la sonde ratiométrique Fura2-AM. En effet, c'est un chélateur calcique fluorescent possédant deux longueurs d'onde d'excitation en fonction qu'il soit libre (380 nm) ou lié (340 nm) au calcium et une unique longueur d'onde d'émission (510 nm). Ainsi, l'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme des cellules se traduit par une diminution de la fluorescence émise à 510 nm suite à une excitation à 380 nm alors que la fluorescence émise à 510 nm suite à excitation à 340 nm augmente. Le second grand avantage du fura2-AM est dû à ce groupement aceto-methoxy (AM) qui lui permet de traverser la membrane plasmique des cellules, puis celle-ci est clivée dans le cytoplasme par des estérases empêchant la sonde de ressortir (Fig.52). Donc les cellules à étudier sont chargées de sondes fluorescentes en ajoutant 2,5 $\mu\text{M}$  de fura2-AM dans le milieu de culture pendant 45 min à 37°C, puis le surplus est éliminé en changeant le milieu de culture 15 min à 37°C. Les cellules sont finalement rincées quelques minutes avec du milieu HBSS standard (Hank's Balanced Salt Solution) dont la composition

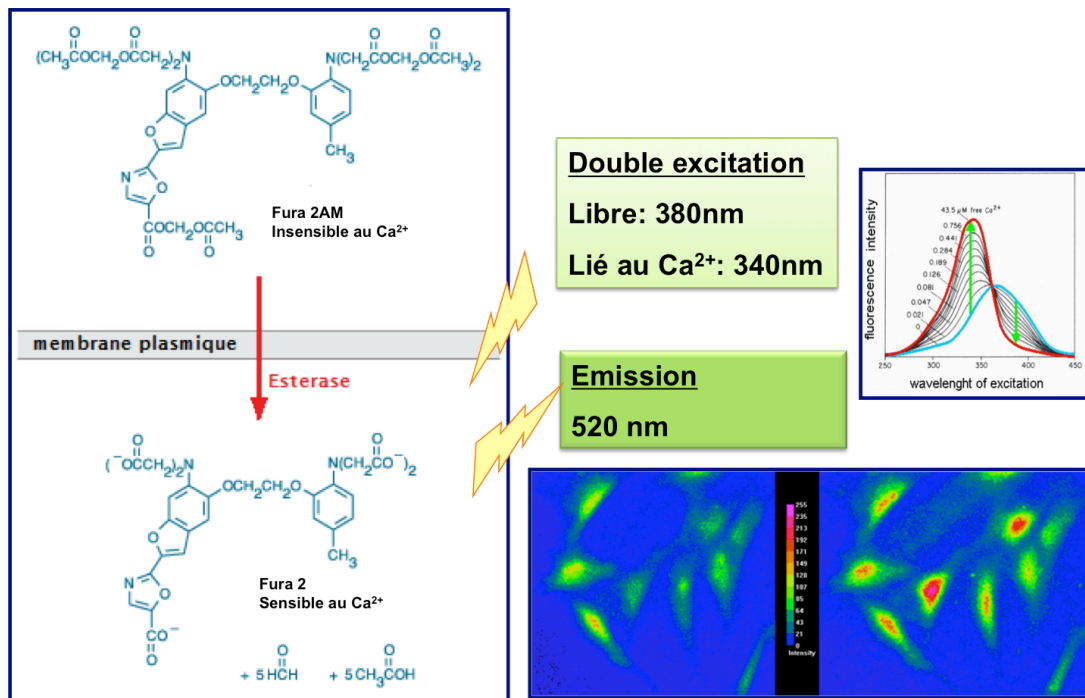


Figure 52: Caractéristiques de fonctionnement de la sonde calcique ratiométrique Fura2-AM et visualisation d'une augmentation du calcium cytosolique.

est la suivante : 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>P<sub>04</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose, et 10 HEPES. Le pH est ajusté à 7.4 avec du NaOH.

Enfin, les protocoles permettant de visualiser les différentes entrées et vidanges calciques seront développés dans le chapitre « Résultats ». L'équipement permettant de visualiser les variations d'émission de fluorescence par la sondes aux 2 longueurs d'onde d'excitation est composé d'un microscope à épifluorescence (Olympus IX 70), d'une lampe au xénon, d'un monochromateur Till Photonics, d'une caméra digitale CCD (Charge Coupled Device) 12 bits (MicroMax 5 Mz, Princeton) et d'un ordinateur dont le logiciel (Métafluor 5.0, Universal Imaging) permet la stimulation, l'acquisition et l'analyse des images.

## VII. Etudes statistiques

L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Origin 7.0 (Microcal Software Inc.). Les résultats exprimés sous forme de moyennes arithmétiques  $\pm$  écart-type (S.E.M) sur un minimum de 3 expériences indépendantes comparées par le test ANOVA. Dans les graphes, (\*), (\*\*) et (\*\*\*) signifient une différence significative avec  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  et  $P < 0,001$  respectivement. Dans le cas de l'analyse transcriptomique par qPCR en fonction de l'âge, les données ne suivant pas une distribution normale, les analyses statistiques ont été faites avec le logiciel « R » par des tests non-paramétriques sur deux groupes indépendants ( $n=10$ ) avec le test de Mann-Whitney-Wilcoxon ou en régression linéaire avec le test de la corrélation de Spearman ( $n=20$ ). Ces tests ont été réalisés à l'aide du Dr. Laurène Norberciak (Département de la Recherche Médicale), Biostatisticienne en charge des analyses statistiques dans notre projet CPP.

# RESULTATS

*“La théorie, c’est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.  
La pratique, c’est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.  
Ici, nous avons réuni théorie et pratique:  
Rien ne fonctionne...et personne ne sait pourquoi!”*

*Albert Einstein*

# I. Le canal calcique Orai1, chef d'orchestre de l'homéostasie de l'épiderme.

Article 1:Orai1 calcium channel orchestrates skin homeostasis

**Matthieu Vandenberghe<sup>a,\*</sup>, Maylis Raphaël<sup>a,\*</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>a,\*</sup>, Dmitri Gordienko<sup>a</sup>, Ryan Hastie<sup>b</sup>, Thierry Oddos<sup>c</sup>, Anjana Rao<sup>b</sup>, Patrick G. Hogan<sup>b</sup>, Roman Skryma<sup>a</sup>, and Natalia Prevarskaya<sup>a</sup>**

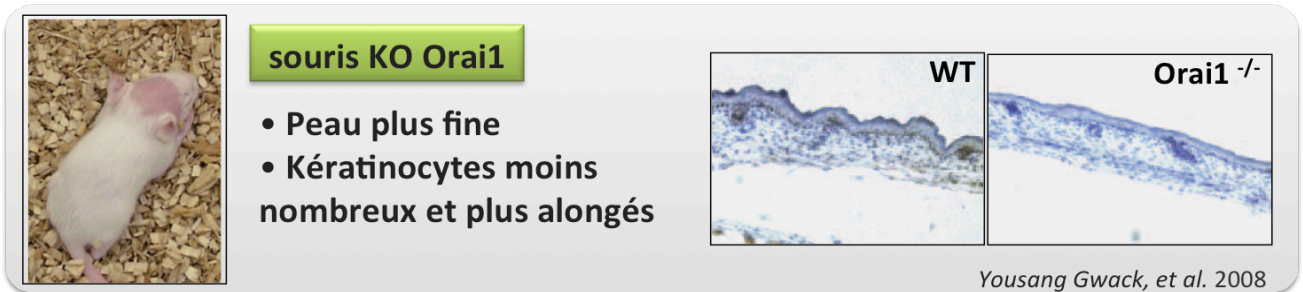
a-Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1003, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; b- La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA 92037; and c- Pharmacology Department, Johnson and Johnson Santé Beauté France, Campus de Maigremont, 27100 Val de Reuil, France.

## Abstract:

To achieve and maintain skin architecture and homeostasis, keratinocytes must intricately balance growth, differentiation, and polarized motility known to be governed by calcium. Orai1 is a pore subunit of a store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel that is a major molecular counterpart for  $\text{Ca}^{2+}$  influx in nonexcitable cells. To elucidate the physiological significance of Orai1 in skin, we studied its functions in epidermis of mice, with targeted disruption of the *orai1* gene, human skin sections, and primary keratinocytes. We demonstrate that Orai1 protein is mainly confined to the basal layer of epidermis where it plays a critical role to control keratinocyte proliferation and polarized motility. Orai1 loss of function alters keratinocyte differentiation both *in vitro* and *in vivo*. Exploring underlying mechanisms, we show that the activation of Orai1-mediated calcium entry leads to enhancing focal adhesion turnover via a PKC $\beta$ -Calpain-focal adhesion kinase pathway. Our findings provide insight into the functions of the Orai1 channel in the maintenance of skin homeostasis.



A



B

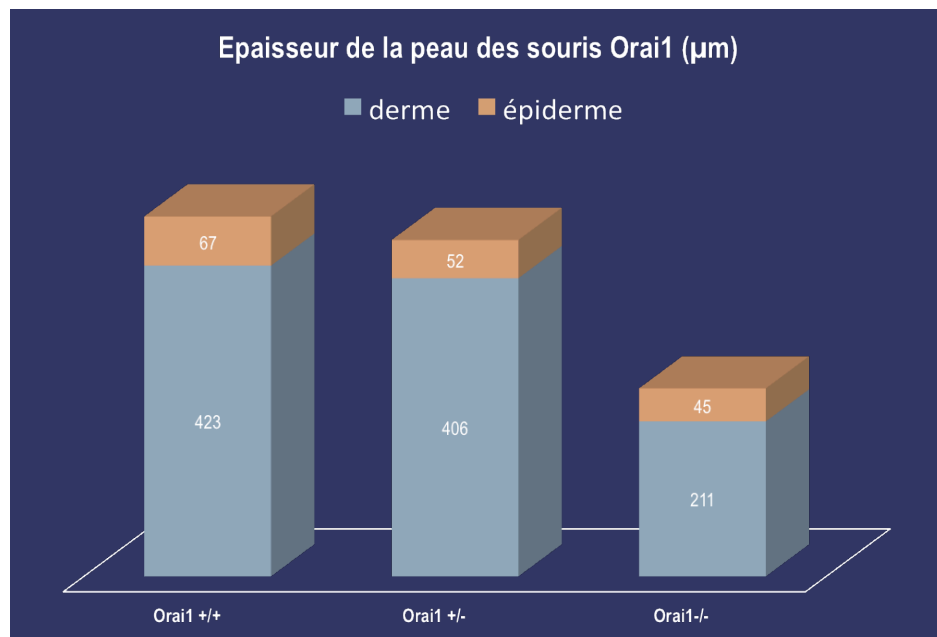


Figure 53 : Etude de l'épiderme des souris transgéniques Orai1<sup>-/-</sup>. Observation du phénotype cutané avec alopecie partielle et de la physiologie de l'épiderme en coupe transversale (A) (Source : Gwack Y. et al., 2008). Histogrammes comparant l'épaisseur en  $\mu\text{m}$  de la peau (derme et épiderme) des souriceaux « sauvages » (Orai1<sup>+/+</sup>) et transgéniques hétérozygotes (Orai1<sup>+/-</sup>) ou homozygotes (Orai1<sup>-/-</sup>) (B).

## RESUME

En se basant sur les observations du phénotype cutané des souris *Orai1*<sup>-/-</sup> faites par Y. Gwack et ses collaborateurs en 2008 (Gwack et al., 2008), il est clair que le canal calcique *Orai1* joue un rôle important dans l'homéostasie de l'épiderme et le contrôle des kératinocytes, d'autant plus que le SOCE représente le plus grand influx calcique dans les cellules non excitables (pour revues voir Barritt, 1998; Parekh and Putney, 2005). En effet, les souris transgéniques *Orai1*<sup>-/-</sup> souffrent d'alopécie partielle, traduisant un dysfonctionnement des follicules pileux qui sont aussi moins nombreux dans un épiderme plus fin, moins dense en cellules (Fig. 53). Nous avons donc étudié le rôle de ce canal dans les kératinocytes primaires de l'épiderme humain et adulte (hPKa).

Tout d'abord, nous avons montré, par immunohistologie classique sur les coupes de peau d'Hommes adultes, que l'expression des protéines du SOCE, *Orai1* et *Stim1*, est quasi-exclusive à la couche basale de l'épiderme, c'est à dire au niveau des hPKa indifférenciés (UhPKa) exprimant les cytokératines 5 et 14. De plus, en utilisant le protocole de « calcium-switch », consistant à augmenter la concentration de calcium extracellulaire ( $[Ca^{2+}]_e$ ) pour induire *in vitro* la différenciation des kératinocytes, nous avons confirmé la diminution progressive de l'expression de *Orai1* et *Stim1* au cours de la différenciation des hPKa induite par le calcium. Donc *Orai1* et *Stim1* sont bien exprimés dans les UhPKa et leur expression diminue avec la différenciation. Par la suite, des expériences de patch clamp ont prouvé l'existence d'un courant SOC (induit par la Thapsigargine-Tg ou l'Inositol-triphosphate- $InsP_3$ ) dans les UhPKa mais qui diminue dans les kératinocytes différenciés (DhPKa). Ce courant est presque totalement aboli ( $\approx 80\%$ ) en cas de diminution de *Orai1* et *Stim1* dans les UhPKa, ce qui montre que le SOCE est fonctionnel dans les hPKa et principalement conduit par le canal *Orai1* dans les UhPKa. Puis, lorsque nous avons inhibé *in vitro* l'expression de ces protéines en utilisant des petits ARN interférents (siRNA), nous avons constaté une inhibition de la prolifération cellulaire constitutive ou de celle induite par le facteur de croissance EGF (test MTS et comptage). Or, nous avons prouvé, par imagerie calcique, que l'EGF est capable d'induire une vidange du calcium réticulaire et, par conséquent, le SOCE. Cette vidange réticulaire met en jeu l'activation de la PLC, et donc probablement des récepteurs  $InsP_3R$ , puisque un inhibiteur de la PLC (U73122) annule l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) correspondant à la vidange du réticulum endoplasmique (RE).

Ensuite, nous nous sommes intéressés au rôle que pouvait potentiellement jouer *Orai1* dans la différenciation des hPKa induite par le calcium. Contrairement à ce que nous attendions, nous avons montré qu'*Orai1* s'oppose à la différenciation des hPKa puisque l'utilisation d'un si*Orai1* dans les UhPKa, en faible  $[Ca^{2+}]_e$  (0,07 mM) est suffisante pour induire l'expression de l'involucrine mais pas celle de la transglutaminase. L'extinction d'*Orai1* permet donc d'initier la différenciation en  $[Ca^{2+}]_e$  faible mais aussi d'accélérer l'expression des marqueurs de différenciation (KRT1, IVL, TGM, FLG) en  $[Ca^{2+}]_e$  élevée. Donc *Orai1* favorise plutôt le maintien des hPKa à l'état basal indifférencié.

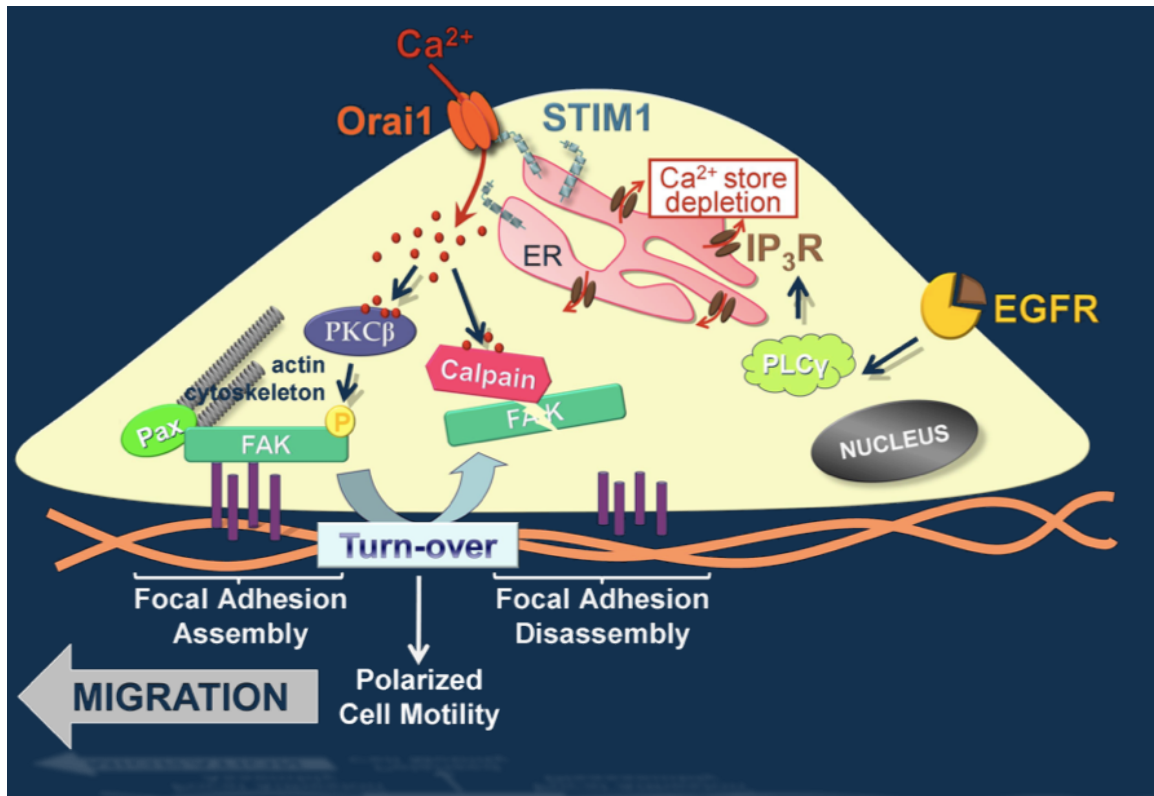


Figure 54 : Schéma représentant la voie de transduction mise en jeu dans l'activation de la migration des hPKa indifférenciés dépendante du SOCE.

Le facteur de croissance EGF agit sur son récepteur couplé aux protéines G, EGFR, ce qui active la PLC à l'origine de l'hydrolyse du PiP2 en DAG et IP<sub>3</sub>. Ce dernier déclenche la vidange calcique du réticulum endoplasmique (ER) détectée par Stim1 qui active Orai1 et l'entrée SOCE de calcium. L'augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> résultant du SOCE favorise le renouvellement des adhésions focales (FA). En effet, le Ca<sup>2+</sup> induit l'assemblage des FA à l'avant de la cellule (dans le sens de la migration) en stimulant l'autophosphorylation de FAK en Y<sup>397</sup>, via l'activation de la PKCβ, tandis qu'à l'arrière, le Ca<sup>2+</sup> active la calpaïne I à l'origine du clivage de FAK et du désassemblage du point d'ancrage.

Puis, nous avons alors voulu déterminer le rôle d'Orai1 dans la migration des hPKa. Pour cela, nous avons réalisé des tests de blessure sur les hPKa en monocouches, des tests de migration en chambre de Boyden et d'imagerie cellulaire au microscope confocale grâce au marqueur fluorescent Cell Mask. Ainsi, nous avons montré que les DhPKa ne migrent plus *in vitro* et que la migration des UhPKa diminue suite à l'extinction d'Orai1 ou Stim1 par des siRNA. Or, celle-ci dépend du  $Ca^{2+}$  puisque l'utilisation du chélateur calcique BAPTA-AM inhibe aussi bien la migration constitutive des UhPKa que celle induite par l'EGF.

Ces résultats ont été par la suite validés *in vivo* en effectuant des études comparatives de l'épiderme des souris transgéniques homozygotes Orai1<sup>-/-</sup>, hétérozygotes (Orai1<sup>+/-</sup>) et homozygotes sauvages (Orai1<sup>+/+</sup>). La perte d'Orai1 entraîne effectivement un bouleversement de l'architecture de l'épiderme dans lequel l'expression des marqueurs de différenciation ne permet plus de distinguer les différentes strates de l'épiderme *in situ*. Les mêmes expériences *in vitro* ont été faites sur des cultures primaires de kératinocytes des souris et ont confirmé le rôle positif d'Orai1 dans la prolifération et la migration. En effet, les kératinocytes primaires de souris Orai1<sup>-/-</sup> prolifèrent moins vite que ceux des souris sauvages et les mêmes effets ont été observés pour la migration que ceux obtenus pour les hPKa. De même que dans les hPKa, ces effets provoqués par l'absence d'Orai1 sont sans doute liés à la diminution du SOCE dans les kératinocytes des souris Orai1<sup>-/-</sup> par rapport aux souris contrôles.

Enfin, sachant que la migration des cellules épithéliales dépend largement du recyclage des adhésions focales (FA) et particulièrement de la kinase d'adhésion focale (FAK) dont la présence au niveau des FA est sous contrôle du calcium, nous avons décortiqué la voie de transduction entre le SOCE et la régulation des FA dans la migration des UhPKa. La FAK active (phosphorylée en Y<sup>397</sup>) est également exprimée en majorité dans la couche basale de la peau humaine et l'extinction ou l'inhibition pharmacologique (FAKi14) de cette kinase bloque effectivement la migration des UhPKa tout en amplifiant la formation de larges fibres de stress avec une agrégation de FAK<sup>Y397</sup> aux points d'ancrage. L'analyse des ratios FAK<sup>Y397</sup>/FAK<sub>totale</sub> et FAK<sub>clivée</sub>/FAK<sub>totale</sub> par Western Blot reflète l'accrochage et le décrochage des FA respectivement. Nous avons montré que l'extinction de Orai1 ou Stim1, leur inhibition pharmacologique (BTP2, ML9, GSK5503A, GSK7975A) ou l'inhibition de l'influx calcique SOCE (La<sup>3+</sup>, Gd<sup>3+</sup>, BAPTA-AM) diminuent ces deux ratios. De la même manière, nous avons montré que l'autophosphorylation de FAK est stimulée par le calcium via l'activation de la PKC $\beta$ , tandis que le clivage de FAK induit par le calcium est permis par l'activation de la calpaïne I dans les UhPKa.

En conclusion, nous avons donc pu mettre en évidence le rôle d'Orai1 dans le maintien des kératinocytes à l'état basal, prolifératifs, indifférenciés et capables de migrer. Dans ce dernier cas, l'augmentation de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, suite à l'activation du SOCE par l'EGF, via le canal Orai1 participe au renouvellement des complexes d'adhésion focale puisqu'il assure, d'une part, l'induction de l'autophosphorylation de FAK sur le résidu Tyrosine<sup>397</sup> permettant son association à la paxilline et aux filaments d'actine pour former le complexe d'adhésion focale et, d'autre part, la dissociation de ce complexe due au clivage de FAK en N<sub>t</sub> par la calpaïne I, une protéase calcium dépendante (Fig.54).

# ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis

Matthieu Vandenberghe<sup>a,1</sup>, Maylis Raphaël<sup>a,1</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>a,1</sup>, Dmitri Gordienko<sup>a,2</sup>, Ryan Hastie<sup>b</sup>, Thierry Oddos<sup>c</sup>, Anjana Rao<sup>b</sup>, Patrick G. Hogan<sup>b,3</sup>, Roman Skryma<sup>a,3</sup>, and Natalia Prevarskaya<sup>a,3,4</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1003, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France; <sup>b</sup>La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA 92037; and <sup>c</sup>Pharmacology Department, Johnson and Johnson Santé Beauté France, Campus de Maigremont, 27100 Val de Reuil, France

Edited\* by Michael J. Berridge, The Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom, and approved October 25, 2013 (received for review June 4, 2013)

**To achieve and maintain skin architecture and homeostasis, keratinocytes must intricately balance growth, differentiation, and polarized motility known to be governed by calcium. Orai1 is a pore subunit of a store-operated Ca<sup>2+</sup> channel that is a major molecular counterpart for Ca<sup>2+</sup> influx in nonexcitable cells. To elucidate the physiological significance of Orai1 in skin, we studied its functions in epidermis of mice, with targeted disruption of the *orai1* gene, human skin sections, and primary keratinocytes. We demonstrate that Orai1 protein is mainly confined to the basal layer of epidermis where it plays a critical role to control keratinocyte proliferation and polarized motility. Orai1 loss of function alters keratinocyte differentiation both in vitro and in vivo. Exploring underlying mechanisms, we show that the activation of Orai1-mediated calcium entry leads to enhancing focal adhesion turnover via a PKC $\beta$ -Calpain-focal adhesion kinase pathway. Our findings provide insight into the functions of the Orai1 channel in the maintenance of skin homeostasis.**

calcium signaling | cell migration | *orai1* KO mice

The involvement of calcium-dependent mechanisms in the induction and regulation of keratinocyte proliferation, migration, and differentiation is now well established (1–3). Keratinocytes are arranged in highly organized, specialized layers according to their functions and the programmed life cycle. Proliferating keratinocytes comprise the stratum basale. Basal-cell proliferation is appreciably higher and inversely correlated with the calcium gradient in the skin, reflecting the importance of calcium signaling in differentiation (3). As a result of proliferation, keratinocytes leave the stratum basale, moving toward the exterior with the onset of differentiation in the stratum spinosum. Differentiation is completed in the stratum granulosum, thereby constituting the enucleated stratum corneum, which plays the major role as a permeability barrier (1). Besides differentiation and proliferation, the balance of which determines the epidermis physiology, the polarized motility of keratinocytes follows the same vertical pathway, suggesting its crucial importance for skin homeostasis (4).

For years, calcium has been considered as a potent inducer of keratinocyte differentiation; for this reason, calcium channels have been suggested to be indispensable in its promotion. Of them, store-operated calcium channels (SOCs) are a major mechanism of Ca<sup>2+</sup> entry in nonexcitable cells (5–7). A molecular candidate for SOC termed Orai1 has been identified and characterized (8–12). Numerous studies have demonstrated that Orai1 mediates calcium release-activated currents and SOC in a large variety of cells and is involved in a wide range of cell functions, including endothelial cell proliferation (13), lymphocyte proliferation (14), and mast cell activation (15), as well as skeletal muscle development and a contractile function (16). However, the role of Orai1 in skin physiology remains poorly understood. The phenotypic features of the homozygous *orai1*<sup>-/-</sup> mice have been recently shown as sporadic hair loss, resembling the cyclical alopecia, thinner epidermis with lower cell density, and narrower follicles (17), which indicates the important role of the Orai1 channel in skin homeostasis. Although the first findings on the role of Orai1 in differentiation and migration of isolated keratinocytes have very recently appeared (18, 19), they do not reflect the complex role of this channel in the overall

processes of skin homeostasis. In the present study, using both human primary keratinocytes and the keratinocytes obtained from *orai1*<sup>-/-</sup> mice, we found a previously undescribed role of Orai1 in epidermal physiology. Indeed, in contrast to its expected pro-differentiative role, we show that Orai1 constitutively inhibits terminal keratinocyte differentiation and is indispensable for the physiological control of proliferation and migration of basal keratinocytes. We demonstrate that Orai1 protein is mainly confined to the basal layer of the epidermis where it plays a critical role in the control of keratinocyte proliferation and polarized motility by enhancing focal adhesion turnover via the EGFR-PKC $\beta$ -Calpain-focal adhesion kinase (FAK) pathway. Orai1 loss of function decreases keratinocyte proliferation and inhibits directional migration, thereby accelerating the expression of differentiation-regulating genes. Finally, Orai1 loss of function alters the skin homeostasis in an in vivo mice model, confirming our findings obtained on primary keratinocytes.

## Results

**Orai1 Protein Is Mostly Expressed in Stratum Basale and Diminishes During Differentiation.** Firstly, we have studied the expression of Orai1 protein in human skin sections (Fig. 1). Immunohistochemical studies showed that the Orai1 protein is mostly expressed in the stratum basale of human epidermis, with a slight presence in upper layers of the skin (Fig. 1A). The same tendency was observed for the STIM1 protein, which was also

## Significance

The epidermis of the skin is composed of keratinocytes that are organized in several layers. Basal cells divide and produce cells moving outwards the epidermis while undergoing the process of terminal differentiation, crucial for the barrier function of the skin. Calcium is an indispensable ion for differentiation, and calcium channels are of primary importance. Unexpectedly, we discovered that the Orai1 calcium channel is mainly expressed in the basal layer, functioning to negatively control differentiation. The Orai1 channel supplies calcium to sustain proliferation and, in particular, to drive migration of keratinocytes, both processes being the feature of basal keratinocytes.

Author contributions: V.L. and N.P. designed research; M.V., M.R., V.L., D.G., and R.H. performed research; M.R., R.H., T.O., A.R., and P.G.H. contributed new reagents/analytic tools; M.V., M.R., V.L., T.O., A.R., P.G.H., R.S., and N.P. analyzed data; and V.L., P.G.H., R.S., and N.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

\*This Direct Submission article had a prearranged editor.

Freely available online through the PNAS open access option.

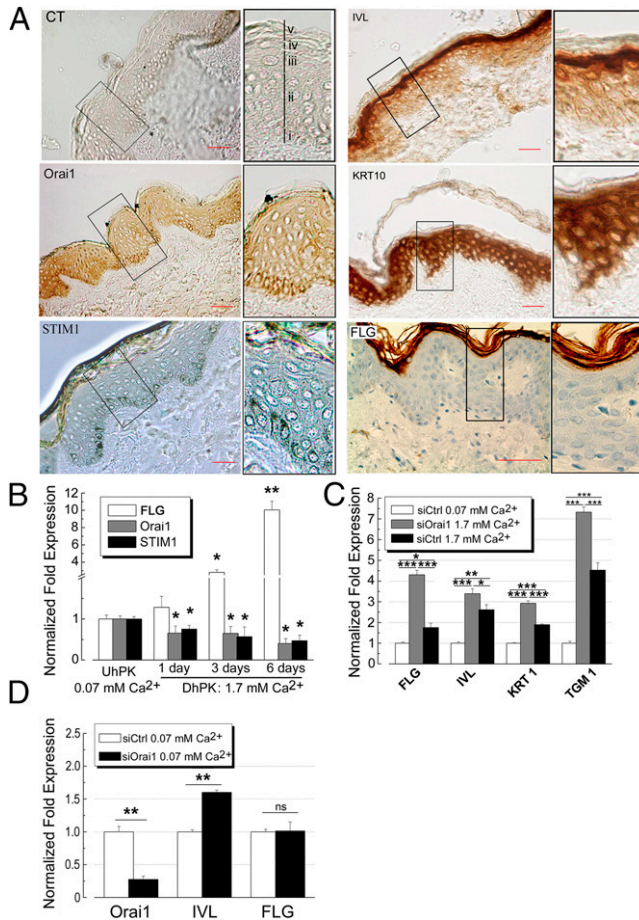
<sup>1</sup>M.V., M.R., and V.L. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>Second address: Laboratory of Molecular Pharmacology and Biophysics of Cell Signalling, State Key Laboratory of Molecular and Cell Biology, O. O. Bogomoletz Institute of Physiology, Kiev 01024, Ukraine.

<sup>3</sup>P.G.H., R.S., and N.P. contributed equally to this work.

<sup>4</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1310394110/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1310394110/-DCSupplemental).



**Fig. 1.** Orai1 expression in human skin and its role in keratinocytes differentiation. (A) Immunohistochemical studies for the expression of Orai1, STIM1, IVL, KRT10, and FLG in human skin sections. *Top Left* shows the respective control for our stainings using secondary antibody only. *Insets (Right)* show enlarged images of the boxed regions. Different layers (*Inset, Top Left*) in epidermis are: (i) stratum basale; (ii) stratum spinosum; (iii) stratum granulosum; (iv) stratum lucidum; (v) stratum corneum. (Scale bars: 50  $\mu$ m.) (B) Real-time quantitative PCR from three independent experiments showing the expression levels of Orai1, STIM1, and FLG in hPK kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup> (UhPK), or hPK cells treated with 1.7 mM Ca<sup>2+</sup> during 1, 3, or 6 d (DhPK). Data were normalized compared with HPRT gene expression. Data represented are mean  $\pm$  SEM; \**P* < 0.05; \*\*\**P* < 0.01, *n* = 3. (C) The effects of Orai1 knockdown on the expression of FLG, IVL, KRT1, and TGM1 transcripts induced by calcium switch (1.7 mM Ca<sup>2+</sup>, 24 h). Data were normalized compared with HPRT gene expression. Data represented are mean  $\pm$  SEM; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01; \*\*\**P* < 0.001; *n* = 3. (D) The expression of IVL and FLG in hPK kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup> induced by Orai1 knockdown for 24 h. Data were normalized compared with HPRT gene expression. Data represented are mean  $\pm$  SEM; \*\**P* < 0.01; *n* = 3.

predominantly expressed in basal layers. In contrast to these proteins, the staining of early differentiation markers like involucrin (IVL) and cytokeratin 10 (KRT10) showed patterns of expression with an increasing gradient toward upper layers such as the stratum spinosum, granulosum. The late differentiation marker filaggrin (FLG) is mainly expressed in the most superficial layer of the epidermis: the stratum corneum (Fig. 1A). The distribution of STIM1 was found to mirror that of Orai1 and is mostly confined to the basal layer of skin although, according to immunohistochemical data, the expression of both is still conserved in the upper layers of epidermis. Although several but various differentiation markers are shown in each experiment, the expression of all of the differentiation markers, such as early

(e.g., IVL, KRT1 and -10), intermediate (e.g., TGM1), and late (e.g., Filaggrin, Loricrin), was studied.

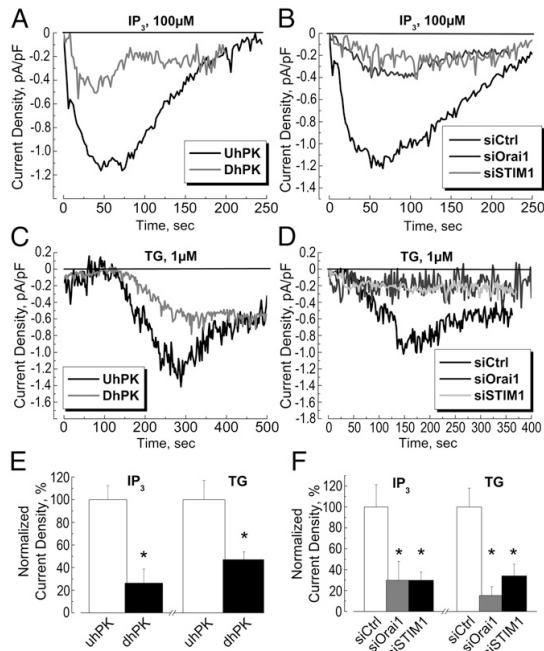
To confirm the immunohistochemical studies, we have studied the expression of Orai1, STIM1, and the late differentiation marker FLG in human primary keratinocytes (hPKs) using real-time quantitative PCR (Fig. 1B). Quantification of the mRNA transcripts from three independent experiments showing the expression levels of Orai1, STIM1, and FLG in hPK kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup> [undifferentiated hPK (UhPK)] or hPK cells treated with 1.7 mM Ca<sup>2+</sup> during 1, 3, or 6 d [differentiated hPK (DhPK)] is indicated in Fig. 1B. The expression data for Orai1, STIM1, and FLG confirmed those of immunohistochemical studies indicating the down-regulation of these proteins during the differentiation process in contrast to the FLG, whose expression increases during differentiation.

To study the role of Orai1 in calcium-induced differentiation of hPK, we used a so-called Ca<sup>2+</sup>-switch protocol. The aim was to see whether the knockdown of Orai1 protein may influence the onset of keratinocyte differentiation. Thus, the cells are pre-transfected with the Orai1-specific siRNA tested preliminarily as shown in Fig. S1A. After 24 h, 1.7 mM Ca<sup>2+</sup> is added to UhPK to trigger differentiation for an additional 24 h. The control hPK cells kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup> and control hPK cells with the induced Ca<sup>2+</sup> switch were transfected with siCtrl. The pretransfection of hPK cells with siOrai1 significantly induced the expression of differentiation markers such as cytokeratin 1 (KRT1), IVL, keratinocyte transglutaminase (TGM1), and even FLG, which was superior to the extent of Ca<sup>2+</sup> switch itself (Fig. 1C). These data strongly indicate the important role of Orai1 in the process of keratinocyte differentiation.

Because the previous experiment suggested the probable negative role of Orai1 in differentiation, we decided to see whether the knockdown of Orai1 protein in the low Ca<sup>2+</sup> solution (undifferentiated, UhPK) is able to trigger differentiation per se (Fig. 1D). The pretransfection of UhPK cells with siOrai1 in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup> for 24 h has slightly but significantly increased the expression of early differentiation marker IVL whereas the expression of late differentiation marker FLG remained unchanged, confirming the crucial role of calcium (superior to 0.07 mM, entering via other channels) in differentiation processes. These data suggest that a decrease in Ca<sup>2+</sup> entry through the Orai1 channels contributes to the onset and/or progression of differentiation.

**Orai1 Is the Main Component of the Store-Operated Current in Human Keratinocytes.** The entry of calcium through the plasma membrane into the cytoplasm [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in response to the decrease in calcium content of the endoplasmic reticulum [Ca<sup>2+</sup>]<sub>ER</sub> was studied (Fig. 2). Depletion of endoplasmic reticulum (ER) stores via activation of IP<sub>3</sub> receptors or by inhibition of the ER SERCA pump with thapsigargin (TG) induced a significant store-operated calcium entry (SOCE) in undifferentiated hPK (UhPK) compared with differentiated (DhPK) cells (Fig. 2A and C, respectively). The normalized quantification of this current is given in Fig. 2E. This entry, induced either by IP<sub>3</sub> or TG, was successfully blocked by inhibition of the Orai1 channel and STIM1 protein using the transfection of UhPK with the respective siRNAs against these proteins (Fig. 2B and D). The quantification histogram of this SOCE inhibition is shown in Fig. 2F. We can conclude that the Orai1 channel and STIM1 proteins are the main components of store-operated calcium current in human keratinocytes and that this SOCE is significantly down-regulated following differentiation of hPK.

**Orai1 Channel Is Involved in Proliferation and Migration of Undifferentiated hPK.** Having discovered the expression and the role of the Orai1 channel in SOCE of UhPK corresponding to undifferentiated keratinocytes, we have sought to study its role in cell proliferation and migration, the characteristic features of keratinocytes derived from stratum basale. The indirect colorimetric cell viability assay (MTS) showed a strong inhibition of



**Fig. 2.** Store-operated current in human primary keratinocytes. (A and C) Representative time courses of  $I_{SOE}$  development (current density, measured at  $-100$  mV holding potential) in UHPK cells (black traces, kept in  $0.07$  mM  $Ca^{2+}$ ) and DhPK cells (gray traces, kept in  $1.7$  mM  $Ca^{2+}$ ) in response to the dialysis of  $100$   $\mu$ M  $IP_3$  (A) or  $1$   $\mu$ M TG (C). (B and D) Representative time courses of  $I_{SOE}$  development (current density, measured at  $-100$  mV holding potential) in UHPK cells (kept in  $0.07$  mM  $Ca^{2+}$ ) pretreated with siRNA against Orai1 (gray traces), STIM1 (light gray traces), compared with siCtrl (black traces) in response to the dialysis of  $100$   $\mu$ M  $IP_3$  (B) or  $1$   $\mu$ M TG (D). In the case of TG-induced SOCE (C and D), the presence of  $10$  mM BAPTA in the pipette may partially account for the SOCE development. (E) Quantification of the maximum amplitude of  $IP_3$ - and TG-induced  $I_{SOE}$  densities in UHPK cells (white column, kept in  $0.07$  mM  $Ca^{2+}$ ) and DhPK cells (black column, kept in  $1.7$  mM  $Ca^{2+}$ ). Data shown are normalized. Mean  $\pm$  SEM;  $*P < 0.05$ ;  $n = 32$  for each condition. (F) Quantification of the maximum amplitude of  $IP_3$ - and TG-induced  $I_{SOE}$  densities in UHPK cells (kept in  $0.07$  mM  $Ca^{2+}$ ) pretreated with siRNA against Orai1 (gray columns), STIM1 (black columns), compared with siCtrl (white columns). Data shown are mean  $\pm$  SEM;  $*P < 0.05$ ;  $n = 34$  for each condition.

undifferentiated hPK (UHPK) proliferation by the extinction of both Orai1 and STIM1 proteins (Fig. 3A). These data were confirmed by the direct cell counting following 48 h of cell transfections with siRNA against Orai1 and STIM1 (Fig. 3B).

Further, the issue of cell migration was addressed. We have used two methods: wound healing and Transwell assays. The down-regulation of Orai1 protein by siRNA has decreased UHPK cell ability to migrate and to "heal the wound" (Fig. 3C, Upper). In the other series of experiments, we inhibited FAK with  $10$   $\mu$ M FAKi 14 inhibitor for the indicated period (Fig. 3C, Lower). This inhibition arrested the cell migration. To determine whether the intracellular calcium ( $[Ca^{2+}]_i$ ) may have a role, we blocked the  $[Ca^{2+}]_i$  with the cell-permeable  $Ca^{2+}$ -chelator BAPTA-AM ( $50$   $\mu$ M). The effect of chelating  $[Ca^{2+}]_i$  was also prominent and arrested hPK cell migration in the time scale of 3 d (Fig. 3C, Lower). Thus, Orai1, as well as  $[Ca^{2+}]_i$ , is extremely important for hPK cell migration.

The use of a Transwell assay enabled us to distinguish proliferating and migrating cells. This assay showed a significant inhibition of UHPK migration to the lower chamber of the Transwell

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

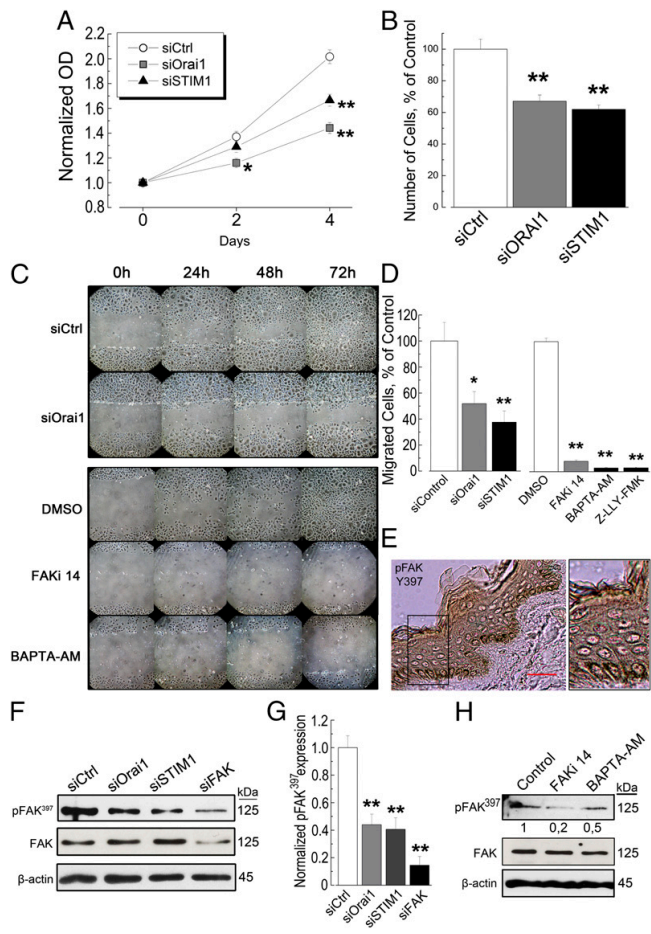
We have further studied the expression of FAK in human skin sections and the level of FAK autophosphorylation. The expression of FAK, especially its tyrosin-397 autophosphorylated form (pFAK<sup>397</sup>), crucial for its activation and involvement in focal adhesion turnover, was predominantly located in the basal layer as for Orai1 and STIM1 (Fig. 3E). The independent knock-downs of both Orai1 and STIM1 significantly diminished the quantity of autophosphorylated FAK<sup>397</sup> protein, compared with the total FAK protein (Fig. 3F). The efficiency of transfection, as well as the quantification of blots, is shown in Fig. 3G. The other channels, such as TRPC1 and TRPV6, were also studied and did not show any significant decrease in FAK<sup>397</sup> protein (Fig. S1B). Further, we have checked whether the inhibition of FAK autophosphorylation could have a role by inhibiting FAK with its inhibitor,  $10$   $\mu$ M FAKi 14 or by sequestering  $[Ca^{2+}]_i$  with the cell-permeable chelator BAPTA-AM. The level of pFAK<sup>397</sup> protein was significantly attenuated by these agents (Fig. 3H), both of which decreased the quantity of pFAK<sup>397</sup> protein whereas the total FAK was unchanged (see quantifications in Fig. S1C). Therefore, STIM1/Orai1-mediated  $Ca^{2+}$  influx is an important controller of FAK autophosphorylation and focal adhesion turnover.

Finally, because the inhibitor of calpain, Z-LLY-FMK, successfully blocked keratinocyte migration, we have studied the role of Orai1 and STIM1 proteins in calpain activity using the fluorometric calpain activity assay kit from Merck Chemicals Ltd. The activity of endogenous calpains was decreased upon Orai1 and STIM1 knockdowns (Fig. 4C), suggesting the possible activation of calcium-dependent calpain proteases downstream of the Orai1 channel.

#### Orai1 and STIM1 Regulate Focal Adhesion Turnover and Undifferentiated hPK Polarized Motility.

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

Because the focal adhesion turnover is necessary for keratinocyte migration, we have studied the role of Orai1 and STIM1 in polarized motility of undifferentiated hPK (Fig. 5). In control experiments using confocal microscopy and hPK staining with CellMask, we have shown that differentiated hPK lack polarized motility and cell migration in general (Movies S1 and S2). These effects were mimicked by the use of the FAK inhibitor in UHPK (Fig. 5A and Movie S3). The successful knockdown of Orai1 (Movie S4), STIM1 (Movie S5), and FAK (Movie S6) proteins in UHPK completely arrested cell migration of UHPK, implying the important role of these proteins in polarized motility of human keratinocytes (Fig. 5B).



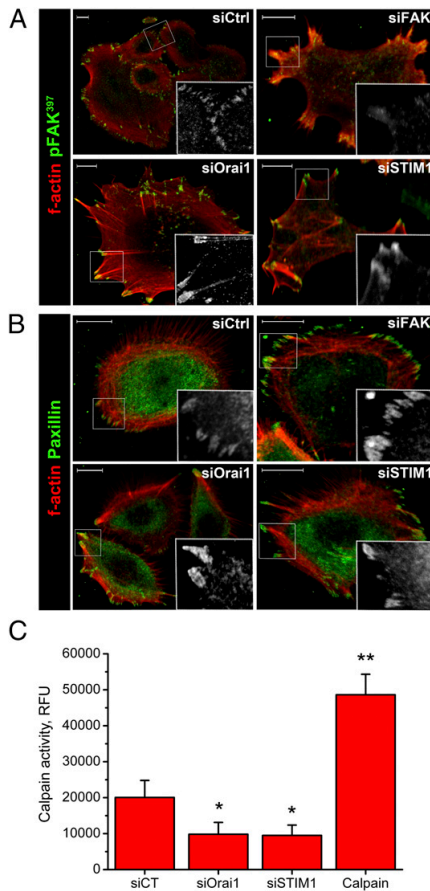
**Fig. 3.** The role of Orai1 and STIM1 in proliferation and migration of human keratinocytes. (A) A time course of UHPK cell (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>) growth revealed by indirect colorimetric MTS assay reflecting the number of viable cells. Cells were transfected with siRNA against Orai1 (gray squares), STIM1 (black triangles), compared with siCtrl (white circles). Data represented are mean ± SEM; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01, *n* = 3. (B) Relative cell number of UHPK (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>) cells after 48 h of transfection with siRNA against Orai1 (gray column), STIM1 (black column), compared with siCtrl (white column). Data represented are mean ± SEM; \*\**P* < 0.01, *n* = 3. (C) A representative experiment of three independent experiments of wound-healing assay of UHPK (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>) cells transfected for 24 h with siRNA against Orai1 versus siCtrl (Upper), and UHPK cells treated with DMSO, 10 μM FAKi 14, and 50 μM BAPTA-AM for the indicated period (Lower). Pictures were taken every 24 h during 3 d. (D) Cell migration assay using Transwell chambers of UHPK (kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>) cells transfected with 60 nM of siRNA against Orai1, STIM1 versus siCtrl as well as FAKi 14, BAPTA-AM, and Z-LLY-FMK (10 μM) versus DMSO. Cells were allowed to migrate for 24 h from the time of transfection. Data shown are mean ± SEM; \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01, *n* = 3 done in quadruplicate. (E) The immunostaining of phosphorylated FAK<sup>397</sup> protein in human skin sections. The small black box corresponds to the magnified skin area. (Scale bar: 50 μm.) (F) A representative immunoblotting showing the level of autophosphorylation of FAK<sup>397</sup> compared with overall FAK in UHPK cells treated with 60 nM siRNA against siOrai1 and siSTIM1 for 24 h. siFAK has been used as a positive control. (G) A quantification histogram of FAK<sup>397</sup> autophosphorylation in UHPK cells (of a representative immunoblotting shown in F). Data represented are mean ± SEM; \*\**P* < 0.01, *n* = 3. (H) The autophosphorylation of FAK<sup>397</sup> in UHPK cells treated with FAKi 14 and BAPTA-AM; DMSO was used as a control.

**The Role of the EGF-Dependent Pathway and SOCE in Keratinocyte Polarized Motility.** To have an insight into the possible mechanisms leading to migration/polarized motility via the Orai1 channel, we have investigated the possible role of endothelial growth factor (EGF) signaling in activation of hPK cell migration. Our data show that EGF stimulates the migration in the wound-healing assay whereas siOrai1 pretreatment of cells inhibits these effects (Fig. 6A). The same protocol has been performed in Transwell assays, and the same data have been obtained (Fig. 6B), suggesting the pivotal role of EGF in keratinocyte migration and the important contribution of Orai1 channels in this pathway. To prove the role of Orai1 channels and SOCE in this signaling, a panel of pharmacological inhibitors was used in the study. The migration studies using Transwell assays have been performed using the pharmacological inhibitors against calpain I (iCalpI, 10 nM), calpain II (iCalpII, 1 μM), Orai1 (BTP2, 1 μM), STIM1 (ML9, 10 μM), and PKCβ (iPKCβ, 100 nM). All of them, except for the inhibitor of calpain II protease, diminished the rate of keratinocyte migration (Fig. 6C). Moreover, the other inhibitors of SOCE, such as 2-APB, La<sup>3+</sup>, and Gd<sup>3+</sup>, and the very recently appeared inhibitors of Orai1 selectivity filter, GSK-7975A and GSK-5503A (20), were used and showed the significant decrease in hPK cell migration (Fig. 6D). Further, because the autophosphorylation of FAK at the tyrosine 397 residue is crucial for its activation and involvement in focal adhesion turnover, we

further studied the effects of pharmacological inhibition of PKC and SOCE pathway on FAK<sup>397</sup> autophosphorylation. Indeed, the inhibition of Orai1 (BTP2, 1 μM), calcium-dependent PKC (Gö6976, 1 μM), and PLC (U73122, 1 μM) decreased the level of FAK<sup>397</sup> autophosphorylation induced by EGF (Fig. 6D). As for the migration, the other inhibitors of SOCE, such as 2-APB, La<sup>3+</sup>, and the very recently appeared inhibitors of Orai1 selectivity filter, GSK-7975A and GSK-5503A, were tested and showed a decrease in pFAK<sup>397</sup> level (Fig. 6E). EGF also induced the cleavage of FAK, yielding an 80-kDa fragment, the result of FAK degradation by proteases such as calpain and therefore enhanced its turnover (Fig. 6E). The effects of pharmacological inhibition of FAK degradation under the inhibition of Orai1 (BTP2, 1 μM), STIM1 (ML9, 10 μM), two PKC inhibitors (iPKCβ, 0.1 μM and Gö6976, 1 μM), and PLCγ (U73122, 1 μM) are shown in Fig. 6E. Moreover, the quantity of 80-kDa fragment of the cleaved FAK was diminished following both siOrai1 and siSTIM1 treatments, but not those of siTRPC1 and siTRPV6 (Fig. 6B). The expression of EGFR and paxillin was also monitored as a control that the observed effects are solely due to the intracellular messengers downstream to the EGFR, and the number of structural proteins such as paxillin does not change during the treatments (Fig. 6F).

Finally, EGF by itself was capable of inducing SOCE, and this SOCE induced by EGF was successfully inhibited by siRNA against Orai1, suggesting the direct role of this channel in EGF-





**Fig. 4.** Involvement of Orai1 and STIM1 in focal adhesion turnover. Immunostaining of F-actin (red) and pFAK (green, *A*) or paxillin (green, *B*) of UHPK cells (kept in 0.07 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ). UHPK cells were transfected with siOrai1, siSTIM1, siFAK, and siCtrl for 24 h before fixation. Small white boxes correspond to the magnified area of the image where pFAK (*A*) or paxillin (*B*) are shown in gray scale. (Scale bars: 10  $\mu\text{m}$ .) (*C*) Calpain activity in UHPK cells treated with 60 nM siRNA against siOrai1 and siSTIM1 for 24 h. Cell lysates were obtained and assayed according to the fluorometric calpain activity kit (Merck Chemicals Ltd.) and compared with a provided positive control (Calpain).

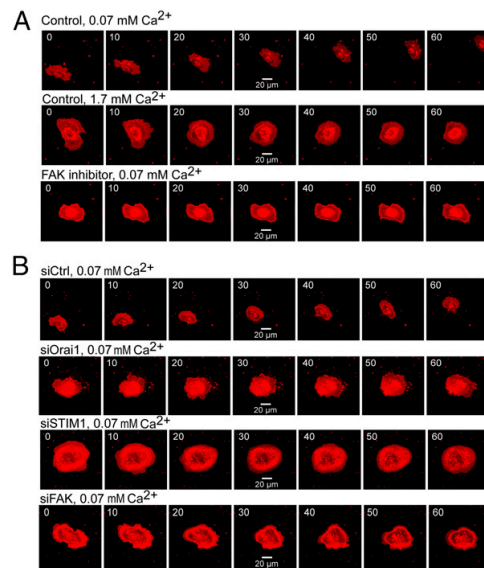
induced SOCE (Fig. 6*F*). Further, the PLC inhibitor U73122 (10  $\mu\text{M}$ , 30 min) completely inhibited ER  $\text{Ca}^{2+}$  release induced by EGF (Fig. 6*G*). In an additional series of experiments, we inhibited the expression of FAK with its respective siRNA, and we observed no difference in SOC current, suggesting that FAK signaling is definitely downstream of Orai1 signaling (Fig. S1*G*).

**Keratinocyte Physiology and Epidermis Barrier Are Impaired in *orai1*<sup>-/-</sup> Mice.** To confirm the importance of our findings obtained *in vitro*, we exploited the recently created *orai1*<sup>-/-</sup> mouse model (17). SOCE induced by 1  $\mu\text{M}$  TG is smaller in keratinocytes from *orai1*<sup>-/-</sup> mice than in control ones from *orai1*<sup>+/+</sup> or *orai1*<sup>+/-</sup> (Fig. 7*A*). The proliferation rate is remarkably affected (Fig. 7*B* and *C*). The ability of keratinocytes to migrate was assessed using the Transwell assay and showed a significant decrease in the number of migrating cells obtained from *orai1*<sup>-/-</sup> mice compared with

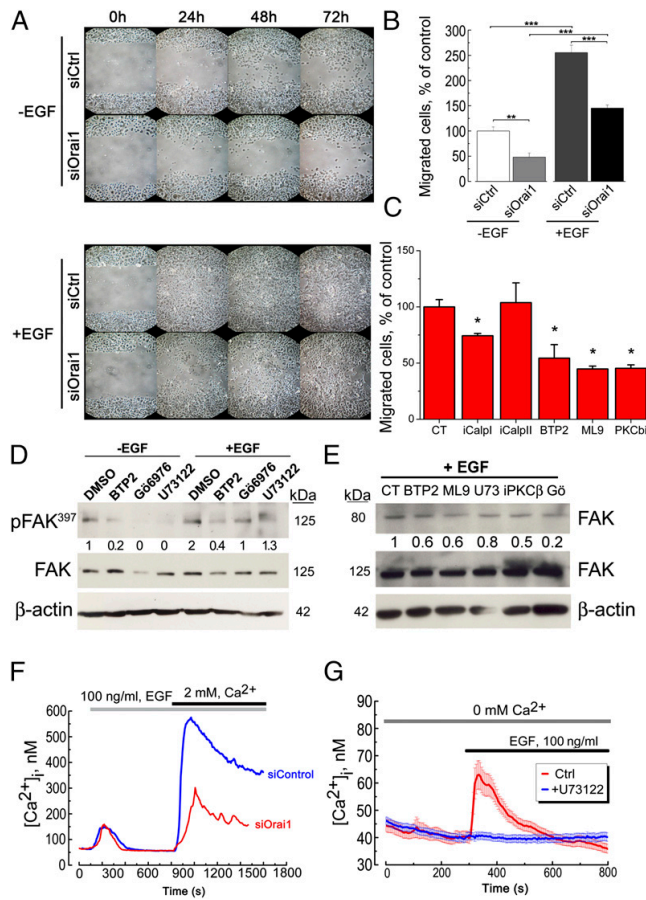
control ones from *orai1*<sup>+/+</sup> mice irrespective of whether EGF was used or not (Fig. 7*D*). We have also studied the epidermis in *orai1*<sup>-/-</sup> mice compared with *orai1*<sup>+/+</sup> mice, using immunostaining procedures and confocal microscopy (Fig. 7*E*). Immunostaining using anti-KRT5, KRT10, and loricrin (LOR) in *orai1*<sup>-/-</sup> mice showed the impaired expression of differentiation markers such that the marker of basal cell KRT5, the marker of early differentiation KRT10, and the late differentiation LOR, are equally expressed in all layers (Fig. 7*E*). Conversely, the epidermis of *orai1*<sup>+/+</sup> mice had the well-distinguished classical expression of KRT5 in basal and suprabasal layer, the increasing expression of KRT10 above the suprabasal layer, and the expression of LOR in the terminal cornified layer. We also observed the disintegration and detaching of the stratum corneum layer in *orai1*<sup>-/-</sup> mice, with a significant decrease in both skin and epidermis thickness.

## Discussion

In the current study, we report several major findings: (*i*) we have identified in human epidermis an Orai1 protein whose expression is predominantly confined to the basal layer of epidermis; (*ii*) the Orai1 channel is a principal source of endogenous SOCE in human keratinocytes; (*iii*) Orai1 is involved in proliferation and migration, and keratinocyte differentiation is under the negative control of the Orai1 channel; and (*iv*) the Orai1 channel mediates polarized motility in keratinocytes both basal and induced by EGF by supplying calcium via SOCE used to (*i*) activate PKC $\beta$ , which enhances focal adhesion contact formation via stimulation of pFAK<sup>397</sup> autophosphorylation and association of pFAK<sup>397</sup> and paxillin with actin filaments, and (*ii*) activate a calcium-dependent protease calpain participating in FAK degradation and therefore accelerating FAK turnover, both of them promoting polarized cell migration. Finally, the keratinocytes from Orai1 KO mice exhibit remarkably decreased migration,



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



**Fig. 6.** Calcium influx via Orai1 activates FAK and triggers migration. (A) A representative experiment of three independent experiments of a wound-healing assay of UHPK (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) cells treated with 100 ng/mL EGF (+EGF) for the indicated time or without EGF (–EGF), and transfected with either siOrai1 or siCtrl. (B) Cell-migration assay using Transwell chambers of UHPK (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) treated with 100 ng/mL EGF (+EGF) or without EGF (–EGF), and transfected with either siOrai1 or siCtrl. Cells were allowed to migrate for 24 h. Data shown are mean  $\pm$  SEM; \*\* $P$  < 0.01, \*\*\* $P$  < 0.001;  $n$  = 3 in quadruplicate. (C) Cell-migration assay using Transwell chambers of UHPK (kept in 0.07 mM  $Ca^{2+}$ ) treated with DMSO (CT), 10 nM iCalpl, 1  $\mu$ M iCalplII, 1  $\mu$ M BTP2, 10  $\mu$ M ML9, and 100 nM iPKC $\beta$ . Data shown are mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05. (D) FAK<sup>397</sup> autophosphorylation studies using UHPK cells treated with 100 ng/mL EGF (+EGF) for 30 min or without EGF (–EGF), and pretreated with 1  $\mu$ M BTP2, 1  $\mu$ M G66976, 1  $\mu$ M U73122 for 45 min. Numbers below correspond to the relative quantity of FAK<sup>397</sup> compared with the total FAK, and the loading control  $\beta$ -actin. (E) The effects of pharmacological inhibition of Orai1 (BTP2, 1  $\mu$ M), STIM1 (ML9, 10  $\mu$ M), PLC $\gamma$  (U73122, 1  $\mu$ M), and two PKC inhibitors (iPKC $\beta$ , 0.1  $\mu$ M and G66976, 1  $\mu$ M) on FAK cleavage under the EGF stimulation (+EGF) yielding the expected cleaved form of FAK at around 80 kDa. Numbers below correspond to the relative quantity of the cleaved FAK (80 kDa) compared with the FAK full-length (125 kDa), and the loading control  $\beta$ -actin. (F) Store-operated calcium entry in UHPK cells induced by 100 ng/mL EGF and its inhibition by siOrai1. A representative experiment of five independent experiments,  $n$  = 30 cells per experiment. (G) Store-operated calcium entry in UHPK cells induced by 100 ng/mL EGF and its inhibition by PLC inhibitor U73122, 1  $\mu$ M.

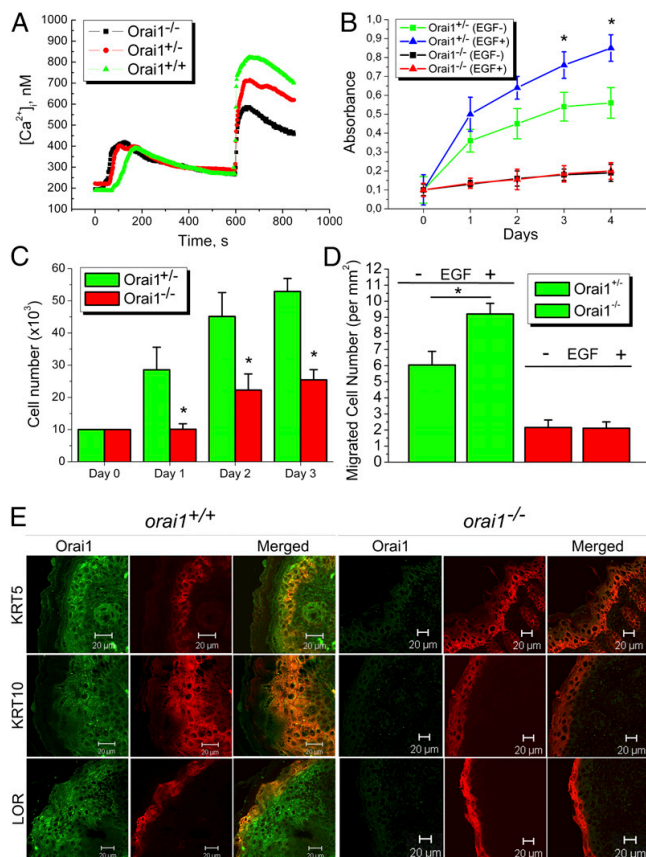
proliferation, and impaired differentiation, yielding impaired epidermis formation.

In the present study, we have shown that Orai1 is one of the most important pore-forming entities in the plasma membrane and, together with STIM1 as a signal transducer from the ER, represents the major molecular component of SOCE in human primary keratinocytes: siRNA-mediated knockout of any of them strongly diminishes  $I_{SOCE}$  in keratinocytes. The translocation of STIM1 to the keratinocyte plasma membrane following agonist stimulation was shown for HaCaT cells (21); however, the molecular mechanisms and the role of Orai1/STIM1 coupling remained obscure. Although the role of Orai1/STIM1-mediated SOCE in the HaCaT keratinocyte cell line has recently been described (18), it does not address the physiological role of this channel in skin. In fact, the HaCaT cell line is an artificial cell line of spontaneously immortalized keratinocytes (22). This aneuploid cell line has a transformed phenotype *in vitro* and altered and unlimited growth potential, conserving through its ability to differentiate. This cell line was initially used during the 1990s by many teams around the world in signal-transduction studies; however, later, the phenotype and the physiology of these cells were shown to be different to human primary keratinocytes and therefore were considered not suitable for studies in skin physiology (22–27). Moreover, the data of Numaga-Tomita and Putney (18) on calcium switch-induced differentiation involve the expression of only one marker of differentiation, KRT1, which

cannot reflect differentiation per se, especially bearing in mind that the expression of this protein is  $Ca^{2+}$ -dependent (28).

Because in our experiments Orai1 expression was found to decrease in differentiated cells following calcium switch, we hypothesized that down-regulation of  $I_{SOCE}$ , which accompanies the transition to the differentiated state, is associated with the reduction of Orai1 levels. And indeed, our results allow us to conclude that the transition to the differentiated hPK phenotype is associated with the loss/decrease of Orai1 expression and is under its negative control.

The principal question concerns the differential role of two calcium entries in keratinocytes: SOCE and massive constitutive entry. A number of calcium-permeable channels have been shown to be expressed in hPK (29) especially those belonging to the Transient Receptor Potential (TRP) family. From this TRPC family, TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5, and TRPC6 were shown to be expressed and functional in hPK, and all of them were shown to be involved in SOCE (27, 29–31). Interestingly, although the short-term transient increase in  $[Ca^{2+}]_i$  is mostly attributed to be proliferative, for two of them, TRPC1 and TRPC4, which were shown to be SOCs, a role in SOCE and keratinocyte differentiation was shown (27, 29, 32, 33). Among all of them, a member of the vanilloid family of TRP channels, TRPV6, has been shown to be expressed and to positively correlate with the calcium gradient (a stepwise increase in both intra- and extracellular calcium from stratum basale to stratum corneum) (34–36)



**Fig. 7.** Keratinocyte physiology in Orai1 KO mice. (A) Capacitative calcium entry induced by 1  $\mu$ M TG in keratinocytes from *orai1*<sup>+/+</sup>, *orai1*<sup>+/-</sup>, and *orai1*<sup>-/-</sup> mice. (B) Proliferation of keratinocytes from *orai1*<sup>+/-</sup> and *orai1*<sup>-/-</sup> mice treated with 100 ng/mL EGF (EGF+) or vehicle (EGF-), measured using either WTS assay (C) or direct cell counting (D). Cell migration assay using Transwell chambers from *orai1*<sup>+/-</sup> and *orai1*<sup>-/-</sup> mice treated with EGF (EGF+) or vehicle (EGF-). (E) Skin epidermis from *orai1*<sup>+/+</sup> and *orai1*<sup>-/-</sup> mice stained with anti-Orai1, anti-KRT5, anti-KRT10, and anti-LOR antibodies.

and differentiation in the skin, providing a massive calcium entry into keratinocytes that is necessary to induce differentiation (37, 38). The Orai1 channel and Orai1-mediated SOCE are likely to control the onset of differentiation. Indeed, the existence of lipid rafts/caveolae as microdomains and initiation of calcium signaling therefrom are well-known (39, 40). The formation of STIM1–Orai1 complexes in those rafts was already demonstrated for SOCE (41). Although the disruption of lipid rafts resulted in an increase of the proliferative capacity of human keratinocytes, their reintegration led to the expression of the late differentiation marker, KRT2 (42). It remains intriguing just how these two types of entries may coexist and whether they are interrelated because the decrease in SOCE and Orai1 expression is accompanied by the increase in constitutive calcium entry and TRPV6 expression following the gradient of calcium and differentiation (37).

We have demonstrated the important role of the Orai1 channel in UHPK proliferation. A role of the Orai1 channel and SOCE in cell proliferation has been suggested for endothelial cells (13), lymphocytes (14), airway smooth muscle (43), and others. The increase in Orai1 and STIM1 expression, and therefore SOCE in general is a prerequisite to stimulate proliferation because the use of SOC inhibitors like SKF-96365, NiCl<sub>2</sub>, or BTP2 abrogated the observed effects, as well as the selective knockdown of Orai1 and STIM1 (43). The increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> induced by SOCE was shown to activate the proliferation-associated calcineurin-transcription factor NFAT pathway (14, 44). Further studies will be needed to correlate the molecular mechanisms of Orai1-promoted proliferation and the calcium gradient in the skin.

In normal epidermis, keratinocytes migrate upward from the basal layer as they undergo terminal differentiation, yet they also have the capacity for lateral movement during wound healing. It was shown that keratinocytes in low-calcium medium were laterally more motile than keratinocytes in normal medium (45). During calcium-induced stratification, hPK cells moved upward from the basal layer by gliding over their neighbors and forming contacts with other suprabasal cells (3). Of central importance, mostly for keratinocytes, is the ability to balance proliferation and differentiation, control adhesion to an underlying substratum, and, when necessary, remodel this substratum and migrate in a directed fashion. These functions are particularly central to the mitotically active epidermal cell hPK, which must continually undergo proliferation, detachment, and differentiation in the course of homeostasis, and upon injury, proliferate and migrate toward and repair the wound.

We have demonstrated the involvement of Orai1 channels in keratinocyte polarized motility and migration. Indeed, the coordinated and dynamic regulation of adhesions is central for cell migration in both normal and pathological processes (46). Cell migration is initiated by forming protrusions, which are stabilized by integrin-mediated adhesions that establish structural and signaling linkages between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. A prominent component involved in this regulation is FAK (47). FAK promotes cell migration by its capacity to orchestrate signals between integrin and growth factor receptors (47). Downstream of integrin or growth factor stimulation, FAK is phosphorylated at Tyr-397, which is an important binding site

for Src family kinases (48). There are numerous reports that the control of FAK phosphorylation and cell morphology is a key factor involved in the formation of focal contacts that regulate cell attachment and detachment required for cell migration (49). Previous studies have demonstrated a critical role for FAK as a regulator of adhesion dynamics (50, 51), as well as SOCE in the control of NFAT translocation to regulate cell migration (19). In the present work, we have shown that the depletion of the ER by the EGF-triggered pathway, followed by the activation of Orail channels and consequently SOCE, may lead to autophosphorylation of FAK at Tyr-397, thus stimulating keratinocyte migration. Nevertheless, the mechanisms by which FAK regulates the assembly–disassembly of focal adhesions remain to be elucidated.

EGF is an important growth factor that elicits cellular signaling through an EGF receptor and affects cell migration in many cell types (52). When EGF binds to EGFR, the receptor dimerizes and is autophosphorylated, which subsequently leads to the downstream activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and phospholipase C pathways (53, 54). It has also been shown that EGFR signaling acts through the TRPV3 channel regulating keratinocyte cornification (55). In our studies, we used EGF as a natural regulator for the processes studied, and we have shown that EGF signaling in keratinocytes involves SOCE mediated by Orail channels.

Some reports demonstrated that phosphorylation of FAK was increased in EGF-stimulated cell spreading and migration (56). Others have shown that EGFR-mediated signaling induced the dephosphorylation of FAK during cell motility (57). Thus, most investigators have examined either FAK phosphorylation or dephosphorylation stimulated by EGFR-mediated signaling during cell migration and wound healing. It was reported that EGFR-induced signaling pathways are necessary for cell migration (58). Thus, EGF is involved antagonistically in both FAK phosphorylation and dephosphorylation with different mechanisms in a cell (59), and there is still a limited understanding of the mechanism linking a cell attachment–detachment process and EGF stimulation.

On the other hand, evidence has emerged supporting the role of the calpain family of intracellular calcium-dependent proteases in regulating cell migration (60, 61). Calpains have been proposed to regulate migration, at least in part through their ability to modulate the dynamics of adhesions (62). Numerous calpain targets have been identified, some of which are proteins that are present in focal adhesions, including talin, paxillin, and FAK (63). It has been proposed that calpain cleavage may play a role in terminating FAK signaling by attenuating its kinase activity (64). It seems likely that different signaling pathways may be activated by the same ligand such as EGF because it has been shown that, in undifferentiated keratinocytes, IFN-inducible protein-9 activates  $\mu$ -calpain downstream of a PLC- $\beta$ -mediated calcium flux whereas EGF uses the same ERK to M-calpain cascade that it triggers to converge at the disassembly of adhesion plaques (65). In our studies, we have confirmed that the selective inhibition of calpain, most probably calpain I, arrests UhPK migration, suggesting the crucial role of this pathway in focal adhesion turnover and cell motility mediated by Orail activation upstream of FAK. Thus, it is likely that proteolysis of these substrates contributes to the regulation of adhesion dynamics and cell migration.

We can summarize our findings on the role of Orail/STIM in keratinocyte migration: the activation of EGFR induces the stimulation of PLC $\gamma$  and consequently the depletion of calcium in the endoplasmic reticulum, which induces the redistribution of the calcium sensor STIM1 (Fig. 8). The latter, in turn, transactivates the Orail channel and induces store-operated calcium entry. This store-operated calcium entry promotes both the autophosphorylation of FAK via activation of calcium-dependent PKC $\beta$  and the degradation of FAK by calcium-dependent  $\mu$ -calpain protease, enhancing focal adhesion turnover and thereby stimulating polarized cell motility of human keratinocytes.

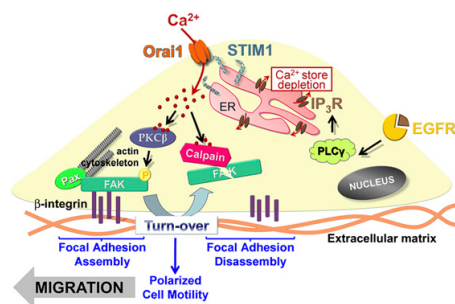
Our data obtained in humans are strongly supported by our *orail*<sup>-/-</sup> mouse model studies. Although the absence of Orail protein in keratinocytes affects the SOCE in these cells, it may be compensated by other store-operated channels. In addition, the proliferation of keratinocytes and particularly polarized migration, both basal and induced, are significantly decreased. The consequences of *orail*<sup>-/-</sup> deletion lead to impaired epidermis/barrier formation as a result of aberrant keratinocyte structural protein expression, suppressed proliferation, and, eventually, migration—all of them crucial for normal skin homeostasis.

## Materials and Methods

**Cell Culture and Human Skin Sections.** Human Primary Keratinocytes (hPK) were purchased from Invitrogen. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> in a keratinocyte serum-free medium (K-SFM) supplemented with 5  $\mu$ g/mL recombinant epidermal growth factor (EGF) and 50  $\mu$ g/mL bovine pituitary extract (BPE), containing 0.07 mM Ca<sup>2+</sup>. The medium was changed three times a week, and cultures were split by treating the cells with 0.25% (vol/vol) trypsin (in PBS) for 5 min at 37 °C before confluency. Throughout the text, the terms UhPK and DhPK are used. They imply that hPKs kept in 0.07 mM Ca<sup>2+</sup> are called undifferentiated (UhPK) because their phenotype corresponds to undifferentiated proliferating cells from stratum basale, or hPK cells treated with 1.7 mM Ca<sup>2+</sup> for at least 3 d, which provokes an irreversible differentiation process and keratinocytes have to be considered as differentiated (DhPK).

**Orail<sup>-/-</sup> Animals and Gene Targeting.** Gene targeting of the *Orail* gene was performed by homologous recombination in B6/3 embryonic stem (ES) cells derived from C57BL/6 mice (TaconicArtemis GmbH). Chimeric mice with targeted *Orail* alleles were generated by blastocyst injection of heterozygous *Orail*<sup>neo/+</sup> ES cell clones, as previously described (17). All mice were maintained in specific pathogen-free barrier facilities at the La Jolla Institute for Allergy and Immunology (LIAI) and were used in accordance with protocols approved by the Center for Animal Resources and LIAI. All mice were genotyped by PCR. PCR-ready genomic DNA was extracted from tail biopsies using the QuickExtractDNA Extraction Solution (Epicentre) and then amplified with the primers WT Forward 5'-GGGTGTGGCGTATGCAAATAACT-3', WT Reverse 5'-ACTCGAGCCGTCTCCC-3', KO Reverse 5'-TCGTACCACCTTCTGGGACTTGA-3' (IDT), and Taq Choice (Applied Biosystems).

**Mouse Primary Keratinocyte Culture.** Mouse primary keratinocytes were isolated by dissecting the skin from *orail*<sup>-/-</sup> mice using a standard protocol. The removed skin was washed in PBS completed with Penicillin/Streptavidin 1% (Gibco) and then fragmented and incubated in a vol/vol solution of Collagenase I (8 mg/mL) and Dispase (5 mg/mL) (Gibco) for 3 h at 37 °C. Then Trypsin is added during 15 min, and the mixture is filtered using a 40- $\mu$ m



**Fig. 8.** The role of Orail in keratinocyte polarized motility. The activation of EGFR induces the activation of PLC $\gamma$  and consequently the depletion of calcium in the endoplasmic reticulum, which stimulates the calcium sensor STIM1. The latter, in turn, transactivates the Orail channel and induces store-operated calcium entry. This store-operated calcium entry promotes both the autophosphorylation of FAK<sup>397</sup> via activation of calcium-dependent PKC $\beta$  and the degradation of Focal Adhesion Kinase by calcium-dependent  $\mu$ -calpain protease, enhancing focal adhesion turnover and thereby both stimulating polarized cell motility of human keratinocytes.

filter, centrifuged at  $1,000 \times g$  for 5 min, and finally resuspended in a Defined Epidermal keratinocyte Medium CnT-07, PCT (CellIntec) and incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for a week. Then, cell medium was replaced by CnT-57, PCT (CellIntec) and changed every 3 d.

**siRNA Cell Transfection.** All siRNAs were synthesized by Eurogentec France SASU and are indicated in Table S1. Cells were transfected with 60 nM siRNA using 6  $\mu$ l of Hyperfect transfection reagent (Qiagen) following the manufacturer's instructions. The efficiency of cell transfections with the siRNAs for each particular target has been validated using real-time quantitative PCR.

**Immunohistochemistry.** Paraffinized human skin sections were obtained following breast-reduction surgery after informed patient consent and the approval of the ethical committee of the St. Vincent Hospital of Lille. Paraffin-embedded skin sections were subjected to conventional deparaffinization followed by antigen retrieval using citrate buffer at 95 °C in a water bath. After saturation in the solution containing 1% BSA and 0.05% Triton X-100 in PBS-gelatin, the skin sections were incubated with the specific rabbit polyclonal anti-ORAI1 antibody (ProScience; 1/200), mouse monoclonal anti-STIM1 (BD Biosciences; 1/200), mouse monoclonal anti-KRT 10 (Chemicon International; 1/500), anti-Involucrin (Sigma-Aldrich; 1/500), anti-Filaggrin (Abcam; 1/500), and anti-phospho-FAK (pTyr397) (Sigma-Aldrich; 1/200) overnight at 4 °C. Goat polyclonal anti-rabbit and anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibodies (Chemicon International; 1/200) were used. After revelation with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich), images were analyzed using a Zeiss AxioScope microscope (Carl Zeiss) and Leica Image Manager software (Leica Geosystems AG Heinrich).

**Immunocytochemistry.** Cells grown on glass coverslips were washed once with PBS and fixed in 3.5% paraformaldehyde in PBS. PBS-glycine (30 mM) + BSA (50  $\mu$ l/mL) was used as a saturation buffer, and permeabilization was obtained using 0.1% Triton X-100. The cells were washed again in PBS and subjected to F-actin staining by the Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Fluka-Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature (1/1000). Then, a conventional immunostaining procedure was used for the detection of focal adhesion proteins: mouse monoclonal anti-paxillin (Abcam; 1/200) and rabbit polyclonal anti-phospho-FAK (pTyr397) (Abcam; 1/400). Alexa Fluor 546 or 488 goat anti-rabbit or anti-mouse IgGs (Molecular Probes; 1/4,000) were used as secondary antibodies. Fluorescence was analyzed on a Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200 M with a  $\times 63$  1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature.

**Quantitative Real-Time PCR.** The quantitative real-time PCR of Orai1, STIM1, FLG, and HPRT mRNA transcript was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) on the Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequences of primers are indicated in Table S2. The HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) gene was used as an endogenous control to normalize variations in the RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results, the comparative threshold cycle method  $\Delta\Delta$ Ct and CFX Manager Software v2.0 were used.

**Western Blotting.** hPK cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor mixture from Sigma. The lysates were centrifuged at  $15,000 \times g$  and 4 °C for 20 min, mixed with a sample buffer containing 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue, and boiled for 5 min at 95 °C. The total protein samples were subjected to 8–10% SDS/PAGE and transferred to a PVDF membrane by semidry Western blotting (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked in a 5% milk TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) for 1 h, and then probed using a specific rabbit polyclonal anti-FAK (Abcam; 1/400) and anti-phospho-FAK (pTyr397) (Sigma-Aldrich; 1/1000) and anti- $\beta$ -actin (Lab Vision; 1/1000) antibodies. The bands on the membrane were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnologies). A densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories).

**Electrophysiology and Solutions.** Macroscopic currents were recorded from hPK cells in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using

a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic), as previously described. Voltage ramps (–100 to +100 mV) of 250 ms were recorded every 2 s for IP3 and 5 s for TG immediately after gaining access to the cell from a holding of 0 mV. The currents were normalized based on the cell capacitance. Leak currents were subtracted by subtracting an initial ramp current (before SOC development) from all subsequent ramp currents.

The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM): 120 NaCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 10 Hepes, pH 7.4 (adjusted with TEA-OH), osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-mannitol. The patch pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 Hepes, 10 BAPTA [1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid], and 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.4 with CsOH and osmolarity 295 mOsm/kg adjusted with D-mannitol). The necessary supplements in the desired concentrations were added to the experimental solutions directly from the appropriate stock solutions, dissolved in water, ethanol, or dimethyl sulfoxide. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. The experiments were carried out at room temperature.

**Cell-Proliferation Assays.** hPK cells were harvested and plated at the initial density of 3,000 cells per well in 96-well plates (Poly-Labo). Cells were transfected, and the number of viable cells was determined every 24 h using the CellTiter 96 Aqueous nonradioactive cell proliferation assay (Promega Corp.). Cell count was also used to determine the proliferation rate of hPK 48 h after transfection with siRNA using a Malassez counting chamber. Cells were trypsinized from six-well plates, and cells from each well were counted eight times.

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

**Wound-Healing Assay.** hPK cells were seeded and allowed to reach subconfluency, and then cells were transfected with the siRNAs. After 24 h, a 1,000- $\mu$ l pipette tip was used to scrape across the dish, and the resulting wound was washed with PBS. Bright field images were captured along the wound using a Nikon TS100 microscope ( $\times 100$ ), and then a series of pictures were taken at 24 h, 48 h, and 72 h after wounding. The images were then analyzed using Adobe Photoshop CS5.

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

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

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Dr. Adriana Mihalache and Prof. Pierre Gosset for immunostaining expertise. We also thank Dr. David House from GlaxoSmithKline for the provision of GSK-7975A and GSK-5503A compounds. We thank the Department of Research and Development of Johnson and Johnson France for the PhD funding of M.V. and M.R., as well as for the scientific collaboration with our laboratory. D.G. was supported by the State Fund for Fundamental Research (F 46.2/001). The studies on keratinocytes from Orai1<sup>−/−</sup> mice were funded in part by National Institutes of Health Grants AI084167 and AI40127 (to A.R. and P.G.H.).

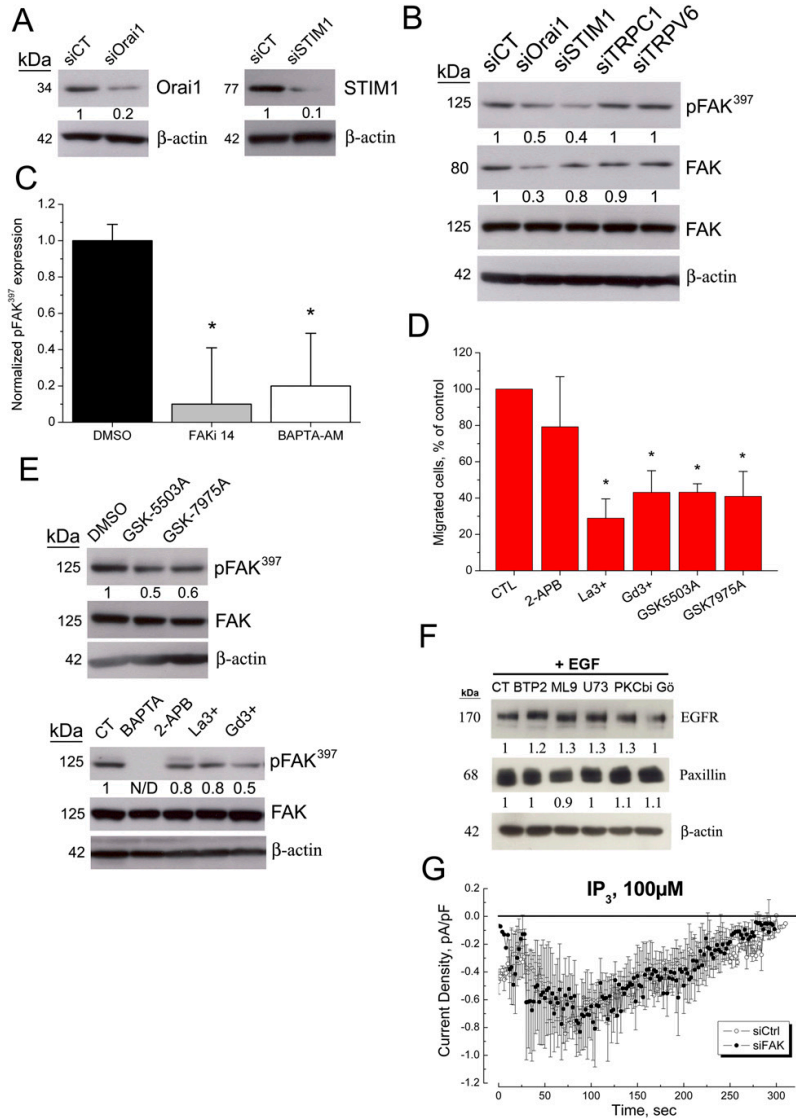
1. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M (1990) Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes. Modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* 143(2):294–302.

2. Yuspa SH, Kilkeny AE, Steinert PM, Roop DR (1989) Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro. *J Cell Biol* 109(3):1207–1217.

3. Heenen M, De Graef C, Galand P (1992) Kinetics of the calcium induced stratification of human keratinocytes in vitro. *Cell Prolif* 25(3):233–240.
4. Mackenzie JC (1969) Ordered structure of the stratum corneum of mammalian skin. *Nature* 222(5196):881–882.
5. Barritt GJ (1998) Does a decrease in subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> explain how store-operated Ca<sup>2+</sup> channels are opened? *Cell Calcium* 23(1):65–75.
6. Smyth JT, et al. (2010) Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med* 14(10):2337–2349.
7. Parekh AB, Putney JW, Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85(2):757–810.
8. Feske S, et al. (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441(7090):179–185.
9. Prakriya M, et al. (2006) Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443(7108):230–233.
10. Vig M, et al. (2006) CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312(5777):1220–1223.
11. Hou X, Pedi L, Diver MM, Long SB (2012) Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338(6112):1308–1313.
12. Yeromin AV, et al. (2006) Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* 443(7108):226–229.
13. Abdullaev IF, et al. (2008) Stim1 and Orai1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ Res* 103(11):1289–1299.
14. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A (2007) Signalling to transcription: Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 42(2):145–156.
15. Ng SW, di Capite J, Singaravelu K, Parekh AB (2008) Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 283(46):31348–31355.
16. Stiber J, et al. (2008) STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 10(6):688–697.
17. Gwack Y, et al. (2008) Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking Orai1. *Mol Cell Biol* 28(17):5209–5222.
18. Numaga-Tomita T, Putney JW (2013) Role of STIM1- and Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in Ca<sup>2+</sup>-induced epidermal keratinocyte differentiation. *J Cell Sci* 126(Pt 2):605–612.
19. Jans R, et al. (2013) Lysophosphatidic acid promotes cell migration through STIM1- and Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup>(i) mobilization and NFAT2 activation. *J Invest Dermatol* 133(3):793–802.
20. Derler I, et al. (2013) The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium* 53(2):139–151.
21. Ross K, Whitaker M, Reynolds NJ (2007) Agonist-induced calcium entry correlates with STIM1 translocation. *J Cell Physiol* 211(3):569–576.
22. Boukamp P, et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106(3):761–771.
23. Warskulat U, Brookmann S, Reinen A, Häussinger D (2007) Ultraviolet B radiation induces cell shrinkage and increases osmolyte transporter mRNA expression and osmolyte uptake in HaCaT keratinocytes. *Biol Chem* 388(12):1345–1352.
24. Bellei B, et al. (2008) Ultraviolet A induced modulation of gap junctional intercellular communication by p38 MAPK activation in human keratinocytes. *Exp Dermatol* 17(2):115–124.
25. Sun T, et al. (2007) An integrated systems biology approach to understanding the rules of keratinocyte colony formation. *J R Soc Interface* 4(17):1077–1092.
26. Marionnet AV, Chardonnet Y, Viac J, Schmitt D (1997) Differences in responses of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production and secretion to cyclosporin-A and ultraviolet B-irradiation by normal and transformed keratinocyte cultures. *Exp Dermatol* 6(1):22–28.
27. Beck B, et al. (2008) TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: New insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium* 43(5):492–505.
28. Zhu S, et al. (1999) C/EBPbeta modulates the early events of keratinocyte differentiation involving growth arrest and keratin 1 and keratin 10 expression. *Mol Cell Biol* 19(10):7181–7190.
29. Tu CL, Chang W, Bikle DD (2005) Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 124(1):187–197.
30. Beck B, et al. (2006) TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 126(9):1982–1993.
31. Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Izutsu KT (2005) TRPC channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J Dermatol Sci* 40(1):21–28.
32. Cai S, et al. (2006) Evidence that TRPC1 contributes to calcium-induced differentiation of human keratinocytes. *Pflügers Arch* 452(1):43–52.
33. Fatherazi S, et al. (2007) Evidence that TRPC4 supports the calcium selective I(CRAC)-like current in human gingival keratinocytes. *Pflügers Arch* 453(6):879–889.
34. Bikle DD, Xie Z, Tu CL (2012) Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Exp Rev Endocrinol Metab* 7(4):461–472.
35. Tu CL, et al. (2012) Ablation of the calcium-sensing receptor in keratinocytes impairs epidermal differentiation and barrier function. *J Invest Dermatol* 132(10):2350–2359.
36. Kurasawa M, Maeda T, Oba A, Yamamoto T, Sasaki H (2011) Tight junction regulates epidermal calcium ion gradient and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 406(4):506–511.
37. Lehen'kyi V, et al. (2007) TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. *J Biol Chem* 282(31):22582–22591.
38. Lehen'kyi V, et al. (2011) Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation. *J Eur Acad Dermatol Veneol* 25(Suppl 1):12–18.
39. Pani B, Singh BB (2009) Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium* 45(6):625–633.
40. Berridge MJ (2006) Calcium microdomains: Organization and function. *Cell Calcium* 40(5-6):405–412.
41. Jardin I, Salido GM, Rosado JA (2008) Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1. *Channels (Austin)* 2(6):401–403.
42. Spörl F, et al. (2010) Real-time monitoring of membrane cholesterol reveals new insights into epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 130(5):1268–1278.
43. Zou JJ, Gao YD, Geng S, Yang J (2011) Role of STIM1/Orai1-mediated store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in airway smooth muscle cell proliferation. *J Appl Physiol* (1985) 110(5):1256–1263.
44. Bobe R, et al. (2011) SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 50(4):621–633.
45. Magee AJ, Lytton NA, Watt FM (1987) Calcium-induced changes in cytoskeleton and motility of cultured human keratinocytes. *Exp Cell Res* 172(1):43–53.
46. Ridley AJ, et al. (2003) Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704–1709.
47. Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD (1999) Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J Cell Sci* 112(Pt 16):2677–2691.
48. Schaller MD, Parsons JT (1994) Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6(5):705–710.
49. van de Water B, Nagelkerke JF, Stevens JL (1999) Dephosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) and loss of focal contacts precede caspase-mediated cleavage of FAK during apoptosis in renal epithelial cells. *J Biol Chem* 274(19):13328–13337.
50. Webb DJ, et al. (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6(2):154–161.
51. Schober M, et al. (2007) Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *J Cell Biol* 176(5):667–680.
52. Singh AB, Harris RC (2005) Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal* 17(10):1183–1193.
53. Sharma GD, Ottino P, Bazan NG, Bazan HE (2005) Epidermal and hepatocyte growth factors, but not keratinocyte growth factor, modulate protein kinase Calpha translocation to the plasma membrane through 15(S)-hydroxyicosatetraenoic acid synthesis. *J Biol Chem* 280(9):7917–7924.
54. Wong WS (2005) Inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade for asthma. *Curr Opin Pharmacol* 5(3):264–271.
55. Cheng X, et al. (2010) TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 141(2):331–343.
56. Pichard V, et al. (2001) Adhesion, actin cytoskeleton organisation and the spreading of colon adenocarcinoma cells induced by EGF are mediated by alpha2beta1 integrin low clustering through focal adhesion kinase. *Histochem Cell Biol* 116(4):337–348.
57. Lu Z, Jiang G, Blume-Jensen P, Hunter T (2001) Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and down-regulation of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 21(12):4016–4031.
58. Moissoglu K, Schwartz MA (2006) Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell* 98(9):547–555.
59. Kim SH, Kim SH (2008) Antagonistic effect of EGF on FAK phosphorylation/dephosphorylation in a cell. *Cell Biochem Funct* 26(5):539–547.
60. Huttenlocher A, et al. (1997) Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem* 272(52):32719–32722.
61. Franco SJ, Huttenlocher A (2005) Regulating cell migration: Calpains make the cut. *J Cell Sci* 118(Pt 17):3829–3838.
62. Bhatt A, Kaverina I, Otey C, Huttenlocher A (2002) Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci* 115(Pt 17):3415–3425.
63. Franco S, Perrin B, Huttenlocher A (2004) Isoform specific function of calpain 2 in regulating membrane protrusion. *Exp Cell Res* 299(1):179–187.
64. Cooray P, et al. (1996) Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem J* 318(Pt 1):41–47.
65. Satish L, Blair HC, Glading A, Wells A (2005) Interferon-inducible protein 9 (CXCL1)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. *Mol Cell Biol* 25(5):1922–1941.

# Supporting Information

Vandenberghé et al. 10.1073/pnas.1310394110



**Fig. S1.** (A) A representative immunoblotting showing the level of Orai1 and STIM1 protein knockdown following the respective 60 nM siRNA treatments for 24 h. Numbers below correspond to the relative quantity of the proteins compared with  $\beta$ -actin expression (loading control). (B) A representative immunoblotting showing the effects of 60 nM siRNA treatments for 24 h against Orai1, STIM1, TRPC1, and TRPV6 on the autophosphorylation of FAK<sup>397</sup> as well as the cleaved focal adhesion kinase (FAK) fragment formation, compared with total FAK ( $n = 3$ ). Numbers below correspond to the relative quantity of the proteins compared with total FAK.  $\beta$ -actin expression was used as a loading control. (C) Quantification histogram of FAK<sup>397</sup> autophosphorylation in UHPK cells treated with 10  $\mu$ M FAKi 14 and 50  $\mu$ M BAPTA-AM. DMSO was used as a control. Data shown are mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ;  $n = 3$ . (D) Cell-migration assay using Transwell chambers of UHPK cells pretreated for 2 h with 100  $\mu$ M 2-APB, 300  $\mu$ M La<sup>3+</sup>, and 20  $\mu$ M Gd<sup>3+</sup>, 10  $\mu$ M GSK-7975A, and GSK-5503A. Data shown are mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$ ;  $n = 4$ . (E) A representative immunoblotting showing the autophosphorylation of FAK<sup>397</sup> in UHPK cells treated with 10  $\mu$ M GSK-7975A and GSK-5503A, 50  $\mu$ M BAPTA-AM, 100  $\mu$ M 2-APB, 300  $\mu$ M La<sup>3+</sup>, and 20  $\mu$ M Gd<sup>3+</sup> for 2 h ( $n = 3$ ). (F) The protein expression of EGFR and Paxillin under pharmacological inhibition of Orai1 (BTP2, 1  $\mu$ M), STIM1 (ML9, 10  $\mu$ M), PLC (U73122, 1  $\mu$ M), and two PKC inhibitors (IPKC $\beta$ , 0.1  $\mu$ M and G06976, 1  $\mu$ M), and 100 ng/mL EGF treatment. Numbers below correspond to the relative quantity of the proteins compared with total FAK. (G) Mean time courses of  $I_{\text{SOC}}$  development (current density, measured at  $-100$  mV holding potential) in UHPK cells pretreated with the control siRNA (white circles) or 60 nM siFAK (black circles) for 24 h, in response to the dialysis of 100  $\mu$ M IP<sub>3</sub>.





	Protéine	Nom	Gène	Protéine	Nom
trpc1	TRPC1	Transient Receptor Potential Canonical	ryr2	RyR2	Ryanodin Receptor
trpc3	TRPC3		ryr3	RyR3	
trpc4	TRPC4		itpr1	InsP <sub>3</sub> R1	Inositol triphosphate Recepteur
trpc5	TRPC5		itpr3	InsP <sub>3</sub> R3	
trpc6	TRPC6		hspa5	GRP78	Bip chaperon
trpc7	TRPC7		mcu	MCU	Mitochondrial Calcium Uniporter
trpv1	TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid	cs	CS	Citrate Synthase
trpv2	TRPV2		sod2	SOD2	SuperOxyde Dismutase2
trpv3	TRPV3		atp2c1	SPCA1	Secretory Pathway Calcium ATPase
trpv4	TRPV4		sqstm1	p62	sequestosome 1
trpv5	TRPV5		map1lc3b	LC3B	microtubule-associated proteins 1A/1B light chains 3B/LC3B
trpv6	TRPV6		bcl2	BCL2	B-cell lymphoma 2
trpa1	TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin	nos1	NOS1	Nitric Oxyde Synthase
trpm1	TRPM1	Transient Receptor Potential Melastatin	nos3	NOS3	
trpm2	TRPM2		kl	Klotho	Klotho
trpm3	TRPM3		shc1	SHC1	SH2-domain Containing protein 1
trpm4	TRPM4		tert	TERT	TElomerase Reverse Transcriptase
trpm5	TRPM5		glb1	β-Gal	β-galactosidase
trpm6	TRPM6		cdkn1a	p21	CDK-inhibitor 1A
trpm7	TRPM7		cdkn2a	p16	CDK-inhibitor 2A
trpm8	TRPM8		pcna	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
mcoln1	TRPML1	Transient Receptor Potential Mucolopin	flg	Filaggrine	Filaggrin
mcoln2	TRPML2		krt10	Kératine10	Kératine10
mcoln3	TRPML3		krt5	Kératine 5	Kératine 5
pkd1	TRPP1	Transient Receptor Potential Polycystin	casp3	Caspase3	Caspase3
pkdrej	PKDREJ	Polycystin Receptor for Egg Jelly	rb1	pRB	RetinoBlastoma Protein
pkd111	TRPP1L1	Transient Receptor Potential Polycystin 1 like	tp53	p53	Tumor Protein 53
pkd112	TRPP1L2		sp1	SP1	Specificity Protein 1
pkd113	TRPP1L3		jun	C-jun	C-jun

pkd2	TRPP2	Transient Receptor Potential Polycystin	jund	junD	junD
pkd2l1	TRPP3		tfap2a	AP-2 $\alpha$	Transcription Factor Activating enhancer binding Protein-2
pkd2l2	TRPP4		tfap2c	AP-2 $\beta$	
orai1	ORAI1	ORAI calcium release-activated calcium modulator	tfap2e	AP-2 $\epsilon$	cAMP response element-binding protein
orai2	ORAI2		creb1	CREB	
orai3	ORAI3		nfatc1	NFaTc1	Nuclear factor of activated T-cells
atp2b1	PMCA1	nfatc2	NFaTc2		
atp2b2	PMCA2	nfatc3	NFaTc3		
atp2b3	PMCA3	Plasma Membrane Calcium ATPase	akt1	akt1/PKB $\alpha$	Protein Kinase B $\alpha$
atp2b4	PMCA4		mtor	mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
casr	CaSR	Calcium-Sensor Receptor	pparg	PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$
panx1	Pannexin1	Pannexine	adcy10	AC 10	Adenylate Cyclase 10
panx3	Pannexie3		tmem158	TMEM158	Transmembrane protein 158
stim1	STIM1	STromal Interaction molecule	hprt1	HPRT	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
stim2	STIM2		gusb	GUSB	$\beta$ -glucuronidase
atp2a2	SERCA2	Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase	tbp	TBP	TATA box Binding Protein
atp2a3	SERCA3		b2m	B2M	$\beta$ -2 microglobulin
ryr1	RyR1	Ryanodin Receptor			

[Tableau 7:](#) Liste des protéines dont l'expression génique a été évaluée par PCR quantitative dans l'épiderme humain et dans les cultures de kératinocytes primaires.

## II. Evolution de la signature calcique au cours du vieillissement de l'épiderme humain

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est crucial dans l'homéostasie de l'épiderme, le maintien de la barrière cutanée, et la sensibilité. De plus, nous avons vu que certains canaux TRPs ont déjà été découverts comme acteurs de la sensibilité ou de la pigmentation de la peau mais aussi dans l'homéostasie de l'épiderme. Ils sont donc impliqués dans la régulation de l'équilibre entre la prolifération et la différenciation des kératinocytes. La modification de l'expression de ces canaux a aussi été impliquée dans certaines pathologies cutanées comme, par exemple, celle de TRPC1 dans la maladie de Darier. Or, lors du vieillissement, l'épiderme peut connaître plusieurs troubles comme des xéroses (sécheresses), des kératoses séborrhéiques ou actiniques, ainsi que des troubles pigmentaires dus à une diminution du nombre de mélanocytes et de leur activité comme dans les lentigo actiniques (pour revue, voir Passeron and Ortonne, 2003).

Nous avons alors voulu faire le point sur les canaux de la famille des TRPs exprimés dans l'épiderme humain ainsi que les autres canaux, transporteurs et pompes ATPasiques impliqués dans la signalisation calcique. Puis, nous nous sommes intéressés à leur régulation au cours du vieillissement de l'épiderme *in vivo* et de la sénescence des kératinocytes *in vitro*.

Nous avons alors sélectionné 96 gènes (Tableau 7) dont l'expression a été évaluée par PCR quantitative en utilisant quatre gènes de ménage montrés comme étant fiables pour l'étude du vieillissement : HPRT, GAPDH, GUSB et B2M (cotondb.org; Allen et al., 2008; Zampieri et al., 2010). L'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) est une enzyme cruciale dans la synthèse de la purine, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est l'enzyme de la 6<sup>ème</sup> étape de la glycolyse, la  $\beta$ -glucuronidase (GUSB) est une hydrolase lysosomale clivant les glycosaminoglycans, la  $\beta$ 2 microglobuline (B2M) est une protéine du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. L'état de différenciation de l'épiderme a été évalué selon l'expression des marqueurs de différenciation cytokératine 5 et 10 (KRT5/10) et de la filaggrine (FLG) en parallèle avec celle des protéines du cycle cellulaire p21, p16, p53, pRB et PCNA. Ces dernières ont également été utilisées pour évaluer l'état de sénescence cellulaire en plus de la télomérase (TERT), de la  $\beta$ -galactosidase et de klotho (KL). L'existence des processus d'autophagie ou d'apoptose a été vérifiée en déterminant les taux d'expression génique de mTOR, p62, LC3B, PPAR $\gamma$  et de la caspase-3.

L'expression des ARN *in vivo* est quantifiée dans l'épiderme (séparé du derme) de patients d'âges différents (20 patients de 18 à 90 ans) ayant subi une dermolipectomie abdominale ou à distance d'un sinus pilonidal. *In vitro*, les ARN sont extraits de kératinocytes primaires humains adultes indifférenciés 6 jours après décongélation, UhPKa (n=3), différenciés par le protocole de « calcium switch » pendant 6 jours et après avoir atteint la confluence, DhPKa (n=3), ou sénescents après le 3<sup>ème</sup> passage ShPKa (n=3). L'expression est considérée suffisante lorsqu'elle est détectée en qPCR avant le 35<sup>ème</sup> cycle,  $C_t$  (au delà du 35<sup>ème</sup> cycle, l'activité de la polymérase n'est pas garantie).



	Moy Ct	SD		Moy Ct	SD
TRPC1	33,0455	2,29881314	SERCA3	35,2010526	1,79482557
TRPC3	36,93	0,83607549	RYR1	30,2363158	1,51982532
TRPC4	37,9353333	3,72200957	RYR2	36,4893333	3,35545711
TRPC5	35,6883333	1,66436439	RYR3	31,0668421	1,78209631
TRPC6	31,8525	2,4315208	IP <sub>3</sub> R1	31,8826316	1,63045952
TRPC7	38,6942857	2,4621661	IP <sub>3</sub> R3	27,2868421	1,86464788
TRPV1	32,088	2,19996077	HSPA5	30,134	2,31233398
TRPV2	34,561579	2,68311855	MCU	28,5763158	1,68474927
TRPV3	28,935	2,63482847	CS	26,2121053	1,8945289
TRPV4	31,2321053	1,42197273	SOD2	24,1747368	2,22052388
TRPV5	37,7566667	0,51519576	SPCA1	27,5295	2,65593571
TRPV6	30,4826316	1,82126892	SQSTM1	26,265	3,50365298
TRPA1	38,7005	1,50810259	MAP1LC3B	27,2321053	2,52367364
TRPM1	32,26	2,90778075	BCL2	30,894	1,96672959
TRPM2	34,7721053	2,42709607	NOS1	32,1961111	2,34097049
TRPM3	39,193	1,8099911	NOS3	38,95	1,65301072
TRPM4	31,977	2,0302297	KL	37,5988235	1,60010501
TRPM5	36,539	1,40762173	SHC1	28,9755	2,50458837
TRPM6	36,1842105	2,59691979	TERT	39,676875	1,09776572
TRPM7	28,0184211	1,73735835	GLB1	31,7855	2,70345291
TRPM8	38,026	2,19811738	CDKN1A	25,5265	3,48063859
TRPML1	29,5242105	2,56730147	CDKN2A	35,2022222	2,20585732
TRPML2	31,8675	1,69837965	PCNA	28,4	3,09641559
TRPML3	32,7705556	2,39417792	FLG	23,7205263	2,57336026
PKD1	30,352	2,63238255	KRT10	20,1842105	1,84125958
PKDREJ	34,25	2,04172313	KRT5	21,1384211	1,80190104
PKD1L1	36,9623077	1,06620944	CASP3	29,4031579	2,00003626
PKD1L2	38,201	1,2834776	RB1	29,459	2,66158421
PKD1L3	37,8410526	1,76969833	TP53	28,097	2,96839687
PKD2	32,2105	2,32967464	SP1	27,8952632	2,22417118
PKD2L1	37,83	2,11642296	JUN	26,9710526	2,27743251
PKD2L2	38,038	0,71356383	JUND	26,0868421	1,12953802
ORAI1	28,5810526	1,42967321	TFAP2A	26,1225	2,92012594
ORAI2	35,1485	1,42332921	TFAP2C	28,0465	3,05778605
ORAI3	31,4626316	1,80930878	TFAP2E	31,389	1,9200244
PMCA1	27,9335	2,91658827	CREB1	28,463	2,54943977
PMCA2	35,01	1,76534227	NFATC1	29,5026316	1,4555329
PMCA3	36,3689474	1,60121445	NFATC2	34,2831579	1,61312345
PMCA4	26,0963158	1,74241917	NFATC3	29,0810526	2,53208499
CASR	38,1826316	1,22801485	AKT1	28,771579	1,33333026
PANX1	28,061579	2,22051611	MTOR	31,401579	1,9438686
PANX3	36,4783333	0,88601166	PPARG	35,4877778	1,9638664
STIM1	28,8294737	1,90859306	ADCY10	36,6233333	2,45330509
STIM2	28,627	2,77371896	TMEM158	29,5121053	2,02106017
SERCA2	26,4585	2,66552903			

Tableau 8 : Analyse transcriptomique par qPCR des gènes cibles dans l'épiderme humain. L'intensité de l'expression des gènes est représentée par une « heat map » et inversement proportionnelle au C<sub>t</sub> moyen représentant le nombre de cycles de PCR avant d'atteindre le seuil de détection (n=20).

## A. Acteurs de la signalisation calcique et marqueurs physiologiques exprimés dans l'épiderme humain

Notre étude a bien mis en évidence l'expression des cytokératines et protéines enzymatiques exprimées par les kératinocytes et utilisées comme marqueurs de différenciation (**KRT5**, **KRT10** et **FLG**) ainsi que la **PCNA** indiquant la prolifération des cellules et les protéines régulatrices du cycle cellulaire **pRb1**, **p21** (CDKN1A), **p16** (CDKN2A) et **p53** (TP53). Cependant, nous avons montré que tous les canaux TRPs ne sont pas systématiquement détectés dans l'épiderme humain (Tableau 8).

### Les canaux TRPs et les protéines du SOCE:

Tandis que tous les membres des canaux **TRPML** et **TRPV**, excepté **TRPV5**, sont suffisamment exprimés ( $C_t$  moy < 35) dans l'épiderme humain, nous n'avons détecté que les membres **1**, **5** et **6**, de la famille **TRPC**. **TRPA1** n'est pas détecté dans l'épiderme et seuls les membres **1**, **2**, **4** et **7** des 8 canaux **TRPM** le sont suffisamment pour être quantifiés. **TRPP1** et **TRPP2** sont exprimés ainsi que **PKDREJ**, le **TRPP1**-like ayant été découvert comme récepteur impliqué dans la fécondation des œufs de méduse (Moy et al., 1996; Hughes et al., 1999).

Les canaux **Orai 1** et **3** sont détectés ainsi que **Stim1** et **2** mais des **pannexines 1** et **3**, seule la première est suffisamment exprimée dans l'épiderme humain.

### Les pompes calciques :

Parmi les 4 pompes calciques **PMCA**, la 3<sup>ème</sup> n'a pas été détectée par notre analyse et, des 2 **SERCA** testées, seule la **SERCA2** est mise en évidence ici tout comme la pompe ATPasique de l'appareil de Golgi **SPCA1**.

### Les « canaux » perméables au $Ca^{2+}$ (ou protéines associées) du RE et des mitochondries :

Les récepteurs réticulaires **RyR1** et **3** ou **IP<sub>3</sub>R1** et **2** sont détectés mais pas **RyR2**. Le **MCU**, impliqué dans le transport du calcium vers les mitochondries, est exprimé ainsi que la Citrate synthase (**CS**), servant de gène de ménage mitochondriale, et la chaperonine **Grp78**, bloquant le translocon et la fuite de calcium du RE.

### Les voies de signalisation et facteurs de transcription dépendants du $Ca^{2+}$ :

Dans l'épiderme humain, nous avons détecté l'expression significative de la **caspase 3**, impliquée dans l'apoptose tandis que l'ADNc de son principal substrat, **PPAR $\gamma$** , est détecté tardivement, soit à  $35,49 \pm 1,96$  cycles de PCR. Nous avons également mis en évidence l'expression du gène de la **LC3B**, impliquée dans la formation des vésicules autophagiques, de **Bcl2** et de **mTOR**, inhibiteurs de l'autophagie et/ou de l'apoptose. Tous les gènes des voies de signalisation faisant intervenir le  $Ca^{2+}$  testés sont exprimés dans l'épiderme humain, comme les facteurs de transcription **AP1** (**c-jun**, **junD**) et **AP2** (**TFAP2 $\alpha$** ,  **$\gamma$**  et  **$\epsilon$** ), à l'exception de l'adenylate cyclase soluble (**ADCY10**) qui a un  $C_t$  moyen de  $36,62 \pm 2,45$ . Enfin, selon nos

données, l'expression de la transcriptase inverse des télomères (TERT) est très faible dans l'épiderme tout comme celle de l'enzyme Klotho (KL) avec des  $C_t$  moyens de  $39,68 \pm 1,09$  et  $37,60 \pm 1,60$  respectivement. L'expression de l'inhibiteur des CDK, **p16**, marqueur de la sénescence répliquative est également faible et limite pour être quantifiée par qPCR ( $C_t$  moyen  $35,20 \pm 2,21$ ).

Après cette première analyse transcriptomique des acteurs de la signalisation calcique dans l'épiderme humain, nous avons cherché l'existence d'éventuelles corrélations entre leur expression et le vieillissement de l'épiderme humain.

	2 groupes		Age linéaire		
	Régulation	p-value (Mann-Whitney-Wilcoxon)	% de regulation par an	R (coefficient de correlation de Spearman)	p-value
TRPC1	-1,1115	0,739	-3,57%	0,18	0,442
TRPC5	1,56	0,162	5,05%	-0,41	0,07
TRPC6	2,314	0,353	7,44%	-0,04	0,857
TRPV1	-1,4875	0,218	-4,78%	0,4	0,08
TRPV2	-1,2799	0,796	-4,12%	0,16	0,508
TRPV3	1,5234	0,043	4,90%	-0,43	0,058
TRPV4	-1,1667	1	-3,75%	0,12	0,62
TRPV6	1,7171	0,19	5,52%	-0,35	0,133
TRPM1	-2,5023	0,123	-8,04%	0,55	0,012
TRPM2	-1,5506	0,393	-4,99%	0,34	0,139
TRPM4	-1,1439	0,436	-3,68%	-0,11	0,636
TRPM6	-1,515	0,912	-4,90%	0,08	0,729
TRPM7	1,1008	0,307	3,54%	-0,3	0,193
MCOLN1	1,1961	0,28	3,85%	-0,05	0,828
MCOLN2	1,0234	0,19	3,29%	-0,26	0,267
MCOLN3	-1,8213	0,247	-5,86%	0,41	0,069
PKD1	1,0879	0,393	3,50%	-0,22	0,345
PKDREJ	-1,1477	0,796	-3,69%	-0,08	0,75
PKD2	-1,1626	0,853	-3,74%	0,15	0,539
ORAI1	1,2696	0,063	4,08%	-0,4	0,081
ORAI2	-1,6295	0,597	-5,24%	0,25	0,29
ORAI3	-1,1911	0,677	-3,83%	0,06	0,803
ATP2B1	1,1047	0,393	3,55%	-0,21	0,374
ATP2B4	1,6143	0,029	5,19%	-0,59	0,006
PANX1	1,2126	0,496	3,90%	-0,13	0,59
STIM1	1,3936	0,049	4,48%	-0,48	0,031
STIM2	1,3055	0,019	4,20%	-0,56	0,01
ATP2A2	1,3605	0,19	4,37%	-0,3	0,192
ATP2A3	-1,7509	0,705	-5,63%	0,16	0,49
RYR1	-1,1041	0,971	-3,55%	0,05	0,845
RYR3	-1,5441	0,029	-4,96%	0,48	0,031
ITPR1	1,7336	0,008	5,57%	-0,57	0,009
ITPR3	1,7983	0,063	5,78%	-0,47	0,036
HSPA5	1,0334	0,384	3,32%	-0,37	0,113
MCU	1,5464	0,035	4,97%	-0,67	0,001
CS	1,3475	0,052	4,33%	-0,47	0,037



<b>SOD2</b>	1,2046	0,796	3,87%	0,1	0,675
<b>ATP2C1</b>	1,3556	0,089	4,36%	-0,56	0,011
<b>SQSTM1</b>	1,5432	0,212	4,96%	-0,19	0,411
<b>MAP1LC3B</b>	1,3472	0,247	4,33%	-0,45	0,046
<b>BCL2</b>	1,0526	0,912	3,38%	0,09	0,712
<b>NOS1</b>	2,4344	0,123	7,83%	-0,33	0,153
<b>SHC1</b>	-1,0893	0,315	-3,50%	-0,24	0,303
<b>GLB1</b>	1,0684	0,631	3,44%	0,09	0,705
<b>CDKN1A</b>	1,6067	0,075	5,17%	-0,52	0,018
<b>CDKN2A</b>	1,0764	0,579	3,46%	-0,01	0,955
<b>PCNA</b>	1,0016	0,791	3,22%	0,04	0,871
<b>FLG</b>	3,9031	0,009	12,55%	-0,58	0,007
<b>KRT10</b>	3,1299	0,076	10,06%	-0,48	0,034
<b>KRT5</b>	1,0114	0,684	3,25%	0,07	0,772
<b>CASP3</b>	1,0332	0,28	3,32%	-0,27	0,253
<b>RB1</b>	1,2144	0,035	3,90%	-0,63	0,003
<b>TP53</b>	1,1148	0,07	3,58%	-0,19	0,428
<b>SP1</b>	1,0638	0,052	3,42%	-0,24	0,313
<b>JUN</b>	-1,0619	0,912	-3,41%	0,22	0,343
<b>JUND</b>	1,1521	0,705	3,70%	-0,08	0,727
<b>TFAP2A</b>	1,3593	0,121	4,37%	-0,27	0,246
<b>TFAP2C</b>	1,3041	0,052	4,19%	-0,31	0,19
<b>TFAP2E</b>	1,4032	0,089	4,51%	-0,53	0,017
<b>CREB1</b>	1,1352	0,105	3,65%	-0,39	0,087
<b>NFACT1</b>	1,5371	0,043	4,94%	-0,38	0,095
<b>NFACT2</b>	1,6341	0,273	5,25%	-0,09	0,7
<b>NFACT3</b>	-1,5786	0,162	-5,08%	-0,34	0,137
<b>AKT1</b>	-1,0347	0,353	-3,33%	-0,02	0,942
<b>MTOR</b>	-1,0478	0,971	-3,37%	0,19	0,421
<b>PPARG</b>	-2,7604	0,105	-8,88%	0,45	0,045
<b>TMEM158</b>	1,3301	0,218	4,28%	-0,23	0,33

Tableau 9: Analyse transcriptomique par qPCR de l'épiderme au cours du vieillissement. Les analyses statistiques ont été faites par des tests non paramétriques selon deux méthodes : l'une classant les valeurs en deux groupes (18-40 ans ou >40 ans) et utilisant le test de Mann-Whitney-Wilcoxon, l'autre vérifiant l'existence d'une corrélation entre l'âge et l'expression des gènes en calculant le coefficient de corrélation de Spearman et la p-value associée (n=20). Les gènes surlignés en rose ont une expression corrélée significativement à l'âge ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$ ). Les valeurs surlignées en jaune sont proches de  $p < 0,05$ .

## B. Evaluation d'une corrélation entre l'expression génétique des acteurs de l'homéostasie calcique et le vieillissement de l'épiderme humain

A partir du [tableau 9](#), nous avons analysé l'évolution de l'expression des gènes étudiés au cours du vieillissement de l'épiderme en effectuant deux types d'analyses statistiques non-paramétriques car la distribution des données ne suit pas de loi normale.

La première méthode consistait à séparer les individus selon leur âge en 2 groupes indépendants de 10 personnes, un de 18 à 39 ans ( $28,5 \pm 6,27$ , médiane 30 ans) et l'autre de 40 ans et plus ( $59,6 \pm 10,27$ , médiane 63,5 ans). Ensuite les  $\Delta Ct$  ( $Ct$  gène – Moy  $Ct$  gènes de référence) de chaque gène ont été calculés et comparés entre les deux groupes avec le test de Mann-Whitney-Wilcoxon (équivalent non-paramétrique du t-Student) afin de vérifier l'existence d'une différence significative de l'expression du gène cible avant et après 40 ans. La deuxième méthode consistait à vérifier l'existence d'une corrélation entre l'expression des gènes dans l'épiderme et l'âge des sujets (analyse linéaire). Pour cela, nous avons calculé, pour chaque gène, le coefficient de corrélation partielle de Spearman basé sur les rangs des valeurs analysées (équivalent non-paramétrique du coefficient de corrélation de Pearson) ainsi que sa valeur-p associée.

Au cours du vieillissement, nous avons vu une **augmentation significative** et une **bonne corrélation croissante** de l'expression de **8 gènes** dans l'épiderme avec l'âge : **TRPV3, PMCA4, Stim1 et 2, IP<sub>3</sub>R1, MCU, FLG et pRB**. L'augmentation de l'expression de ces gènes a été estimée à environ 4% par an sauf pour la Filaggrine (FLG) dont l'expression augmente d'environ 12% par an.

Certains gènes ont une **expression corrélée au vieillissement** sans pour autant montrer une différence significative dans les intervalles choisis comme **TRPM1 et PPAR $\gamma$**  qui **diminuent** alors que **p21, KRT10, SPCA1, LC3B, CS, TFAP2 $\epsilon$**  et **IP<sub>3</sub>R3** **augmentent**. Par exemple, ce dernier n'a une augmentation significative qu'à partir de 60 ans. Au contraire, le facteur de transcription **NFATC1**, lui, **augmente de manière significative après 40 ans** mais son expression ne montre cependant **pas de corrélation linéaire** significative avec l'âge.

Enfin, selon la biostatisticienne, l'analyse ayant été faites sur un faible nombre d'individus, l'expression de certains autres gènes n'ayant pas été pour l'instant corrélée au vieillissement **pourrait se révéler significative** sur une plus grande cohorte. Parmi ces gènes, se trouvent les canaux **TRPV1, TRPV6, TRPM2, TRPML3** et **Orai1**, ainsi que le **Grp78**, la **NOS1**, la **p53** et les facteurs de transcription **Sp1, TFAP2 $\gamma$ , CREB1** et **NFATC3**.

Concernant l'évolution de l'expression des marqueurs de différenciation et de sénescence, nous n'avons détecté ni l'expression de la télomérase (TERT), ni celle de Klotho (KL) dans l'épiderme humain et une très faible expression de p16 (CDKN2A). Nous n'avons **pas mis en évidence de variation significative de l'expression de la  $\beta$ -galactosidase (GLB1)** ou de **SHC1** (SHC-Src homology 2 domain containing transforming protein 1) codant les protéines p66, p52 et p46. Par contre nous avons pu mettre en évidence une **augmentation**

de l'expression des marqueurs de différenciation **filaggrine** et **KRT10** ainsi que des régulateurs du cycle cellulaire **p21** et **p53**.

Donc, nos résultats montrent qu'au cours du vieillissement de la peau, il y a une augmentation de l'expression des marqueurs de **l'arrêt du cycle cellulaire** (p21 et p53) accompagnée de celle des **marqueurs de différenciation** des kératinocytes (FLG et KRT10), **d'autophagie** (LC3B), **d'apoptose** (PPAR $\gamma$ ) et de **stress oxydatif** (NOS1, Grp78 et CS) mais **pas des marqueurs de sénescence**.

De plus, certaines voies de signalisation dépendantes du Ca<sup>2+</sup> (NFATC1 et 3, TFAP2 $\gamma$ , Sp1 et CREB1) ainsi que certains canaux perméables au Ca<sup>2+</sup> (TRPV3, IP<sub>3</sub>R1 et 3, MCU, TRPM1, TRMP2, TRPV1, TRPV6, TRPML3 et les protéines du SOCE) et pompes calciques (PMCA4 et SPCA1) semblent être des candidats intéressants à étudier dans le vieillissement de l'épiderme.

	UhPKa		DhPKa		ShPKa	
	Moy Ct	SD	Moy Ct	SD	Moy Ct	SD
TRPC1	28,69	0,81798533	30,32	1,940077318	30,19333333	3,365030956
TRPC3	49,77				36,625	0,176776695
TRPC4	38,57333333	0,188237439	35,62	1,21148669	39,62333333	6,607452863
TRPC5	35,57666667	0,491663842	35,78	1,555024116	37,58666667	2,497084967
TRPC6	34,79333333	2,304350957	41,25	3,921492063	40,44666667	7,809336293
TRPC7	40,34333333	3,967295468	37,51	4,432166513	35,77666667	1,791796119
TRPV1	31,53	0,314801525	30,8	1,52561463	32,89666667	2,107708076
TRPV2	34,08	1,585276001	33,77666667	2,107708076	37,49333333	6,192199394
TRPV3	28,1	0,959218432	28,67333333	1,183061002	29,86333333	3,383139568
TRPV4	31,76333333	0,761730486	33,08666667	0,686464371	34,71333333	2,493919272
TRPV5	39,69666667	1,768879118	39,65	5,535313903	50,14	#DIV/0!
TRPV6	33,62	1,345027881	30,96333333	1,73753657	34,99	3,277300719
TRPA1	36,65333333	1,135796343	36,38333333	1,310737706	38,18333333	3,030583002
TRPM1	43,80333333	4,563730199	44,48		38,64	0,014142136
TRPM2	38,87333333	0,870938191	38,67666667	2,49532229	40,12666667	5,737807363
TRPM3	37,05	0,355527777	39,02	1,390827092	38,44666667	2,770240663
TRPM4	31,19333333	0,398036849	31,28666667	1,059921381	32,61333333	2,643148375
TRPM5	34,36666667	0,837695251	35,16	1,651575006	36,65666667	3,103567839
TRPM6	35,18	0,779679421	39,57666667	9,945573555	34,27	2,167925275
TRPM7	26,46666667	0,335608899	26,76	1,145643924	28,90333333	2,898005061
TRPM8	36,48333333	2,240208324	35,33333333	1,588122581	36,15	1,916350699
MCOLN1	27,69333333	0,081445278	26,24666667	0,932541331	29,76666667	3,465506216
MCOLN2	32,47333333	2,001357872	33,62	2,104732762	32,90666667	2,016936621
MCOLN3	30,67	1,046135746	31,67	1,945481945	33,09333333	3,526135751
PKD1	30,33333333	1,012389912	28,75666667	0,25540817	33,20333333	3,069484213
PKDREJ	35,7	0,935360893	33,81	0,970772888	35,98333333	1,50672935
PKD1L1	39,61	3,060049019	37,67333333	1,20475447		
PKD1L2	35,32666667	0,470141823	35,65	1,440451318	37,94	3,085887231
PKD1L3	34,58333333	0,262741952	37,28666667	1,531578706	36,985	5,692209589
PKD2	27,68333333	0,508166639	29,62	1,497097191	30,19	2,882151974
PKD2L1	39,17	0,680220552	36,9	3,247599113	36,475	0,445477272
PKD2L2	47,285	1,251579003	49,81		37,85	
ORA1	26,99333333	0,568711995	27,78	1,244347218	30,46333333	2,829846875
ORA2	31,01666667	0,285365263	32,37666667	1,225166655	33,77	3,460072254
ORA3	29,48333333	0,648562513	29,27	1,107745458	31,79333333	3,051316656
ATP2B1	27,17333333	0,784176851	27,31666667	1,042704816	29,02666667	2,572281737
ATP2B2	38,31333333	0,662897679	38,94	2,7235822	43,4	3,13287408
ATP2B3	40,09333333	1,934123402	37,91	0,014142136	44,68	
ATP2B4	25,27333333	0,301053705	26,79666667	1,94242975	27,48666667	2,94934456
CASR	35,41	0,088881944	35,79	1,190252074	39,03666667	4,648401159
PANX1	25,51	0,149331845	26,48333333	1,145178298	28,46333333	3,145541819
PANX3	42,76	3,797459677	38,06666667	3,976145537	37,46	
STIM1	26,97	0,503189825	26,79	1,380434714	28,84333333	2,731562434
STIM2	27,11333333	0,531632705	27,3	1,585591372	29,08666667	2,256221029

Table 10A : Analyse transcriptomique par qPCR des kératinocytes primaires adultes indifférenciés (UhPKa), différenciés (DhPKa) ou sénescents (ShPKa). L'intensité de l'expression des gènes est représentée par une « heat map » et inversement proportionnelle au Ct moyen (n=3) représentant le nombre de cycles de PCR avant d'atteindre le seuil de détection. Les gènes écrits en rouge ont un Ct moyen > 35 *in vivo*.

ATP2A2	23,11	0,381575681	23,44	1,320113631	25,42666667	2,606958637
ATP2A3	32,28666667	0,085049005	35,37666667	2,229491721	34,70666667	3,392378713
RYR1	30,20333333	0,549939391	28,78333333	0,987640285	32,94666667	2,140007788
RYR2	42,80333333	1,112669463	39,255	3,189051583	39,76666667	3,746482795
RYR3	30,91	0,531130869	30,80333333	0,544548743	32,30333333	1,651706189
ITPR1	31,20666667	0,640104158	30,61333333	1,385291786	32,4	2,492408474
ITPR3	25,49666667	0,714516153	26,46666667	1,079830234	27,20333333	2,842838957
HSPA5	26,22333333	0,056862407	26,74666667	0,508166639	29,27	2,281644144
MCU	26,46666667	0,34961884	27,40333333	1,016874296	28,76333333	2,229132866
CS	23,86333333	0,449592408	24,15666667	0,947751726	26,77666667	2,802076611
SOD2	24,79333333	0,487476495	24,58333333	1,366064908	25,63	1,950487119
ATP2C1	25,01333333	0,316596483	26,1	1,645478654	26,71666667	2,565274514
SQSTM1	23,64333333	0,610682678	22,1	0,95	24,75	3,123907809
MAP1LC3B	24,89666667	0,931790391	23,63	0,591016074	25,61666667	2,865263222
BCL2	32,77666667	0,785641988	33,91333333	1,436674401	37,26333333	2,269412552
NOS1	27,61666667	0,070237692	30,83666667	1,655425424	30,67333333	2,900005747
NOS3	40,07	0,896046874	41,46666667	4,246414174	43,02333333	6,226992318
KL	41,46	0,655743852	38,74	1,393879478	37,935	1,97282792
SHC1	24,87	0,514490039	25,15	1,005037313	25,93666667	2,768399056
TERT	37,36333333	0,678552381	38,15666667	2,57692323	41,50666667	4,868206377
GLB1	26,39	0,310483494	27,19	1,562401997	28,90666667	3,560510263
CDKN1A	23,22	0,177763888	20,65333333	1,421700859	23,62666667	2,415291563
CDKN2A	27,03666667	1,936551919	26,90666667	1,903925769	25,94	2,679048338
PCNA	23,40333333	0,420634441	25,36333333	0,792106895	27,50333333	1,793441756
FLG	30,01	0,995188424	28,20666667	1,798619841	30,23	1,755192297
KRT10	33,92	3,710040431	22,08333333	2,193771486	33,95666667	4,095855629
KRT5	17,77666667	0,832846524	18,36333333	1,485608742	20,18333333	2,486007509
CASP3	26,58333333	0,174737899	27,87	1,179109834	28,55333333	2,930022753
RB1	26,33333333	0,430038758	27,24333333	1,310813996	28,88333333	3,108220284
TP53	25,91	0,941222609	25,55	1,470408107	27,97	3,215104975
SP1	26,42666667	0,361155553	26,01666667	0,940443158	29,46333333	2,877330939
JUN	27,35	0,66053009	26,62333333	1,531088937	29,37	3,769920424
JUND	27,32	0,797307971	25,52333333	0,887937686	29,50333333	2,23034377
TFAP2A	24,31	0,485901225	23,85333333	1,411181538	26,12	2,30774782
TFAP2C	27,05	0,720208303	26,78666667	1,471371243	30,88333333	2,216085137
TFAP2E	31,34666667	0,505601951	31,62666667	0,631374163	33,8	2,034428667
CREB1	26,28333333	0,267644042	26,91666667	1,19692662	28,57666667	2,122317915
NFATC1	28,75	1,499633289	29,56333333	1,804836096	30,46333333	3,170967255
NFATC2	37,10666667	1,052916584	33,39	2,385099579	38,83666667	1,805833141
NFATC3	26,73	0,663023378	26,41	1,051047097	30,21333333	2,814255378
AKT1	25,47333333	0,587054796	26,85333333	1,102784355	28,38	2,818563464
MTOR	27,05666667	0,843346508	27,74	0,616522506	29,52	2,383715587
PPARG	33,25	0,320468407	29,99333333	1,616302364	31,22	1,13137085
ADCY10	35,85	1,077636302	34,32333333	0,949438431	38,06333333	5,658880926
TMEM158	26,25	0,421544778	28,09	0,800749649	28,25666667	3,132224981

Table 10B : Analyse transcriptomique par qPCR des kératinocytes primaires adultes indifférenciés (UhPKa), différenciés (DhPKa) ou sénescents (ShPKa). L'intensité de l'expression des gènes est représentée par une « heat map » et inversement proportionnelle au C<sub>t</sub> moyen (n=3). Les gènes écrits en rouge ont un C<sub>t</sub> moyen > 35 *in vivo*.

## C. Détermination de l'expression génique des acteurs de l'homéostasie calcique dans les kératinocytes indifférenciés, différenciés ou sénescents

Nous avons alors voulu savoir à quel processus sont liés les différents gènes dont l'expression est corrélée au vieillissement. Pour ce faire, l'expression de ces mêmes gènes a été comparée dans les kératinocytes primaires adultes maintenus *in vitro* à l'état indifférencié (UhPKa), différencié (DhPKa) ou sénescents (ShPKa).

Le [tableau 10 A](#) montre que certains « canaux » sont bien **exprimés** dans l'épiderme et les kératinocytes *in vitro* **quelques soient les conditions** : TRPC1, TRPV1, 3, 4, 6, TRPM4 et 7, TRPML1-3, TRPP1 et 2, Orai1 et 3, Stim1 et 2, PMCA1 et 4, SERCA2, SPCA1, pannexine1, RyR1 et 3, IP<sub>3</sub>R1 et 3, Grp78 et MCU.

D'autres protéines analysées sont **exprimées dans l'épiderme mais pas dans toutes les conditions de culture des kératinocytes**. Par exemple TRPC6 est détecté dans l'épiderme mais, *in vitro*, il n'est suffisamment exprimé que dans les UhPKa tout comme NFATc2 dans les DhPKa ou PKDREJ et TRPV2 qui ne sont plus détectables avant le seuil dans les DhPKa ou les ShPKa respectivement.

Au contraire l'expression d'autres canaux est **détectable *in vitro* alors qu'elle ne l'était pas *in vivo***. Il s'agit de l'expression du canal Orai2 qui est détectable dans toutes les conditions *in vitro* mais dépasse le seuil limite de détection dans l'épiderme un peu après 35 cycle de PCR (35,15 ± 1,42), de PPAR $\gamma$  (35,49 ± 1,96) et de p16 (35,20 ± 2,20).

Quant aux canaux TRPM1 et TRPM2 **détectés dans l'épiderme** ils ne le sont dans **aucune des conditions testées *in vitro***.

Enfin, tout comme dans l'épiderme, certains gènes ne sont également pas détectés dans les kératinocytes *in vitro* quelque soit la condition: TRPC3, 4, 5 et 7, TRPV5, TRPA1, TRPM3 et 8, PKD1L1, 2, PKD2L1, 2, PMCA2, 3, CaSR, Pannexine3, RyR2, NOS3, Klotho et TERT.

Régulation génique (Relative à UhPKa)									
Gènes	DhPKa		ShPKa		Gènes	DhPKa		ShPKa	
	A/D	p-value	A/D	p-value		A/D	p-value	A/D	p-value
TRPC1	-1,3891	0,66409	2,2384	0,22013	CS	1,8182	<b>0,02435</b>	-1,1871	0,73886
TRPC4	2,6132	0,25266	<b>6,3459</b>	0,24932	SOD2	2,5773	<b>0,0303</b>	3,5533	<b>0,04659</b>
TRPC5	2,662	<b>0,11118</b>	6,4049	<b>0,14861</b>	ATP2C1	1,0491	0,70957	1,9487	<b>0,01687</b>
TRPC6	1,1401	0,93218	3,6786	0,2957	SQSTM1	6,4943	<b>0,00094</b>	2,9468	0,15278
TRPV1	3,6957	<b>0,01818</b>	2,4609	<b>0,00532</b>	LC3B	5,361	<b>0,09659</b>	3,8526	<b>0,09007</b>
TRPV2	3,0018	0,31433	5,853	<b>0,13207</b>	BCL2	1,156	0,82139	1,359	0,43963
TRPV3	1,4974	0,47457	1,8693	0,32463	NOS1	-4,1819	<b>0,00098</b>	-1,3112	0,32112
TRPV4	-1,1231	0,98419	1,4036	0,49899	KL	2,2281	0,18405	<b>6,3459</b>	0,24932
TRPV6	<b>14,05</b>	<b>0,06642</b>	5,499	0,22564	SHC1	1,8351	<b>0,03579</b>	3,0297	<b>0,06236</b>
TRPM4	2,0885	<b>0,0881</b>	2,3716	<b>0,05252</b>	TERT	2,2281	0,18405	<b>6,3459</b>	0,24932
TRPM5	2,0646	0,16985	<b>6,273</b>	0,21277	GLB1	1,2797	0,41723	1,1089	0,59365
TRPM6	4,1387	0,15234	<b>13,2615</b>	<b>0,06206</b>	CDKN1A	<b>13,2003</b>	<b>0,0426</b>	4,7871	<b>0,00368</b>
TRPM7	1,8182	<b>0,01829</b>	1,1722	0,54534	CDKN2A	2,4382	0,4706	<b>13,5714</b>	<b>0,00694</b>
TRPML1	6,0734	<b>0,01358</b>	1,5079	0,39681	PCNA	-1,7461	<b>0,08243</b>	-2,7023	0,20732
TRPML2	1,1166	0,78052	<b>4,6995</b>	0,24829	FLG	7,7767	<b>0,07568</b>	5,4484	0,16715
TRPML3	1,1141	0,80055	1,3372	0,48116	KRT10	<b>4993,492</b>	<b>0,13018</b>	<b>7,7588</b>	0,38681
PKD1	6,6461	<b>0,05488</b>	1,0811	0,97438	KRT5	1,4837	0,46982	1,1968	0,81572
PKD2	-1,7181	0,19365	1,1166	0,72035	CASP3	-1,0949	0,51684	1,6198	<b>0,14123</b>
ORAI1	1,2916	0,43783	-1,7461	0,30525	RB1	1,1858	0,54299	1,0836	0,69435
ORAI2	-1,152	0,54613	1,4331	0,3014	TP53	2,8596	<b>0,06586</b>	1,5219	0,50584
ORAI3	2,5832	<b>0,00532</b>	1,2797	0,49577	SP1	2,9605	<b>0,00133</b>	-1,2931	0,46723
ATP2B1	2,0174	0,15191	1,7563	0,18515	JUN	3,6871	<b>0,0266</b>	1,5646	0,44006
ATP2B4	-1,2901	0,87793	1,3684	0,30774	JUND	7,7409	<b>0,00051</b>	1,3972	0,49763
CASR	2,3881	<b>0,14709</b>	<b>6,3459</b>	0,24932	TFAP2A	3,0578	<b>0,01684</b>	1,8098	<b>0,03141</b>
PANX1	1,1348	0,22148	-1,2205	0,8828	TFAP2C	2,6743	<b>0,04436</b>	-2,2462	<b>0,1194</b>
STIM1	2,5242	<b>0,02207</b>	1,7321	<b>0,11651</b>	TFAP2E	1,8351	0,24697	1,2797	0,50778
STIM2	1,9577	0,17106	1,6161	0,16751	CREB1	1,4364	<b>0,0798</b>	1,2946	0,15245
PKD2	-1,7181	0,19365	1,1166	0,72035	NFATC1	1,268	0,87258	2,1352	<b>0,12109</b>
ATP2A2	1,7726	<b>0,06047</b>	1,2738	0,40012	NFATC2	7,9585	<b>0,10019</b>	<b>6,3459</b>	0,24932
ATP2A3	-1,8845	<b>0,01437</b>	2,5594	<b>0,11957</b>	NFATC3	2,7814	<b>0,00745</b>	-1,7623	<b>0,07115</b>
RYR1	5,9622	<b>0,00018</b>	1,0041	0,98375	AKT1	-1,1681	0,51077	-1,1817	0,65982
RYR3	2,3991	<b>0,07614</b>	2,4158	<b>0,09268</b>	MTOR	1,3875	0,5152	1,1507	0,82568
ITPR1	3,3616	<b>0,06613</b>	2,8729	<b>0,09748</b>	PPARG	<b>21,2958</b>	<b>0,0432</b>	<b>10,8215</b>	<b>0,02015</b>
ITPR3	1,1375	0,75302	1,9442	0,18292	ADCY10	3,2546	<b>0,13723</b>	<b>6,8329</b>	0,23712
HSPA5	1,5502	0,31189	-1,3021	<b>0,05368</b>	TMEM158	-1,6068	<b>0,13031</b>	1,5792	0,39552
MCU	1,1641	0,51652	1,2916	0,19483					

Table 11: Analyse transcriptomique par qPCR de l'expression des acteurs de l'homéostasie calcique dans des kératinocytes primaires adultes différenciés (DhPKa) et sénescents (ShPKa) par rapport aux kératinocytes primaires adultes indifférenciés (UhPKa). L'intensité de variation d'expression des différents gènes est représentée par une « heat map » proportionnelle à l'intensité de couleur (bleu pour une diminution et rouge pour une augmentation). Test statistique du t-Student, n=3,  $p < 0,15$  et  $p < 0,05$ .

Cette expérience nous a également permis de discriminer les gènes impliqués dans la différenciation ou la sénescence répllicative des kératinocytes (Tableau 11).

Il ressort des résultats que l'expression de **33%** des gènes testés varie uniquement au cours de la **différenciation** des kératinocytes contre **7,6%** au cours de la **sénescence** répllicative et **17%** qui varie à la fois dans la **différenciation et la sénescence** des kératinocytes primaires humains.

Dans les **DhPKa**, nous avons constaté l'**augmentation** d'expression (avec 95% de fiabilité, **p<0,05**) pour les gènes **JunD** (7,74 fois), **SQSTM1** (6,49 fois), **TRPML1** (6,07 fois), **RyR1** (5,91 fois), **Jun** (3,69 fois), **TFAP2α** (3,06 fois), **SP1** (2,96 fois), **NFATc3** (2,78 fois), **Orai3** (2,58 fois), **Stim1** (2,52 fois), **SHC1** (1,84 fois), **TRPM7** (1,82 fois) et **CS** (1,81 fois). Cependant, d'autres gènes voient leur expression augmenter avec la différenciation des kératinocytes (avec 85% de fiabilité, **p<0,15**) et notamment **TRPV6** (14,05 fois), **NFATc2** (7,96 fois), **FLG** (7,78 fois), **TRPP1** (6,64 fois), **KRT10** (4,99 fois), **ADCY10** (3,25 fois), **p53** (2,86), **TRPC5** (2,66 fois) et **CaSR** (2,38 fois). Seul le gène de **NOS1** diminue significativement avec la différenciation des kératinocytes (-4,18 fois, p<0,05).

Dans les **ShPKa**, les gènes dont l'expression **augmente** sont moins nombreux surtout avec une fiabilité de 95% puisque **CDKN2A** (13,57 fois) et **SPCA1** (1,95 fois) en sont les seuls représentant alors qu'avec une fiabilité de 85% nous pouvons ajouter à cette liste les gènes suivants : **TRPM6** (13,26 fois), **TRPV2** (5,83 fois) et **NFATc1** (2,13 fois).

Enfin, l'expression de nombreux autres gènes changent à la fois dans la **différenciation et dans la sénescence répllicative** des kératinocytes mais avec plus ou moins d'importance ou de fiabilité dans l'un des deux processus. Ainsi, l'expression des gènes codant pour les canaux **IP<sub>3</sub>R1**, **RyR3** et **TRPM4** **augmente** mais ils semblent être aussi importants pour la différenciation que pour la sénescence alors que d'autres interviennent visiblement d'avantage dans la différenciation. C'est le cas du gène de **PPARγ** qui augmente 21,29 fois dans les DhPKa contre 10,82 fois dans les ShPKa, celui de **p21** (13,2 fois contre 4,79), de **LC3B** (5,36 fois contre 3,85) ou encore de **TRPV1** (3,69 fois contre 2,46). Au contraire, l'expression de **SHC1** et **SOD2** augmente d'une manière plus importante dans les ShPKa (respectivement 3,03 fois et 3,53 fois) que dans les DhPKa (respectivement 1,84 fois et 2,57 fois). Deux gènes sont particulièrement intéressants dans cette étude, à savoir **TFAP2γ** dont l'expression **augmente dans les DhPKa** (2,67 fois) alors qu'elle **diminue dans les ShPKa** (-2,25 fois) et le gène **ATP2A3** dont l'expression **diminue dans les DhPKa** (-1,88 fois) alors qu'elle **augmente dans les ShPKa** (2,56 fois).



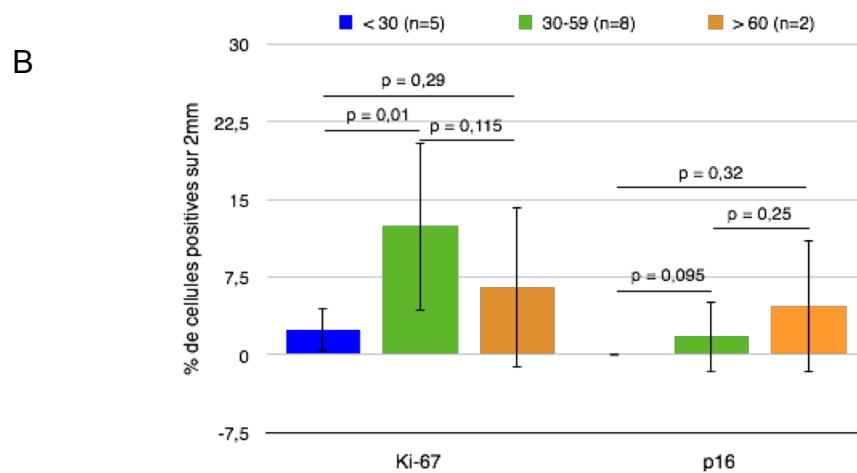
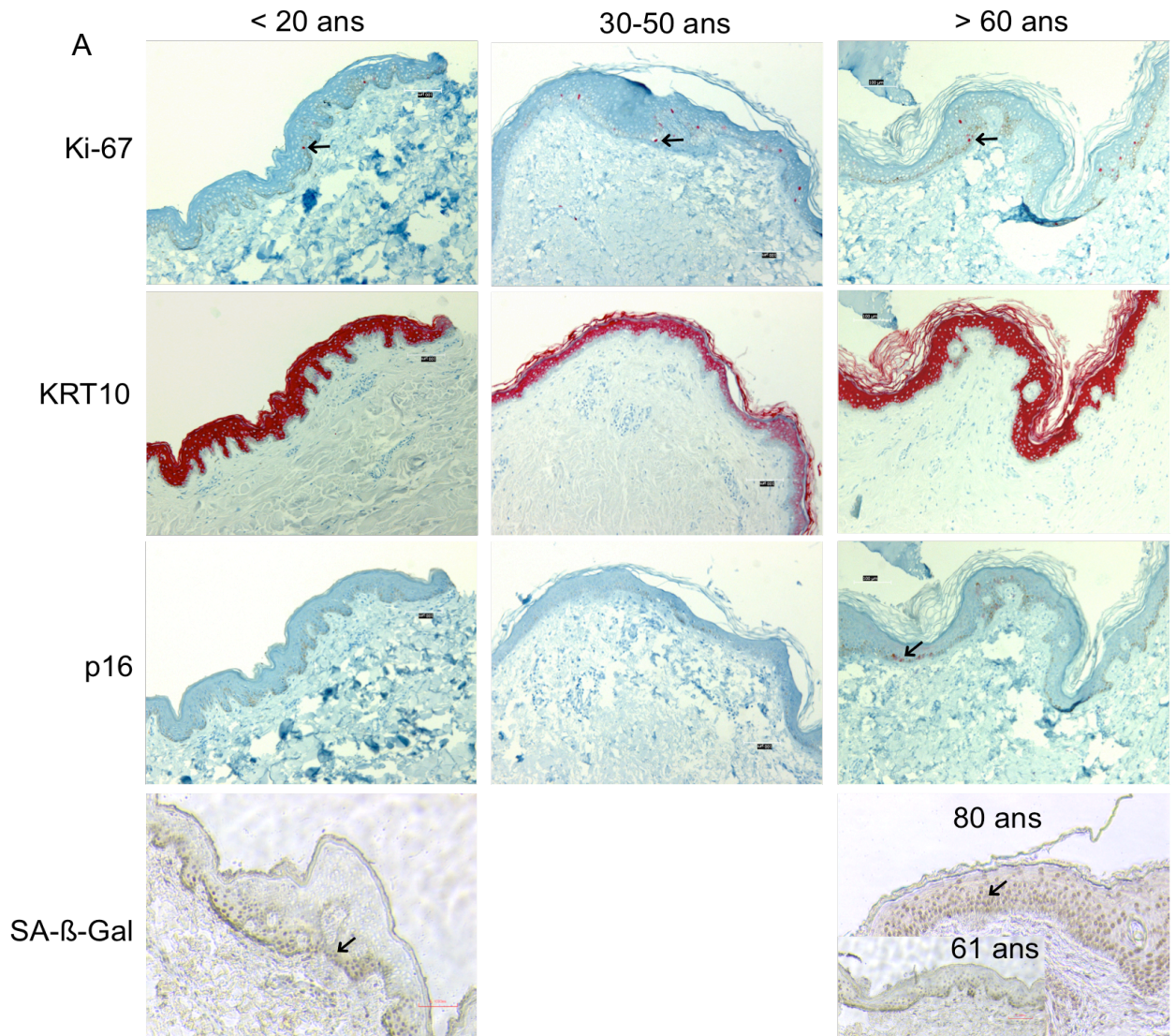


Figure 55 : A- Images représentatives des colorations, par immunohistochimie classique, des marqueurs de prolifération Ki-67, de différenciation cytokératine 10 (KRT10) et de sénescence SA-β-Galactosidase, p16 sur de l'épiderme humain. B- Diagramme en barres du pourcentage de cellules positives sur 2 mm d'épiderme pour le Ki-67 et la p16. Groupes de moins de 20 ans (n=3), de 30-50 ans (n=3) ou de plus de 60 ans (n=3). Valeur-p calculées par le test statistique t-Student.

## D. Caractérisation immunohistochimique du vieillissement de l'épiderme humain

Les analyses immunohistochimiques de l'épiderme humain (Fig.55) que nous avons réalisées montrent généralement une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme entre 20 et 50 ans pour ensuite s'amincir à nouveau après 60 ans. Il y a bien une perte progressive des papilles dermiques et l'utilisation du marqueur de différenciation KRT10 nous permet d'observer un épaissement de la couche cornée au cours du vieillissement de l'épiderme. Cependant, nous avons aussi constaté une augmentation significative (Fig.55 A,  $p < 0,05$ ) du nombre de cellules en prolifération (positives à Ki-67) de 20 à 50 ans suivie d'une nouvelle tendance des cellules basales à moins proliférer. Après 60 ans, quelques cellules positives pour p16 apparaissent et il y a une légère augmentation du nombre de cellules positives pour la  $\beta$ -galactosidase. Cette dernière est bien plus flagrante dans l'épiderme d'une patiente de 80 ans, avec les cellules sénescents qui ne sont plus confinées dans la couche basale.

Pour éviter tout problème de faux positifs, nous n'avons pas utilisé le chromogène marron DAB (tétrahydrochlorure de 3,3' diaminobenzidine) mais plutôt la phosphatase alcaline dont la couleur rouge des cellules positives (indiquées par une flèche noire) ne peut être confondue avec les pigments de mélanines marrons, il faudra donc recommencer le marquage à la  $\beta$ -Galactosidase et de manière général augmenter les effectifs surtout pour le groupe des sexagénaires et plus.

## E. Modification des stocks et entrées calciques dans les kératinocytes primaires humains en sénescence

Connaissant l'importance du  $\text{Ca}^{2+}$  et des canaux TRPs et Orai dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes, nous nous sommes intéressés aux contenus des stocks calciques mitochondriaux et réticulaires ainsi qu'aux entrées de  $\text{Ca}^{2+}$  constitutive et capacitive (SOCE) dans les kératinocytes prolifératifs (UhPKa), en début de sénescence répllicative (ShPKa early) ou au niveau du plateau de sénescence répllicative (ShPKa late). Nous avons tout d'abord analysé l'**entrée constitutive** en utilisant le protocole de «  $\text{Ca}^{2+}$ -switch », c'est-à-dire en ajoutant simplement, sans autre stimulation, une solution de chlorure de calcium à une concentration finale de 1,7 mM dans une solution HBSS contenant initialement 0,07  $\mu\text{M}$  de calcium. Les premiers résultats étaient très variables selon la confluence cellulaire. En effet, l'existence de contacts intercellulaires provoque une entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les UhPKa supérieure à celle observée dans les kératinocytes différenciés après 24H de stimulation par le  $\text{Ca}^{2+}$  (DhPKa early) (Fig.56 B) qui est probablement due à l'augmentation d'expression du canal TRPV6 (données de qPCR non présentées). Ensuite, après 6 jours de différenciation par le  $\text{Ca}^{2+}$ , l'amplitude de l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  diminue (DhPKa late) (Fig.56 B).

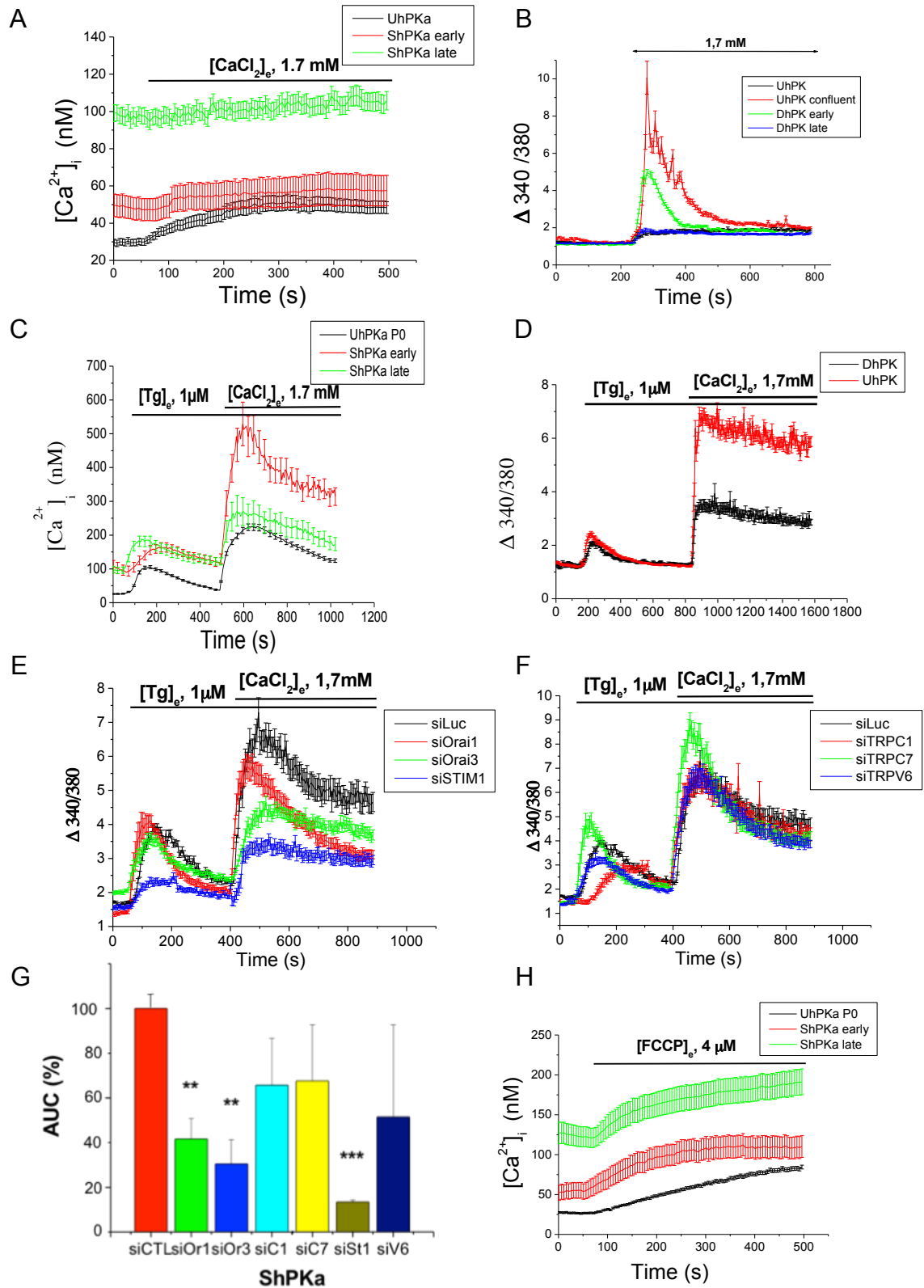


Figure 56: Entrée constitutive (A et B), vidange réticulaire et entrée capacitive (C et D), vidange mitochondriale (B) dans les kératinocytes en prolifération (UhPKa), en début de sénescence (ShPKa early) ou en phase plateau de sénescence (ShPKa late) et canaux impliqués dans l'entrée capacitive des ShPKa. Test du t-Student, n=3, \*\*-p<0,01, \*\*\*-p<0,001.

Pour étudier l'entrée constitutive dans les kératinocytes, il faut donc prêter une grande attention à la densité des cellules analysées. Suite à ces observations, nous avons montré que l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig.56 A) est très faible dans les UhPKa en prolifération et n'augmente pas au cours de la sénescence mais il est clair que le taux basal de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules augmente de 1.7 fois, en début de sénescence, à 3.3 fois, en phase plateau de sénescence.

L'**entrée SOCE** est provoquée *in vitro* par ajout, dans le milieu HBSS pauvre en  $\text{Ca}^{2+}$ , de thapsigargine 1 $\mu\text{M}$ , un inhibiteur irréversible des ATPases réticulaires SERCA, provoquant alors une vidange « passive » du  $\text{Ca}^{2+}$  réticulaire par les canaux de fuite. La première augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  visualisée sur les enregistrements (Fig.56 C-F) représente donc cette vidange. La diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  dans le RE est alors détectée par les protéines Stim qui activent les canaux SOC. La seconde augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique visible sur les enregistrements (Fig.56 C-F) est due à l'entrée de calcium par les canaux SOC, activés par les Stim, et consécutive à l'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu HBSS (1,7 mM). Cependant, ce protocole tient également compte de l'entrée constitutive de  $\text{Ca}^{2+}$  lors du « calcium-switch ». Or, selon la Fig.56 D, malgré le fait que l'entrée constitutive soit bien supérieure dans les DhPKa par rapport aux UhPKa prolifératifs (Fig.56 B), celle-ci est négligeable par rapport à l'entrée SOCE qui est deux fois plus importante dans les UhPKa que dans les DhPKa. Ce protocole nous a ensuite permis de mettre en évidence une augmentation de l'entrée SOCE dans les kératinocytes en début de sénescence qui retombe ensuite (ShPKa late) au niveau de celle des UhPKa (Fig.56 C). Nous avons encore vu une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  cytoplasmique basale au cours de la sénescence mais pas de modification du stock calcique dans RE (Fig.56 C). En utilisant des siRNA dirigés contre les principaux canaux SOC connus et d'autres canaux TRPs, nous avons montré que le SOCE des ShPKa passe principalement par les canaux Orai1 et Orai3 activés par Stim1 (Fig.56 E et G) tandis qu'une diminution de l'expression des canaux TRPC1, TRPC7 et TRPV6 n'a pas d'effet sur l'amplitude du SOCE (Fig.56 F et G).

Le FCCP (ou carbonilcyanide p-triflourométhoxyphénylhydrazone) est un ionophore protonique induisant un découplage de la membrane interne mitochondriale et une **vidange du calcium mitochondrial**. La vidange induite par le FCCP dans les ShPKa est supérieure à celle des UhPKa (Fig.56 H) bien qu'elle soit toujours bien inférieure à celle d'autres cellules comes les cellules cancéreuses prostatiques LNCaP.

# CONCLUSION

Tout d'abord, nous avons montré que **70.8%** des gènes dont l'expression a été corrélée au **vieillessement** sont également impliqués dans la **sénescence ou la différenciation** des kératinocytes (Fig.57). Les autres gènes jouent donc probablement un rôle dans **d'autres processus** comme la prolifération, la migration, la pigmentation ou encore l'inflammation. Il s'agit des canaux **Orai1**, **TRPV3**, **MCU**, de l'ATPase calcique membranaire **PMCA4**, de la chaperonine **grp78**, ainsi que des facteurs de transcription **pRB** et **AP-2 $\epsilon$**  dont l'expression **augmente** avec le vieillissement alors que l'expression des canaux **TRPV1**, **TRPM1** et **2**, **TRPML1** et **RyR3** **diminue** avec le vieillissement.

Les gènes codant **Stim1**, **2**, **TRPV6**, la **citrate synthase** et la **fillaggrine** voient leur expression **augmenter** au cours de la **différenciation** induite par le calcium et du **vieillessement** tandis que l'augmentation de l'expression de la **SPCA1** est commune au **vieillessement** et à la **sénescence réplivative**. En ce qui concerne les **récepteurs à l'InsP<sub>3</sub>**, les membres numéros **1** et **3** **augmentent** avec le **vieillessement**. Tandis que **IP3R1** est impliqué à la fois dans la **différenciation** et la **sénescence in vitro**, **IP3R3** serait plutôt impliqué dans la **sénescence uniquement**. L'augmentation d'expression des **p21** et **LC3B** est commune au **vieillessement** de l'épiderme *in vivo*, à la **différenciation** et à la **sénescence** des kératinocytes *in vitro*.

Finalement, seul **8,3%** des gènes dont l'expression est corrélée au **vieillessement** de l'épiderme sont aussi impliqués dans la **sénescence** des kératinocytes *in vitro* contre **20,8%** qui le sont également dans la **différenciation** uniquement.

Nous avons notamment constaté une **augmentation** d'expression du canal SOC **Orai1** lors du **vieillessement** de l'épiderme ainsi que lors des passages successifs *in vitro* avant que les cellules n'entrent en **sénescence**. Or, ce canal est impliqué dans le SOC des UHPKa dont il active la prolifération et la migration basale ou induite par l'EGF. En effet, l'EGF stimule la PLC $\gamma$  induisant alors la vidange du RE par l'IP3 ce qui déclenche le SOCE dans les jeunes kératinocytes (étudiés après le 1er passage P1 uniquement) indifférenciés. Ensuite, l'entrée de Ca<sup>2+</sup> active la PKC $\beta$  et la calpaïne, toutes deux à l'origine du renouvellement des adhésions focales via la phosphorylation et le clivage de FAK respectivement. Puis, une fois que les cellules sont au plateau de sénescence, le SOCE diminue par rapport aux jeunes cellules prolifératives (P1) mais Orai1 y participe toujours avec Orai3 cette fois. L'augmentation du SOCE lors du vieillissement cellulaire est accompagnée d'une augmentation du niveau basal cytoplasmique de Ca<sup>2+</sup> qui est maintenu dans les cellules sénescents connaissant également une augmentation du stock calcique mitochondrial mais pas d'augmentation de l'entrée constitutive de Ca<sup>2+</sup> typique des cellules capables d'entrer en différenciation.

De plus, d'un point de vue histologique, la quantité de cellules sénescents n'augmente de manière conséquente que tardivement, soit après 60 ans, alors que le nombre de kératinocytes en prolifération augmente de 18 à 60 ans tout comme l'épaisseur de l'épiderme qui conserve une couche différenciée mais dont la couche cornée se désolidarise. En effet, ce n'est qu'à partir de 60 ans que certains kératinocytes sont positifs pour le marqueur p16 et vers 80 ans que le nombre de kératinocytes positifs pour la  $\beta$ -galactosidase augmente de manière dramatique.

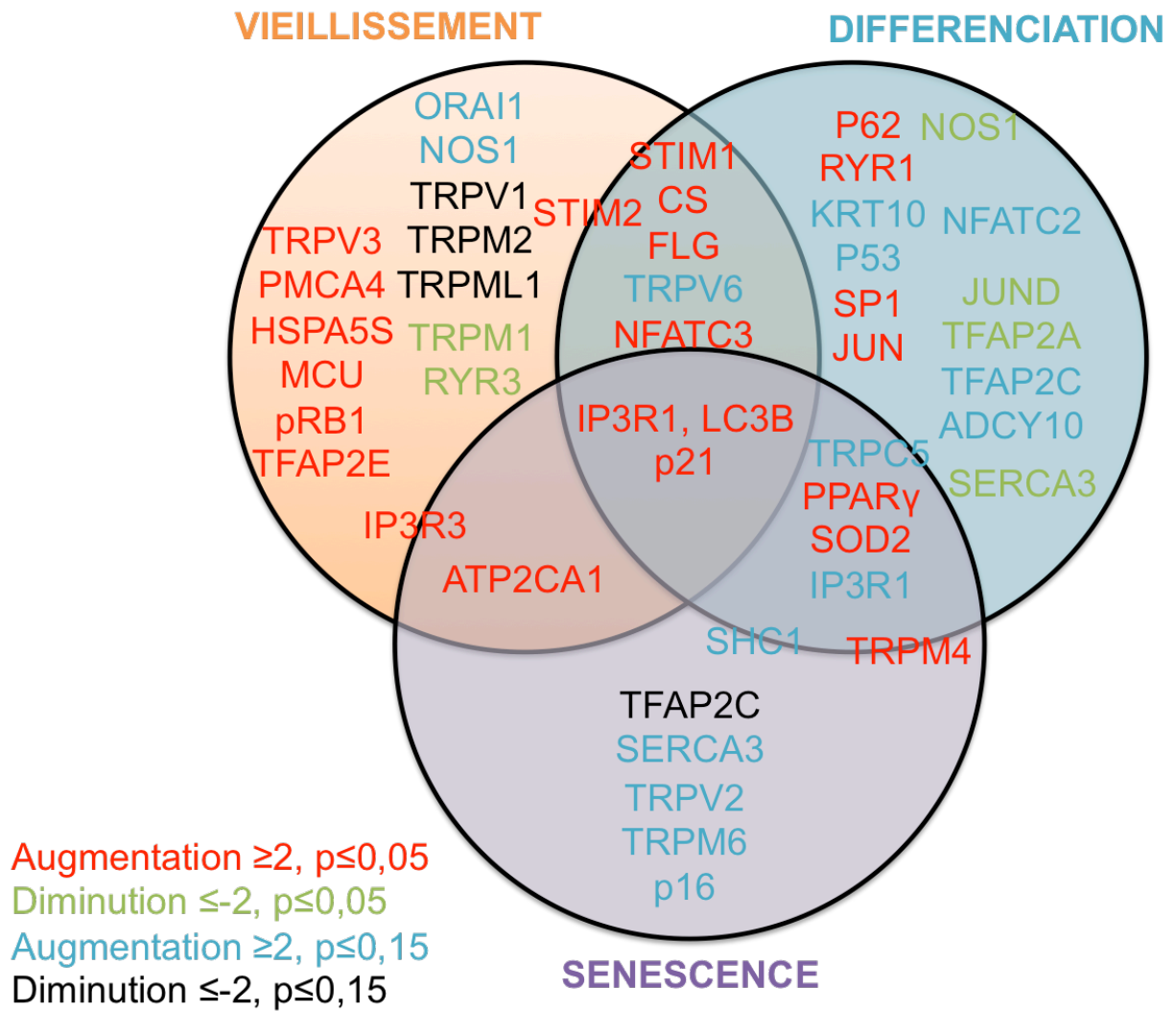


Figure 57: Diagramme de conclusion résumant les différents gènes impliqués dans le vieillissement de l'épiderme *in vivo* (n=20), dans la différenciation induite par le calcium et dans la sénescence répliquative des hPKa *in vitro* (n=3).

Donc, ces résultats indiquent que le vieillissement de l'épiderme humain entre 18 et 60 ans est caractérisé par:

- une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la différenciation,
- une augmentation de l'expression du canal Orai1 exprimé uniquement dans les kératinocytes indifférenciés sur lesquels il exerce un effet pro-prolifératif et participe au renouvellement des adhésions focales lors de la migration polarisée,
- une augmentation du nombre de cellules prolifératives et un maintien de la couche différenciée dans le tissu,
- peu d'effet sur l'expression des gènes impliqués dans la sénescence répllicative des kératinocytes.

Finalement, l'expression des marqueurs de sénescence ne change pas significativement avant 70 ans et le nombre de kératinocytes sénescents dans l'épiderme n'augmente qu'après 60 ans parallèlement à la diminution du nombre de cellules prolifératives. Ainsi, la sénescence en temps que telle semble intervenir tardivement dans le vieillissement de l'épiderme humain.



# DISCUSSION

Grâce à ces analyses transcriptomiques, nous avons pu mettre en évidence le ou les rôles que jouent les différents acteurs de la signalisation calcique dans la différenciation, la sénescence des kératinocytes mais plus généralement dans le vieillissement de l'épiderme. La comparaison de nos données avec les connaissances actuelles permet de mieux comprendre nos résultats et l'implication dans le vieillissement de l'épiderme de certains gènes qui ne sont impliqués ni dans la différenciation des kératinocytes, ni dans leur sénescence intrinsèque. Cependant, elle se révèle aussi parfois plus complexe qu'attendue.

## I. Expression des canaux et pompes calciques dans l'épiderme humain

L'expression des canaux TRP dans la peau humaine a été étudiée par plusieurs équipes ([Tableau 3](#)) ayant travaillé sur les kératinocytes primaires d'origine néonatale (hPKn), gingivale (hGK), psoriasique (Pso), la lignée de kératinocytes spontanément immortalisés HaCaT ou encore l'épiderme au niveau de lésions cancéreuses SCC de différents grades.

Ainsi, l'étude de K. Leuner en 2011 a détecté l'expression de tous les canaux **TRPCs** dans l'épiderme humain sain et les kératinocytes primaires adultes (hPKa) (Leuner et al., 2011). Or, dans notre analyse, seul TRPC1 est aussi bien exprimé dans l'épiderme que dans les kératinocytes primaires adultes. Nous avons également détecté celle de TRPC6 dans l'épiderme et dans les UhPKa ( $C_i$  moy 34,79±2,30) mais elle diminue dans les DhPKa et ShPKa. Nous ne détectons une expression suffisante de TRPC4 et TRPC7 que dans les DhPKa ( $C_i$  moy 35,62±1,21 et 37,51±4,432) et ShPKa pour TRPC7 ( $C_i$  moy 35,77±1,79).

Les canaux thermosensibles **TRPVs** sont tous bien exprimés dans l'épiderme humain et les kératinocytes *in vitro* à l'exception de TRPV5 ([Tableau 3](#)). Cependant, d'après nos résultats, TRPV2 n'est plus détecté dans les ShPKa ( $C_i$  moy 37,49±6,19).

Nous n'avons pas non plus détecté TRPA1 dans l'épiderme humain mais il semble pourtant exprimé faiblement dans les UhPKa (36,65±1,13) et DhPKa (36,38±1,31). Dans la littérature, son expression a pourtant été démontrée dans l'épiderme, en particulier dans les mélanocytes (Oehler et al., 2012), dans les neurones somatosensoriels peptidergiques (Ross et al., 2014) et sa détection est plus flagrante dans les lésions épidermiques de kératoses actiniques, dues à l'exposition aux UVs (Fusi et al., 2014).

	Epiderme adulte	hPK adulte	Littérature
TRPC1	✓	✓	hPKn <sup>1</sup> , hGK <sup>4, 5</sup> , hPKa <sup>6</sup> , Pso <sup>6</sup> , HaCaT <sup>8, 27</sup>
TRPC3	≈	≈ ShPKa	hPKn <sup>1</sup> , hPKa <sup>6</sup> , Pso <sup>6</sup>
TRPC4		≈ DhPKa	hPKn <sup>1</sup> , hPKa <sup>6</sup> , Pso <sup>6</sup> , hGK <sup>7</sup> , HaCaT <sup>8, 27</sup>
TRPC5	≈	≈	hGK <sup>4</sup> , hPKa <sup>6</sup> , Pso <sup>6</sup> , HaCaT <sup>27</sup>
TRPC6	✓	UhPKa	hPKn <sup>1</sup> , ESCC <sup>2</sup> , hGK <sup>4</sup> , hPKa <sup>6, 8</sup> , HaCaT <sup>6</sup> , Epiderme <sup>6</sup> , Pso <sup>6</sup>
TRPC7		≈ D/ShPKa	hGK <sup>4</sup> , hPKa <sup>6</sup> , Pso <sup>6</sup> , HaCaT <sup>9, 27</sup>
TRPV1	✓	✓	Epiderme <sup>10, 12, 19, 20, 21, 23</sup> , hPKn <sup>11</sup> , DhPKa <sup>13</sup> , Mélanocytes <sup>18</sup>
TRPV2	✓	≈	Epiderme <sup>19, 20, 21, 23</sup>
TRPV3	✓	✓	DhPKa <sup>13</sup> , Epiderme <sup>19, 20, 21, 23</sup>
TRPV4	✓	✓	DhPKa <sup>13</sup> , épiderme <sup>14, 23</sup> , HaCaT <sup>19</sup>
TRPV5			
TRPV6	✓	✓	hPKa <sup>15, 22</sup> , HaCaT <sup>15</sup>
TRPA1		≈	Mélanocytes <sup>18</sup> , Epiderme <sup>20</sup>
TRPM1	✓		Mélanocytes <sup>18</sup>
TRPM2	✓		Mélanocytes <sup>18</sup>
TRPM3			
TRPM4	✓	✓	
TRPM5	≈	≈ U/ShPKa	
TRPM6	≈	≈ U/ShPKa	
TRPM7	✓	✓	Mélanocytes <sup>18</sup>
TRPM8		≈	Mélanocytes <sup>18, 24</sup>
MCOLN1	✓	✓	
MCOLN2	✓	✓	
MCOLN3	✓	✓	Mélanocytes <sup>18</sup>
PKD1	✓	✓	
PKDREJ	✓	≈	
PKD1L1			
PKD1L2		≈	
PKD1L3		≈	
PKD2	✓	✓	
PKD2L1		≈ D/ShPKa	
PKD2L2			
ORAI1	✓	✓	HaCaT <sup>16</sup> , hPKa <sup>17</sup> , Mélanocytes <sup>18</sup>
ORAI2	✓	✓	Mélanocytes <sup>18</sup>
ORAI3	✓	✓	Mélanocytes <sup>18</sup>
ATP2B1	✓	✓	
ATP2B2	✓		
ATP2B3			
ATP2B4	✓	✓	
PANX1	✓	✓	hGK <sup>28</sup>
PANX3			
CASR		≈ U/DhPKa	hGK <sup>3</sup> , hPKn <sup>25, 26</sup>
STIM1	✓	✓	HaCaT <sup>16</sup> , hPKa <sup>17, 18</sup> , Mélanocytes <sup>18</sup>
STIM2	✓	✓	Mélanocytes <sup>18</sup>

- 1- Tu et al., 2005
- 2- Zhang et al., 2013
- 3- Fatherazi et al., 2004
- 4- Cai et al., 2005
- 5- Cai et al., 2006
- 6- Leuner et al., 2011
- 7- Fatherazi et al., 2007
- 8- Beck et al., 2007
- 9- Beck et al., 2006
- 10- Denda et al., 2001
- 11- Inoue et al., 2002
- 12- Lee et al., 2012
- 13- Akazawa et al., 2013
- 14- Kida et al., 2012
- 15- Lehen'kyi et al., 2007
- 16- Numaga-Tomita & Putney, 2013
- 17- Jans et al., 2013
- 18- Ross et al., 2007
- 19- Saul et al., 2013
- 20- Fusi et al., 2014
- 21- Sulk et al., 2012
- 22- Lehen'kyi et al., 2011
- 23- Radtke et al., 2011
- 24- Park et al., 2013
- 25- Oda et al., 1998
- 26- Tu et al., 2008
- 27- Beck B. et al., 2006
- 28- Hung, 2013

≈ 35 < Ct moy < 37  
 ✓ Ct moy ≤ 35

Tableau 3 : Expression des canaux calciques membranaires étudiés dans l'épiderme humain et les hPKa. (hPKa- kératinocytes primaires de l'épiderme humain adulte; U-indifférencié; D-différencié; S-sénescence; hPKn- kératinocytes primaires de l'épiderme humain néonatal; hGK- kératinocytes gingivaux humains; HaCaT- lignée de kératinocytes humains spontanément immortalisés)

Les canaux de la famille **TRPM** ont principalement été mis en évidence chez l'homme dans les mélanocytes mais aussi dans les kératinocytes chez la souris (Denda et al., 2010, Lu et al., 2010). Nous n'avons détecté TRPM3 ni *in vivo* ni *in vitro*, alors que TRPM5, 6 et 8 sont faiblement exprimés uniquement dans les kératinocytes *in vitro*. TRPM1 et TRPM2 ne sont détectés que dans l'épiderme ce qui peut être dû encore une fois à la présence des mélanocytes. Les membres 4 et 7 de la famille TRPM sont les deux seuls à être détectés à la fois dans l'épiderme et dans les kératinocytes tout comme **TRPP1** (PKD1) et **TRPP2** (PKD2).

Nous avons détecté l'expression des 3 canaux **Orai** dans l'épiderme et les hPKa tout comme les protéines réticulaires **Stim1** et **Stim2** alors que seule la **PMCA1** est exprimée *in vitro* et *in vivo*.

Le **CaSR** n'a pas été détecté dans l'épiderme humain adulte et faiblement dans les UhPKa ( $35,41 \pm 0,088$ ) et DhPKa ( $35,79 \pm 1,19$ ) *in vitro* et dépasse le Ct de 38 pour les ShPKa.

Les **Pannexines** 1 et 3 (Panx) sont exprimées dans la peau de mammifère (Penuela et al., 2007, Baranova et al., 2004, Scemes et al., 2009), plus particulièrement dans les kératinocytes de l'épiderme embryonnaire de souris à partir de la semaine 13,5, et tandis que l'expression de la Panx1 augmente dès la naissance, celle de la Panx3 ne change pas. La pannexine 1 a déjà été détectée dans les hGK où elle coopère avec les récepteurs purinergiques pour activer l'inflammasome et la synthèse d'interleukines pro-inflammatoires suite à une infection microbienne (Huang et al., 2008). Chez le rat, les Panx 1 se trouvent exclusivement au niveau de la membrane plasmique et sont impliquées dans la prolifération et la différenciation des kératinocytes alors que la Panx3 peut également se trouver sur les membranes des organites et n'intervient que dans la prolifération (Celetti et al., 2010).

Sont également exprimés dans l'épiderme et dans les hPKa, les ATPases calciques réticulaires **SERCA2** et golgienne **SPCA1**, les récepteurs à la Ryanodine **RyR1** et **RyR2** et les récepteurs **IP<sub>3</sub>R1**, **IP<sub>3</sub>R2**. Ces résultats étaient déjà connus dans l'épiderme puisque des mutations du gène *atp2a2* des SERCA2a/b entraînent la maladie de Darier (Sakuntabhai et al., 1999) et d'autres touchant le gène *atp2c1* des SPCA causent la maladie de Hailey-Hailey, sans doute liée à un défaut de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Ton et al., 2002). Dans la maladie de Darier, les exulcérations sont dues à une formation défectueuse des desmosomes dont les cadhérines et protéines associées restent sequestrées dans le RE à l'origine d'un stress réticulaire et de l'apoptose des kératinocytes (Savignac et al., 2014), (Wang et al., 2011, pour revue, voir Shull et al., 2011).

## II. Evolution structurale de l'épiderme humain entre 20 et 70 ans

A première vue, nos résultats nous ont semblé bien surprenants mais en fait l'idée que l'on se faisait de l'amincissement linéaire de l'épiderme avec l'âge n'est pas aussi simple et flagrante, il existe de nombreux biais dus aux techniques utilisées, à l'emplacement étudié, à l'exposition aux UVs et à une grande variabilité entre les individus (pour revue voir Waller and Maibach, 2005). La diminution des crêtes épidermiques est à chaque fois confirmée mais il ressort généralement qu'en fait l'épiderme s'affine tout d'abord jusqu'à environ 15 ans, à cause de l'exposition des enfants aux UVs selon les auteurs, ensuite entre 18 et 60

ans l'épiderme s'épaissit notamment au niveau de la couche granuleuse et avec une perte de la cohésion des cornéocytes (Escoffier et al., 1989; Leveque et al., 1984; Sauermann et al., 2002). Effectivement, nous observons un épaississement de l'épiderme entre 18 et 50 ans qui s'amincit ensuite après 60 ans. Nous voyons aussi une diminution des crêtes épidermiques et une désolidérisation de la couche cornée. Dans nos résultats, l'hypertrophie de l'épiderme est accompagnée d'une augmentation significative de cellules exprimant Ki-67. Or, il a déjà été montré que le nombre de cellules positives pour Ki-67 double dans l'épiderme des souris de 18 à 26 mois par rapport à celle de 2-3 mois et que l'épiderme des souris est plus épais à 6 mois qu'à 5 jours (Charruyer et al., 2009). Les auteurs ont montré que cette augmentation est due à la prolifération des cellules d'amplification transitoires et non pas à celle des cellules souches. Cependant, au cours du vieillissement, la capacité proliférative des cellules d'amplification transitoire diminue et leur cycle cellulaire ralentit. Nos résultats montrent que ce n'est qu'à partir de 60 ans que certains kératinocytes entrent en sénescence dans l'épiderme humain, expriment p16, et plus tard encore que le nombre de cellules positives à la SA- $\beta$ -Galactosidase augmente.

### **III. Implication des outils de la signalisation calcique dans l'homéostasie et le vieillissement de l'épiderme, l'exemple d'Orai1**

#### **A. Orai1, un canal de prolifération dont l'expression augmente avec l'âge**

Le SOCE via le canal Orai1 est impliqué dans la prolifération des cellules musculaires squelettiques et tous deux diminuent avec le vieillissement (Zhao et al., 2008), ce qui est également le cas pour les cellules mésangiales (Shen et al., 2013). Nous avons montré que Orai1 est le principal acteur du SOCE dans les jeunes kératinocytes primaires adultes indifférenciés (après le premier passage). Le SOCE avait déjà été décrit dans les HaCaT en 2005 (Zholos et al., 2005) mais le rôle physiologique du couple Orai1/Stim1 n'a été abordé qu'en 2013, lorsque l'équipe de J. Putney a montré que le SOCE, par Orai1, favorise la prolifération des HaCaT et l'initiation de leur différenciation étant donné qu'il augmente l'expression de la KRT1 (Numaga-Tomita and Putney, 2013). De même, l'influx calcique par le SOCE avait déjà été relié à la translocation du facteur de transcription pro-prolifération NFAT dans le noyau suite à l'activation de la calcineurine dans les lymphocytes (Gwack et al., 2007) ainsi que dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Bobe et al., 2011). De notre côté, nous avons également montré l'implication d'Orai1 dans la prolifération basale des kératinocytes indifférenciés ou induite par le facteur de croissance épithélial EGF. Nos études ont aussi montré une tendance à l'augmentation de son expression, ainsi que de celles de Stim1 et 2, au cours du vieillissement de l'épiderme mais pas de variation dans les kératinocytes en sénescence bien qu'il participe, avec Orai3, au SOCE dont l'amplitude est

accrue en début de sénescence. Cela peut donc s'expliquer par l'augmentation du nombre de cellules en prolifération dans l'épiderme humain entre 18 et 60 ans.

Cependant, contrairement aux résultats précédents de Numaga-Tomita, nous avons montré que Orai1 s'oppose à la différenciation puisque l'extinction de ce canal dans les hPKa, dans un milieu pauvre en calcium, suffit à initier l'expression de l'involucrine et potentialise la différenciation induite par le « calcium-switch ». Or, les HaCaT proviennent d'une lignée de kératinocytes humains spontanément immortalisés (Boukamp et al., 1988) qui a été très utilisée pour l'étude de la transduction de signaux dans les cellules épithéliales pendant les années 90. Après de nombreuses études, ce modèle s'est révélé peu pertinent pour l'étude de la peau car il est physiologiquement et phénotypiquement bien différent des kératinocytes primaires humains (Marionnet et al., 1997, Warskulat et al., 2007, Sun et al., 2007, Bellei et al., 2008, Beck et al., 2008). De plus, nous avons montré que l'expression de Orai1 est restreinte à la couche basale de l'épiderme et que le SOCE, dont il est le principal acteur en P1, diminue dramatiquement dans les kératinocytes différenciés. Cette diminution de l'amplitude du SOCE peut s'expliquer par la diminution de l'expression de Orai1, comme nous l'avons montré dans un autre modèle de cellules épithéliales au cours de leur différenciation neuro-endocrine ([voir annexe, article 1](#)), mais cela peut aussi être la conséquence de la densification du cytosquelette au cours de la différenciation bloquant l'interaction entre Stim1 et Orai1 comme dans les cellules en différenciation neuro-endocrine ([voir annexe, article 2](#)). Malgré cela, il est possible que ce canal participe à l'initiation de la différenciation en présence de calcium extracellulaire car il permet de réguler le canal TRP le plus sélectif pour le calcium, TRPV6. En effet, nous avons montré, dans un autre modèle cellulaire, que l'entrée de calcium par le SOCE provoque la translocation du canal TRPV6 à la membrane plasmique. Or, ce canal étant constitutivement actif, sa présence à la membrane permet d'amplifier l'influx calcique du SOC en présence de calcium extracellulaire ([voir annexe, article 5](#)). La même interaction entre Orai1 et TRPC1 a aussi été démontrée dans les cellules glandulaires sous mandibulaires (HSG) et active la voie NFAT ou NF- $\kappa$ B selon que Orai1 soit seul ou accompagné de TRPC1 respectivement (Cheng et al., 2011).

Nos résultats ont aussi montré que le SOCE via Orai1 intervient dans la migration des kératinocytes induite par l'EGF en régulant le renouvellement des adhésions focales par les voies de la PKC et de la Calpaïne. La même année, une autre équipe a confirmé l'implication de ce canal SOC dans la migration des hPKa mais cette fois induite par le LPA et passant par la voie calcineurine/NFATc1 (Jans et al., 2013).

Enfin, l'importance de Orai1 dans la physiologie des kératinocytes a été confirmée dans le modèle de souris Orai1<sup>-/-</sup>. Cependant, nous avons constaté que le SOCE n'est pas totalement aboli en l'absence de Orai1, alors que dans les hPKa ce canal est essentiel au développement du courant SOCE, ce qui suggère un mécanisme compensatoire par d'autres canaux SOC au cours du développement, ce qu'il serait intéressant d'étudier.

## B. Cas des autres canaux et acteurs de la signalisation calcique

Les résultats présentés plus haut ont permis de révéler l'implication de plusieurs autres canaux et protéines de la signalisation calcique dans le vieillissement de l'épiderme parmi lesquels **TRPC5**, dont l'expression augmente avec le vieillissement. L'expression de ce canal augmente aussi dans la sénescence et la différenciation des kératinocytes. Or, le vieillissement de l'épiderme est caractérisé par une surexpression importante et précoce des marqueurs de différenciation KRT10 et FLG et, plus tardivement, par une augmentation du nombre de cellules sénescents et de l'expression des marqueurs de sénescence qui, en conséquence du choix de notre cohorte (70 ans maximum), ne sont pas très marqués. Il n'est donc pas surprenant que ce canal, s'il est impliqué à la fois dans la différenciation et la sénescence, augmente aussi lors du vieillissement. Cependant, nous verrons que ce n'est pas toujours le cas. Cela dit, le rôle de TRPC5 dans la différenciation des kératinocytes avait déjà été suggérée en 2005 (Cai et al., 2005) d'autant plus qu'il est sensible à énormément de stimuli comme le froid, une tension mécanique, le NO ou encore les protons ainsi qu'à de nombreuses interactions avec les canaux Orai1, TRPC1 et 4 (pour revue voir Zholos, 2014). Nous sommes les premiers à montrer que le canal TRPC5 est surexprimé dans la sénescence et le vieillissement. Nous sommes également les premiers à étudier l'expression du canal **TRPM4** dans l'épiderme et à montrer que celui-ci augmente au cours de la sénescence et de la différenciation des kératinocytes. Ce canal cationique non-sélectif peut être régulé par le stress oxydatif, tout comme TRPM2 et TRPM7 qui augmentent également dans la différenciation (1,8 fois), mais il est surtout activé par un influx calcique tout en étant imperméable au  $Ca^{2+}$ . Il pourrait donc être impliqué dans la détection du  $Ca^{2+}$  lors du « calcium-switch » et dans le déclenchement d'autres voies cationiques.

Le canal **TRPV6**, lui, est impliqué dans l'entrée de  $Ca^{2+}$  lors de la différenciation des kératinocytes induite par le « calcium switch » ou suite à la synthèse de Vit-D3 induite par l'exposition aux UVs (Lehen'kyi et al., 2007b, 2011c). Selon nos données, TRPV6 est le canal le plus surexprimé dans les kératinocytes différenciés par rapport aux kératinocytes prolifératifs. L'expression de ce canal calcique est également corrélée positivement au vieillissement de l'épiderme ce qui est sans doute lié à l'augmentation de la différenciation. Or, il est connu que la synthèse de Vit-D3, sous l'effet des UVs, diminue chez les personnes âgées qui n'atteignent la carence en Vit-D3 (<50 nmol/L plasma) qu'après 75 ans (Chel et al., 1998). De plus, nous avons constaté une augmentation de l'expression de la filaggrine au cours du vieillissement de l'épiderme (jusqu'à 70 ans) mais il a été montré par une autre équipe qu'elle diminue entre 57 et 98 ans (Contet-Audonneau et al., 1999). Il est donc probable que l'augmentation de TRPV6 soit liée à l'augmentation de la différenciation de l'épiderme avant 70 ans et que la diminution de la Vit-D3 n'ait pas encore d'effet sur l'expression de ce canal avant 70 ans.

Tandis que les travaux de YM. Lee et ses collaborateurs (Lee et al., 2009) ont montré un doublement d'expression de **TRPV1** dans la peau (du bras) non exposée aux UVs des personnes âgées (6 hommes de 72 à 80 ans *versus* 6 hommes et 3 femmes de 20 à 35 ans),

nous avons mis en évidence une corrélation à tendance négative entre l'expression du canal TRPV1 et le vieillissement bien qu'il augmente avec la sénescence et la différenciation. Or, dans l'épiderme, TRPV1 participe à la reconstruction de la barrière cutanée endommagée (Denda et al., 2007b) et à la motilité des kératinocytes (Graham et al., 2013) en stimulant l'expression de la MMP-1 par une voie dépendante des protéines hsp (Li et al., 2007). De plus, il est connu qu'après avoir été endommagée, la barrière cutanée est moins rapidement régénérée chez les personnes âgées (Ghadially et al., 1995b). Ainsi, une diminution de l'expression de TRPV1 au cours du vieillissement pourrait expliquer cette latence dans la réparation de la barrière cutanée. Puis, il a été montré que, dans les muscles, ce canal peut être activé par le monoxyde d'azote (NO) et induire la voie mTOR à l'origine d'une hypertrophie cellulaire (Ito et al., 2013), caractéristique des cellules vieillissantes (voir introduction). Or, nous avons détecté une augmentation de l'expression de la **NO Synthase 1** (NOS1) au cours du vieillissement de l'épiderme humain. Cette enzyme a déjà été mise en évidence dans le psoriasis (Ormerod et al., 1998) et un polymorphisme des gènes codant les NOS affecte la qualité du vieillissement (Montesanto et al., 2013). En effet, la NOS2 est aussi exprimée dans l'épiderme et, sous l'influence des UVs, peut favoriser la synthèse de mélanine protectrice pour les kératinocytes, leur prolifération ou leur différenciation (pour revue, voir Cals-Grierson and Ormerod, 2004). Enfin, d'après nos données, NOS3 ne serait pas exprimée dans l'épiderme.

Selon nos données, l'expression du canal **TRPV3** augmente avec l'âge or, lui, serait impliqué dans la synthèse de NO dans la peau mais indépendamment de l'activation des NOS (Miyamoto et al., 2011). Ce canal thermosensible participe à la sensation de douleur en provoquant la sécrétion de prostaglandine E2 et d'ATP par les kératinocytes activant les neurones nocicepteurs (Mandadi et al., 2009; Moqrich et al., 2005; Yang et al., 2009) Il a également été impliqué dans le prurit de dermatites comme dans le syndrome d'Olmsted (Lin et al., 2012) et inhibe la croissance des follicules pileux (pour revue voir, Steinhoff and Bíró, 2009). Ce canal est donc globalement considéré comme anti-prolifératif et pro-inflammatoire dans l'épiderme (pour revue, voir Nilius and Bíró, 2013).

Le canal **TRPM6** est perméable au  $Mg^{2+}$  et nous avons montré que son expression augmente au cours de la sénescence des kératinocytes. Or, le  $Mg^{2+}$  est un cofacteur de la TER (Lue, 1999). L'ichtyose est une dystrophie cutanée congénitale due à des mutations non-sens du gène codant l'ichtyine et caractérisée par une hyperdifférenciation et desquamation (Lefèvre et al., 2004). Cette protéine est à l'origine d'un transport membranaire de  $Mg^{2+}$  (Goytain et al., 2008). Cependant, il n'y a pas de lien direct entre le  $Mg^{2+}$  et la différenciation pour le moment (pour revue, voir Quamme, 2010). De plus, la conductance de TRPV3 est inhibée par la présence de  $Mg^{2+}$  dans les kératinocytes primaires de rongeurs (Luo et al., 2012), il serait possible que le  $Mg^{2+}$  entrant par TRPM6 exerce un rétro-contrôle négatif sur TRPV3 et la différenciation des kératinocytes.

Comme TRPV3, le canal **TRPM2** induit la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires par les kératinocytes telles que l'IL-8 (Yokomichi et al., 2013). Une exposition prolongée au stress oxydatif, par la présence de ROS, induit l'apoptose des cellules embryonnaires de rein, HEK mettant en jeu ce canal (Grubisha et al., 2006). En ce qui nous concerne, nous avons remarqué une diminution de TRPM2 au cours du vieillissement ce qui, d'après la



bibliographie, pourrait traduire une certaine résistance au stress oxydatif dans les kératinocytes au cours du vieillissement.

Nos données montrent une augmentation d'expression du canal **TRPV2** avec la sénescence des kératinocytes. Or, ce canal est également surexprimé dans les cellules pluripotentes induites (IPS) à partir de kératinocytes de patients atteints de la progéria de Hutchinson-Gillford (Lo et al., 2014).

Dans le modèle de *C. elegans*, l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries est à l'origine de la production de ROS et participe à la cicatrisation (Xu and Chisholm, 2014). Le **MCU**, permettant cet influx calcique dans les mitochondries, en association avec l' $\text{IP}_3\text{R2}$  a également été impliqué dans la sénescence oncogénique des cellules épithéliales mammaires, et la sénescence répllicative des fibroblastes, en provoquant une redistribution du  $\text{Ca}^{2+}$  depuis le RE vers les mitochondries (Wiel et al., 2014b). Cette équipe a également montré que la perte de  $\text{IP}_3\text{R2}$  permet l'échappement des cellules à la sénescence oncogénique.

Nous avons effectivement constaté l'augmentation de l'expression du MCU au cours du vieillissement mais pas au cours de la sénescence tout comme l'expression de la citrate synthase (**Cs**) qui a servi de gène de référence pour les mitochondries. L'augmentation du MCU au cours du vieillissement serait donc, d'après nos données, d'avantage liée à une augmentation de la quantité de mitochondries ou du nombre de copies de l'ADN mitochondrial avec l'âge. Pourtant, il est généralement établi que la quantité de mitochondries diminue au cours du vieillissement et surtout pendant l'enfance. Or, nos résultats ont aussi mis en évidence une augmentation du stock calcique mitochondrial dans les kératinocytes sénescents par rapport au kératinocytes en prolifération. Nous n'avons pas détecté l'expression d'**IP<sub>3</sub>R2** dans ces cellules mais une augmentation de l'expression des **IP<sub>3</sub>R1** et **IP<sub>3</sub>R3** lors du vieillissement de l'épiderme et de la sénescence des kératinocytes *in vitro* ainsi qu'au cours de la différenciation induite par le calcium pour **IP<sub>3</sub>R3**. Il y a donc peut-être le même mécanisme de redistribution du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les kératinocytes post-mitotiques sénescents ou en différenciation mais impliquant cette fois les autres isoformes de l' $\text{IP}_3\text{R}$ .

La **manganèse superoxyde dismutase** (MnSOD ou SOD2) est un anti-oxydant dont le promoteur contient une séquence CRE et dont l'expression peut alors être modulée par le  $\text{Ca}^{2+}$ . La mutation délétère de ce gène chez la souris induit un vieillissement prématuré de la peau qui s'affine, contient plus de cellules sénescents et montre une importante différenciation (Velarde et al., 2012; pour revue, voir Treiber et al., 2012). Or, il a été montré que l'augmentation de l'activité de la MnSOD induit la sénescence des kératinocytes et participe à leur mort par macro-autophagie (Deruy et al., 2010). Dans notre cas, nous avons constaté l'augmentation de l'expression de la **SOD2** dans les kératinocytes en sénescence ainsi que dans la différenciation induite par le  $\text{Ca}^{2+}$ . Nous avons montré une augmentation de l'expression de **LC3B** dans le vieillissement de l'épiderme, la différenciation et la sénescence des kératinocytes. En effet, il y a une augmentation de l'autophagie et de la LC3B dès le début de la différenciation des kératinocytes (Aymard et al., 2011). Il a également déjà été montré que les kératinocytes en sénescence accumulent des vésicules d'autophagie et finissent par « mourir » par macro-autophagie (Gosselin et al., 2009) tandis que dans les cellules émergentes, l'expression de la LC3B diminue (Martin et al., 2014). Il serait donc

plausible que la SOD2 ralentisse le vieillissement de la peau en inhibant la production de ROS par les jeunes cellules mais qu'elle soit également délétère dans les vieilles cellules subissant un stress oxydatif important, auquel cas les catalases ne pourraient plus compenser la synthèse du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les SOD. Contrairement à la LC3B, l'expression du sequestosome, **p62**, n'augmente que lors de la différenciation induite par le Ca<sup>2+</sup>. Cette protéine a déjà été impliquée dans la différenciation induite par le Ca<sup>2+</sup> au cours de laquelle elle est activée par phosphorylation, tout comme la protéine G Ras, (Filvaroff et al., 1992) suite à l'influx calcique dans certains microdomaines membranaires et pas seulement suite à l'augmentation de Ca<sup>2+</sup> cytosolique après utilisation d'un ionophore (Filvaroff et al., 1994). Il est également ressorti de nos analyses, une corrélation négative entre l'expression des canaux **TRPM1**, **TRPML1** et le vieillissement de l'épiderme humain. Or, ces deux canaux sont exprimés sur la membrane lysosomale. Dans les lysosomes neuronaux TRPM1 assure une libération de Ca<sup>2+</sup> couplée à l'acidification des vésicules d'autophagie permettant de dégrader les agrégats de sphingomyéline et β-amyloïde. Parallèlement, une mutation délétère de *trpml1* chez la souris provoque une accumulation de protéines comme la lipofuscine dans les lysosomes des fibroblastes du derme (Dong et al., 2008). Ce canal est également impliqué dans l'exocytose lysosomale activant la phagocytose de grosses particules provenant des cellules sénescents (Samie et al., 2013). Finalement, la diminution de l'expression de ces canaux au cours du vieillissement pourrait être impliquée dans l'accumulation de protéines comme la lipofuscine dans les kératinocytes et le maintien des cellules sénescents dans l'épiderme.

Les ROS peuvent également moduler le fonctionnement des canaux **Orai** et des protéines **Stim** (pour revue, voir Bogeski et al., 2012) modifiant alors le SOCE. Or, il y a une augmentation du SOCE au cours de la sénescence des kératinocytes et nos données d'imagerie calcique ont également montré une augmentation de la concentration calcique basale dans le cytoplasme des kératinocytes sénescents par rapport aux cellules prolifératives, sans diminution significative de la vidange réticulaire. Pourtant, l'expression de la pompe ATPasique **PMCA4** dans l'épiderme et les kératinocytes est positivement corrélée au vieillissement mais aucun rôle ne lui a été attribué dans les kératinocytes pour le moment et elle ne semble pas impliquée directement dans la différenciation ou la sénescence. Elle n'est alors probablement pas impliquée dans cette augmentation de calcium basal. De plus, une augmentation de l'expression de **SERCA3** est visible dans les kératinocytes en sénescence. Celle-ci n'avait pas été détectée dans de précédentes expériences immunohistologiques sur la peau humaine excepté dans les glandes eccrines (Tavadia et al., 2004) mais il est vrai que la quantité de transcrits de SERCA3 dans l'épiderme ou les kératinocytes est faible par rapport à celle de **SERCA2**. Il est donc surprenant que la vidange de calcium réticulaire induite par la thapsigargine ne soit pas modifiée avec la sénescence mais cela pourrait s'expliquer, par exemple, par un dysfonctionnement général des pompes SERCA réticulaires et une diminution des protéines chélatrices du calcium comme c'est le cas dans le vieillissement des cellules musculaires lisses (Matz et al., 2003; pour revue, voir Wray and Burdya, 2010).

Selon l'équipe de M. Denda, les 3 récepteurs à la ryanodine sont exprimés dans les kératinocytes et sont impliqués à la fois dans la différenciation des kératinocytes et la

réparation de la barrière cutanée (Denda et al., 2012). Pourtant, nous n'y avons détecté que RyR1, qui augmente uniquement dans la différenciation induite par le  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que RyR3, dont l'expression diminue au cours du vieillissement de l'épiderme mais augmente dans la différenciation et la sénescence des kératinocytes. De plus, dans les cellules excitables, l'expression des récepteurs RyR diminue avec le vieillissement (Martini et al., 1994; pour revue, voir Missiaen et al., 2000). RyR3 aurait donc un rôle négatif par rapport au vieillissement indépendamment de ceux qu'il exerce sur la sénescence ou la différenciation. Concernant toujours les protéines réticulaires, nous avons montré une augmentation de l'expression de la **Grp78** (Hsp60) au cours du vieillissement de l'épiderme. Il est connu que cette protéine hsp ainsi que les hsp 70 et 94 sont surexprimées dans le cerveau, le foie et le cœur des espèces d'oiseaux ayant une longue espérance de vie (Salway et al., 2011). Or, ces protéines protègent le protéome du stress oxydatif en induisant la dégradation ou la réparation des protéines et retardent ainsi la sénescence (pour revue, voir Calderwood et al., 2009b). Enfin, il y a une augmentation de l'expression de l'**ATPase calcique de l'appareil de Golgi** dans la sénescence *in vitro* corrélée au vieillissement de l'épiderme. Cette pompe calcique est cruciale dans l'épiderme. Des mutations délétères du gène *atp2c1* sont à l'origine de la maladie de Hailey-Hailey tandis qu'un KO chez la souris augmente l'incidence du cancer SCC (Okunade et al., 2007; pour revue, voir Prasad et al., 2004). Cette pompe calcique, en conditions physiologiques est impliquée dans la kératinisation et la formation des jonctions serrées via la synthèse des claudines 1 et 2 (Raiko et al., 2012). Chez les invertébrés comme *C. elegans* elle participe à la migration cellulaire lors du développement embryonnaire (Praitis et al., 2013).

#### **IV. Les voies de signalisation dépendantes du calcium impliquées dans l'homéostasie de l'épiderme au cours du vieillissement**

Parmi les facteurs de transcription analysés, nos quantifications par qPCR ont corrélé seulement **AP-2 $\epsilon$**  et **pRB1** au vieillissement de l'épiderme.

Le facteur AP-2 $\epsilon$  a été cloné et caractérisé dans l'épiderme où il est exclusivement exprimé chez l'adulte, ainsi que dans les kératinocytes *in vitro*, et peut se lier au promoteur des cytokératines (Tummala et al., 2003) ou dans les mélanocytes desquels il stimule la différenciation tout comme AP2- $\alpha$  (Van Otterloo et al., 2010). En effet, l'activité des facteurs AP-2 (par phosphorylation inhibitrice) diminue avant la différenciation des kératinocytes (Popa et al., 2004). En montrant une diminution de l'expression de l'AP-2 $\alpha$  dans les kératinocytes différenciés par le  $\text{Ca}^{2+}$ , nos résultats ont confirmé ces données ainsi que celles de l'équipe d'E. Fuchs publiées en 2006 montrant que ce facteur de transcription inhibe l'expression du récepteur à l'EGF pro-prolifératif et, par conséquent, favorise l'initiation de la différenciation (Wang et al., 2006). Le facteur AP-2 $\gamma$  est également très intéressant car, selon nos données, son expression augmente lors de la différenciation mais diminue dans la sénescence des kératinocytes comme dans le vieillissement de l'épiderme de la queue de souris (Swindell et al., 2012). Ce facteur de transcription est crucial dans la morphogénèse

de l'épiderme en régulant l'expression des gènes KRT14 et KRT1 sous l'influence de la p63, ainsi, une mutation délétère du gène *tfap2c* chez la souris ralentit le développement de l'épiderme et l'acquisition de la barrière cutanée en retardant l'expression des marqueurs de différenciation (Guttormsen et al., 2008). Les facteurs AP-2 sont donc cruciaux dans le développement et l'homéostasie de l'épiderme au cours du vieillissement en régulant la balance prolifération/différenciation (Wang et al., 2008).

La protéine du rétinoblastome est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et principalement dans la phase G1 (voir introduction). D'après nos résultats, son expression augmente entre 20 et 70 ans tout comme Ki-67 analysé en immunohistochimie. Seule l'expression de la PCNA montre une tendance à diminuer avec la différenciation. Dans le syndrome de Kindler (une progéria), les kératinocytes primaires ont une capacité répllicative réduite et une diminution de l'expression des marqueurs de cellule souche p63 et Bmi tandis qu'il y a une augmentation du marqueur de sénescence p16 et une hypophosphorylation de la pRB1 (Piccinni et al., 2013). De plus, l'inactivation de la pRB1 et de p53 induit l'immortalisation des kératinocytes (Smeets et al., 2011). Or, la différenciation des kératinocytes est précédée par l'arrêt du cycle cellulaire suite à l'augmentation de l'expression de p53, stimulée par la voie MEKK1-MEK3-PKC $\delta$  et activant l'expression de p21, mais aussi dans l'induction de la différenciation par la voie Notch1 (Saha et al., 2014; Spandau, 1994; Yugawa et al., 2007). Nos résultats sont en accord avec ces publications car nous avons montré que, dans les kératinocytes, **p21** n'est pas uniquement impliqué dans la sénescence mais aussi dans la différenciation tandis que **p16** n'augmente que tardivement lors du vieillissement de l'épiderme humain et n'est positif que pour les cellules sénescents et très peu pour les kératinocytes différenciés par le Ca<sup>2+</sup>. P16 serait aussi un meilleur marqueur de sénescence pour les kératinocytes que l'expression de la  $\beta$ -Galactosidase. En effet, nous n'avons vu son expression augmenter ni dans les kératinocytes sénescents *in vitro*, ni au cours du vieillissement de l'épiderme de 18 à 70 ans, tandis que les analyses immunohistologiques montrent bien une plus grande quantité de cellules positives vers 80 ans. Cela explique peut-être, encore une fois, que les facteurs ou canaux impliqués dans la sénescence ne soient pas encore bien surexprimés dans nos analyses transcriptomiques sur l'épiderme. Nous avons détecté un autre marqueur de sénescence dans les kératinocytes mais celui-ci augmente également, dans une moindre mesure, lors de la différenciation calcium-dépendante, il s'agit du gène **shc1** codant les protéines p66, p52 et p46 participant à la voie de signalisation de l'EGFR. Il y a peu de données dans la littérature concernant les protéines SHC dans les kératinocytes mais p66 est impliqué notamment dans l'arrêt de prolifération des HaCaT par le resveratrol via une voie Erk1/2-Akt dépendante (Fabbrocini et al., 2010). Ces protéines sont en général considérées comme impliquées dans la résistance au stress oxydatif et la sénescence mais les résultats d'un KO de p66 sur l'augmentation de la durée de vie des souris sont controversés (Migliaccio et al., 1999; Ramsey et al., 2014) bien qu'il ait été montré que son expression augmente dans la peau au cours du vieillissement des souris suite à l'augmentation des radicaux libres (Lebiedzinska et al., 2009). Nous avons montré une diminution de l'expression de **PPAR $\gamma$**  au cours du vieillissement de l'épiderme. Pourtant, l'expression de ce récepteur nucléaire augmente dans la différenciation induite par le Ca<sup>2+</sup> mais diminue dans les lésions hyperplasiques de

psoriasis (Rivier et al., 1998) et au cours de la sénescence répliquative des kératinocytes. Celui-ci est majoritairement exprimé dans les glandes séborrhéiques où il participe à leur différenciation et leur activité mais diminue dès la ménopause chez les femmes alors que chez les hommes il n'y a pas de différence avant 80 ans (pour revue, voir, Rosenfield et al., 2000; Zouboulis and Boschnakow, 2001). Notre screening ayant été fait exclusivement sur des femmes, cela peut être la raison de la diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  observée au cours du vieillissement.

Enfin, le dernier facteur de transcription dont l'expression semble corrélée au vieillissement dans notre étude est **NFATC1** qui a tendance à augmenter. La famille des gènes NFAT est très intéressante dans l'homéostasie de l'épiderme et la régulation de la croissance et de la différenciation des kératinocytes (Mammucari et al., 2005). En effet, nous avons montré que l'expression de **NFATC1** augmente avec la sénescence, celle de **NFATC2** augmente fortement lors de la différenciation mais a également tendance à augmenter avec la sénescence tandis que **NFATC3** augmente dans la différenciation et a plutôt tendance à diminuer dans la sénescence des kératinocytes. De plus, il a été montré que NFATC2 peut induire l'expression de p21 et p27 déclenchant la différenciation (Gafer-Gvili et al., 2003). NFATC1 assure le maintien des cellules souches à l'état de quiescence dans les follicules pileux (Horsley et al., 2008; pour revue, voir Oro, 2008). Ce NFAT pourrait alors intervenir également dans l'arrêt du cycle lors de la sénescence répliquative des kératinocytes. Concernant la différenciation des kératinocytes induite par le Ca<sup>2+</sup>, les NFAT, activés par la calcineurine, s'associent aux facteurs Sp1 et 3 pour activer la transcription de p21 (Santini et al., 2001). Effectivement, nous avons aussi constaté la surexpression du facteur de transcription **Sp1** dans les DhPKa. De même, au cours de la différenciation, nous avons vu une augmentation de l'expression de **l'adénylate cyclase soluble** (*adcy10*), qui provoque une augmentation d'AMPc, activateur de la transcription des KRT1 et 10, de l'IVL et de la TGM1 dans les cellules HaCaT (Mammone et al., 1998). Enfin, les facteurs de transcription c-Jun et JunD, appartenant à la famille **AP-1**, ont déjà été impliqués dans la régulation de la balance prolifération/différenciation des kératinocytes. L'expression des facteurs AP-1 varie selon les couches de l'épiderme ce qui traduit leur intervention différentielle dans la différenciation des kératinocytes selon le moment et selon leur place dans l'épiderme. Ainsi, tandis que junD est exprimé dans toutes les couches épidermiques, c-jun est restreint au noyau des cellules granuleuses (Welter and Eckert, 1995). Le TGF $\beta$ 1 induit l'arrêt du cycle cellulaire précédant la différenciation en induisant l'expression de c-jun mais pas de c-fos, ni de cMyc ou JunB (Blatti and Scott, 1992), alors que l'activation pro-différenciatrice du LX récepteur (LXR) stimule la formation de l'enveloppe cornée en induisant l'expression de junD et c-fos mais pas celle de c-jun et junB (Schmuth et al., 2004). L'expression de JunD est activée également lors du « calcium switch » sur des kératinocytes de souris (Rutberg et al., 1997). En ce qui nous concerne, nous avons vu une augmentation de l'expression de ces deux facteurs de transcription AP-1 dans les kératinocytes et celle de JunD est encore plus marquée.



# PERSPECTIVES

Mes travaux ont permis de mettre en évidence plusieurs cibles potentielles dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de la sénescence répliquative des kératinocytes. Ils nous ont également permis de mieux comprendre ce qu'il se passe dans l'épiderme au cours du vieillissement. Cependant, il serait nécessaire de vérifier nos hypothèses au-delà de 70 ans bien qu'il risque d'y avoir certains biais car peu de personnes de cet âge subissent des interventions bénignes comme les dermolipectomies. En effet, la présence de cancers sous-jacents, une inflammation ou encore la modification du lieu de prélèvement sur le corps pourraient perturber les résultats. La compréhension des mécanismes impliqués dans la physiologie de l'épiderme, notamment l'intervention des canaux ioniques, laisse présager de nombreuses possibilités d'innovations cosmétiques et/ou thérapeutiques. Il est donc crucial de poursuivre ces études dans le modèle physiologique pour l'appliquer ensuite à différentes pathologies dermatologiques. Nous avons donc encore plusieurs points à développer :

### **Perspectives concernant la différenciation :**

Quel est le rôle de TRPV1 dans la différenciation induite par le calcium ?

Le canal Orai1 est-il impliqué dans la translocation de TRPV6 lors de l'initiation de la différenciation ? Pourquoi l'expression de ce canal diminue lors du processus de différenciation ?

Quelles voies de transduction régulent l'expression de TRPV6, crucial dans la balance prolifération différenciation ?

Etudier la cinétique de la différenciation, les différentes vagues calciques, les canaux impliqués et les voies de signalisation empruntées (Orai1, TRPC1, TRPV6, TRPV1 et les différents NFAT, NF-kB et AP-2)

### **Perspectives concernant la sénescence :**

Etant donné qu'il n'y a pas de diminution significative de l'expression d'Orai1 et 3 dans les kératinocytes sénescents, pourquoi le SOCE diminue-t'il et quel serait l'effet d'une réactivation dans ces cellules ?

TRPM6 est le canal le plus surexprimé au cours de la sénescence répliquative, quel est son rôle ?

Peut-on modifier la cinétique de sénescence en modifiant l'activité des canaux TRPM1 et TRPM2 impliqués dans l'autophagie ?

### **Perspectives cosmétiques et thérapeutiques :**

Il serait intéressant de stimuler les canaux impliqués dans la différenciation dans le cas des cancers BCC, dont l'entrée calcique est absente, de réactiver les voies impliquées dans la différenciation dans le cas des cancers SCC ou de réguler les canaux impliqués dans la balance prolifération/différenciation lors de pathologies comme le psoriasis. L'étude des voies de transduction et canaux calciques impliqués dans la sénescence des kératinocytes est, elle aussi, importante pour la compréhension de l'échappement à la sénescence impliqué dans les cancers. La régulation de l'autophagie au cours du vieillissement cellulaire pourrait également être bénéfique afin d'éviter l'apparition de dysfonctionnements cellulaires et peut-être transposable à des pathologies neurodégénératives.



# ANNEXE I

Rôle des canaux Orai1 et TRPV6 dans la  
progression du cancer de la prostate

# I. INTRODUCTION AU CANCER DE LA PROSTATE

## A. Anatomie et physiologie de la prostate

La prostate est une glande exocrine du système reproducteur masculin conservée chez tous les mammifères. Elle est située en avant du rectum, sous la vessie et entoure la partie haute de l'urètre (Huggins and Scott, 1945) (Fig.annexe.1). Cet organe n'est pas indispensable à la survie de l'individu mais joue un rôle essentiel dans la reproduction par voie naturelle en exerçant une double fonction physiologique, à la fois glandulaire (en sécrétant une partie du liquide spermatique) et mécanique (en participant aux fonctions éjaculatoires). La prostate est le siège de trois affections principales : la prostatite (inflammation d'origine bactérienne), l'adénome ou hyperplasie bénigne de l'épithélium (grossissement de la prostate due à une augmentation de la taille des cellules glandulaires), et l'adénocarcinome (cancer de l'épithélium). Ces pathologies prostatiques peuvent toucher l'homme jeune (prostatite aiguë) mais aussi et surtout l'homme à partir de la cinquantaine (adénome et cancer).

Morphologiquement la prostate est un organe hétérogène composé d'une partie glandulaire et d'une partie antérieure fibromusculaire non glandulaire (30% de la masse prostatique). La partie glandulaire se compose de trois régions : la zone centrale relativement résistante aux affections, la zone de transition où sont généralement observées les hyperplasies bénignes et la zone périphérique qui est la région la plus concernée par les inflammations et les cancers (Styles et al., 1988) (Fig.annexe.2).

La partie glandulaire de la prostate contient des acini formés d'un épithélium sécréteur pseudo stratifié contenant des cellules souches basales pluripotentes, des cellules intermédiaires prolifératives transitant d'un état basal indifférencié vers un état apical différencié, des cellules neuroendocrines régulant la croissance, la différenciation et l'activité sécrétrice de l'épithélium par une action paracrine et enfin, à l'apex, des cellules différenciées sécrétrices caractérisées par la présence d'abondant granules de sécrétions et d'enzymes comme la PSA (prostate specific antigen). Les prolongements des acini forment un réseau épithélial ramifié de tubules se déversant directement dans l'urètre.

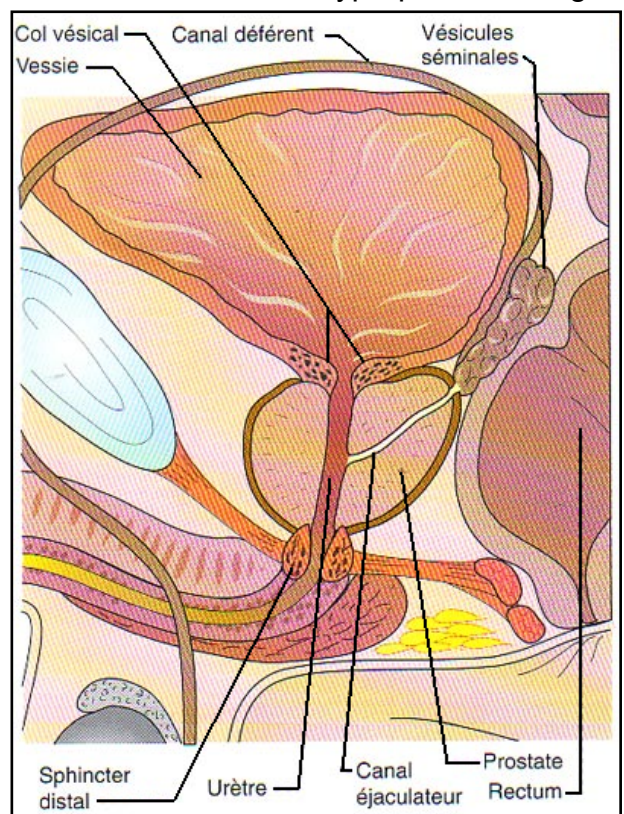


Figure 1 : Situation anatomique de la prostate humaine, d'après [www.cancer-de-la-prostate.fr](http://www.cancer-de-la-prostate.fr)

## B. Le calcium et les canaux calciques dans le cancer de la prostate

Au niveau mondial, le cancer de la prostate (PCa) chez l'homme est le second cancer le plus diagnostiqué avec 899 000 nouveaux cas en 2008 (13,6% du total) et la 6ème cause de mortalité par cancer (6,1% du total) (globocan.iarc.fr, 2008). En France, l'année 2008 a compté 8 900 décès par PCa ce qui en fait, après le cancer du poumon, le cancer le plus mortel mais surtout plus fréquent en 2010 avec 72 000 nouveau cas (35%). Le PCa est prévalent dans les pays industrialisés chez l'homme de plus de cinquante ans avec 3/4 des cas chez les hommes de plus de 65 ans (Cooperberg et al., 2005). De plus, des études prédictives de l'incidence du cancer de la prostate au Canada prévoient un triplement du nombre de cas d'ici 2021 suite à l'augmentation de l'espérance de vie et notamment l'arrivée des «baby boomers» à la cinquantaine, ainsi qu'à l'augmentation de la précision des techniques de détection (Quon et al., 2011). Donc le cancer de la prostate est un problème socio-économique actuel s'aggravant qui nécessite une attention particulière. Le cancer de la prostate est diagnostiqué par toucher rectal et dosage du taux plasmatique de PSA, antigène spécifique de la prostate secrété par les cellules épithéliales prostatiques, puis confirmé par échographie endorectale et biopsie. Cette dernière est le meilleur moyen d'établir un pronostic selon l'état d'avancement du cancer suivant le système «TNM» qui décrit l'extension de la tumeur primitive (T), la présence de métastases ganglionnaires (N) et la présence de métastases à distance (M). Puis l'analyse histopathologique d'une biopsie permet de d'établir l'état d'avancement plus précis de la tumeur grâce à la détermination du score de Gleason déterminé principalement par l'état de dédifférenciation de la tumeur. Cette classification est presque exclusivement réservée au cancer de la prostate.

De plus, comme tous les cancers glandulaires, l'adénocarcinome de la prostate, qui est la forme la plus courante du PCa, dépend des taux hormonaux et dans ce cas des taux d'androgènes. Ainsi, la découverte de l'androgéno-dépendance de ce cancer est à la base des premiers traitements anti-androgéniques par castration chimique et/ou chirurgicale qui, dans un premier temps, ralentissent efficacement la progression tumorale (Gustafsson et al., 1978). Cette thérapie aboutit à un échappement thérapeutique

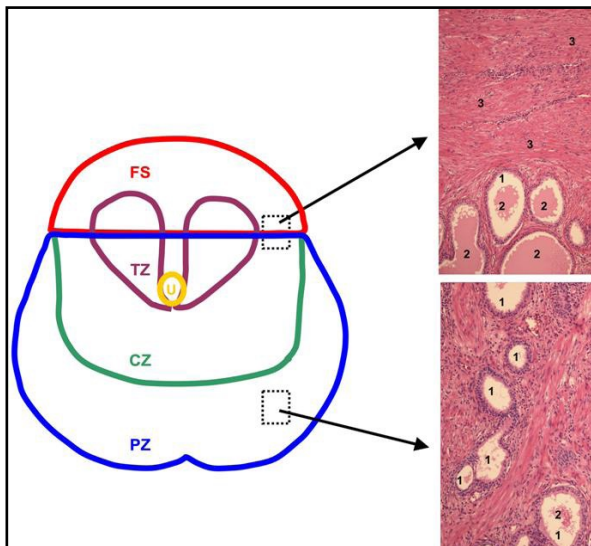


Figure2 : Zones de la prostate humaine (FS= stroma fibromusculaire, TZ= zone de transition, U= Urètre, CZ= zone centrale, PZ= zone périphérique) avec deux grossissements (100X) montrant les parties glandulaires et stromales de la prostate humaine (1=partie sécrétrice de la glande prostatique, 2= sécrétion prostatique dans la partie sécrétrice, 3= stroma principalement constitué de muscle lisse et de tissu conjonctif)

dû à l'évolution des cellules tumorales d'un phénotype androgéno-dépendant vers un phénotype androgéno-indépendant, caractérisé par une résistance à la privation hormonale et à la chimiothérapie. A ce stade il n'existe pas actuellement de traitement efficace, seuls les soins palliatifs sont administrés. Les données obtenues au cours des dernières années ont clairement montré l'importance du calcium et des canaux perméables au calcium, notamment les canaux TRP, dans la cancérogénèse (pour revue voir Hanahan and Weinberg, 2000; Lehen'kyi et al., 2011d; Prevarskaya et al., 2010). Au cours de la cancérogénèse, la progression des cellules cancéreuses prostatiques (PCa) vers le stade androgéno-indépendant est accompagnée de l'apparition de nouveaux phénotypes cellulaires résistants à l'apoptose (Fig.annexe3). L'un d'eux est étroitement associé à la surexpression de Bcl-2 (Raffo et al., 1995). Or, il a été montré que la surexpression de Bcl-2 dans les PCa LNCaP modifie non seulement l'homéostasie calcique par rapport aux cellules LNCaP contrôles (Vanden Abeele et al., 2004) mais provoque également une réduction du stock calcique basal dans le RE due à une sous expression de calréticuline (CRT) et des pompes (SERCA) ainsi qu'une diminution du nombre de canaux calciques (SOC) à la membrane plasmique (Vanoverberghe et al., 2004). Ces modifications, également observées dans la progression des cellules PCa, sont accompagnées d'une résistance à l'apoptose dépendante du stress réticulaire et des mitochondries ainsi qu'à la diminution de l'apoptose dépendante de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans le cytoplasme (Prevarskaya N. et al., 2004; Rizzuto R. et al., 2008; Zhivotovsky B. et al., 2008). Or, ces flux calciques, déterminants pour l'apoptose, sont assurés par un grand nombre de canaux présents sur la membrane plasmique ou sur les membranes internes.

Ainsi, les canaux perméables au calcium ont été les cibles de plusieurs chimiothérapies visant à abolir la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses (pour revue voir Dubois C.

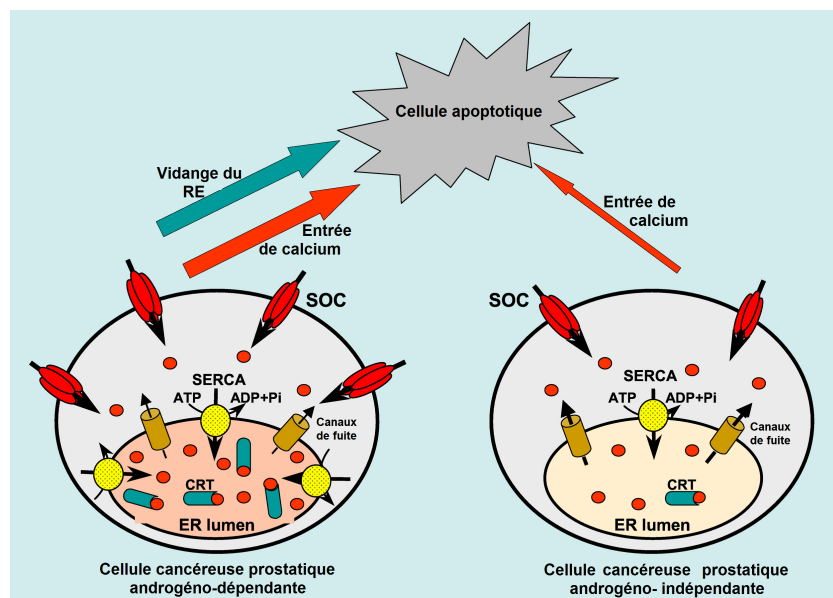


Figure 3 : Description schématique des différentes voies apoptotiques dépendantes du calcium dans les cellules cancéreuses prostatiques androgéno-dépendante (gauche) et androgéno-indépendante

et al., 2013; Prevarskaya N. et al., 2013).

L'identification des canaux calciques contrôlant l'entrée des cellules cancéreuses dans l'apoptose est donc de grande importance pour la compréhension des mécanismes moléculaires du cancer et la proposition de nouvelles cibles thérapeutiques.

Beaucoup de canaux TRP ont été détectés dans le tractus génito-urinaire (Everaerts et al., 2008) et, plus particulièrement, dans la prostate où ils participeraient à la physiologie normale de cet organe et sont soupçonnés d'être impliqués dans les affections de la prostate et notamment dans la carcinogénèse prostatique (pour revue voir Van Haute et al., 2010). Ainsi, le premier canal TRPC détecté dans la prostate fut TRPC3 (Zhu et al., 1996) et, aujourd'hui, il est connu que la plupart des canaux TRPC sont aussi exprimés dans la prostate humaine (Riccio et al., 2002). Par exemple, il a été montré que TRPC6 est abondamment exprimé dans la prostate saine et cancéreuse mais que son taux d'expression dans les cellules PCa n'est pas corrélé au score de Gleason, indice de l'avancée du cancer selon des critères morphologiques (Yue et al., 2009). Ensuite, il a été montré que les canaux TRPM 4, 8 et 2 sont également exprimés dans la prostate humaine saine et dans les adénocarcinomes prostatiques (Everaerts et al., 2008). Cependant, bien que TRPM8 ait été proposé comme oncogénique, puisqu'il est régulé positivement dans les adénocarcinomes de prostate et dans d'autres lésions néoplasiques (colon, mélanomes, adénocarcinomes du sein ou du poumon), il n'y a pas de corrélation claire entre le taux d'expression de ce canal et le grade pathologique du PCa (Bidaux et al., 2007). Enfin, dans la famille des TRPV, TRPV1 a été détecté dans la prostate et son expression augmente dans les stades avancés de PCa (Czifra et al., 2009), tout comme TRPV2 dans les cellules issues de métastases osseuses d'origine prostatique (Monet et al., 2010).

## **II. Implication du canal Orai1 et du SOCE dans la progression du cancer de la prostate vers les stades androgéno-indépendants et résistants à l'apoptose**

### **A. Implication du SOCE et du canal Orai1 dans la différenciation neuro-endocrine des cellules cancéreuses prostatiques**

#### **1. Résumé**

Dans les cellules PCa androgéno-indépendantes, la résistance à l'apoptose est liée à la diminution de l'entrée capacitive de calcium due à la diminution de l'expression des canaux SOC (Prevarskaya N. et al., 2004).

Le travail qui suit consiste à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation de la résistance à l'apoptose des cellules PCa au cours de leur transition vers le stade hormono-réfractaire le plus agressif, c'est à dire au cours de la différenciation neuro-endocrine.

Pour cela les cellules PCa androgéno-dépendantes LNCaP sont maintenues dans un milieu sans androgène (voir matériels et méthodes) afin d'induire la différenciation neuro-endocrine (NE) des cellules (Buttayan R. et al., 1999; Prevarskaya N. et al. 2002; Lin FM. Et al. 2001). Des études de Patch-clamp ont permis de montrer que le SOCE diminue significativement dans les cellules NE par rapport aux LNCaP contrôles et que cette entrée capacitive est principalement conduite par le couple Orai1-Stim1. Or, nous avons montré une diminution de l'expression génique et protéique du canal Orai1 dans les cellules NE sans modification d'expression de Stim1. Donc la diminution du SOCE dans les cellules NE est due à la diminution d'Orai1.

De plus l'extinction d'Orai1 dans des LNCaP par un siRNA dirigé contre Orai1 entraîne une réduction du nombre de cellules apoptotiques après traitement à la thapsigargine, le TNF $\alpha$  et les agents alkylants cisplatine et oxaliplatine. Or, un traitement des cellules NE à la thapsigargine provoque aussi l'apoptose mais le nombre de cellules apoptotiques est significativement plus faible que pour les cellules LNCaP et l'extinction d'Orai1 abolit partiellement cette résistance à l'apoptose. Donc, dans les cellules LNCaP, le SOCE par Orai1 est responsable de l'apoptose induite par la thapsigargine et la perte de l'expression d'Orai1 dans les cellules NE et, par conséquent, la diminution du SOCE induit par la thapsigargine est à l'origine de la résistance à l'apoptose de ces cellules cancéreuses.

Puis, l'utilisation de mutants Orai1, soit au niveau du pore (pore mutant R91W) soit au niveau du domaine d'interaction avec Stim1 (coiled-coil mutant L2735), nous a permis de surexprimer un dominant négatif non fonctionnel d'Orai1 dans les cellules LNCaP ce qui a bloqué le SOCE induit par la thapsigargine ainsi que l'apoptose des cellules cancéreuses

androgéno-dépendantes. Au contraire, une co-surexpression de Stim1 et Orai1 dans les cellules LNCaP ou NE augmente le courant SOC ainsi que le nombre de cellules apoptotiques et supprime la résistance à l'apoptose respectivement, après un traitement de thapsigargine, ce qui est aboli par la présence dans le milieu extracellulaire de chélateurs de calcium. Donc c'est bien l'influx de calcium par Orai1, déclenché par la vidange calcique du RE, qui provoque l'apoptose dans les cellules LNCaP et c'est la perte d'expression d'Orai1 qui confère leur résistance à l'apoptose aux cellules NE.

Or, les cellules NE sont androgéno-réfractaires car elles ont perdu l'expression du récepteur aux androgènes (AR) et nous avons montré que l'extinction pendant 48h du AR dans les cellules LNCaP provoque une diminution du SOCE liée à une diminution de l'expression génique d'Orai1. En effet, une analyse informatique de la séquence du gène *Orai1* a révélé plusieurs sites putatifs d'éléments de réponse aux récepteurs aux androgènes (ARE) à proximité du codon start et avec plus de 80% d'homologie. Il est donc possible que l'expression de Orai1 puisse être régulée par les androgènes.

En conclusion, l'acquisition du phénotype agressif au cours de la différenciation neuroendocrine des cellules cancéreuses prostatiques est due à la perte des récepteurs aux androgènes provoquant une diminution d'expression du canal Orai1 à l'origine de la résistance à l'apoptose induite par un stress réticulaire ([Fig.annexe4](#)). Il a également été montré que dans les cellules PCa androgéno-dépendantes l'apoptose peut être déclenchée simplement par vidange du réticulum endoplasmique (RE) mais ne nécessite pas obligatoirement de SOCE (Prevarskaya N. et al., 2000) tandis que dans les cellules PCa androgéno-indépendantes, donc possédant des récepteurs aux androgènes non fonctionnels, la vidange du RE sans SOCE n'est pas suffisante pour induire l'apoptose (Prevarskaya N. et al., 2002; Prevarskaya N. et al., 2004). L'inactivation progressive du SOCE serait donc une conséquence à la perte de AR fonctionnel directement liée à la dépendance face aux androgènes et permettant aux cellules cancéreuses d'être de plus en plus résistantes à l'apoptose induite par un stress réticulaire. Ces acteurs du SOCE ont également un rôle important dans le potentiel invasif des cellules cancéreuses du sein, l'autre cancer hormono-dépendant.

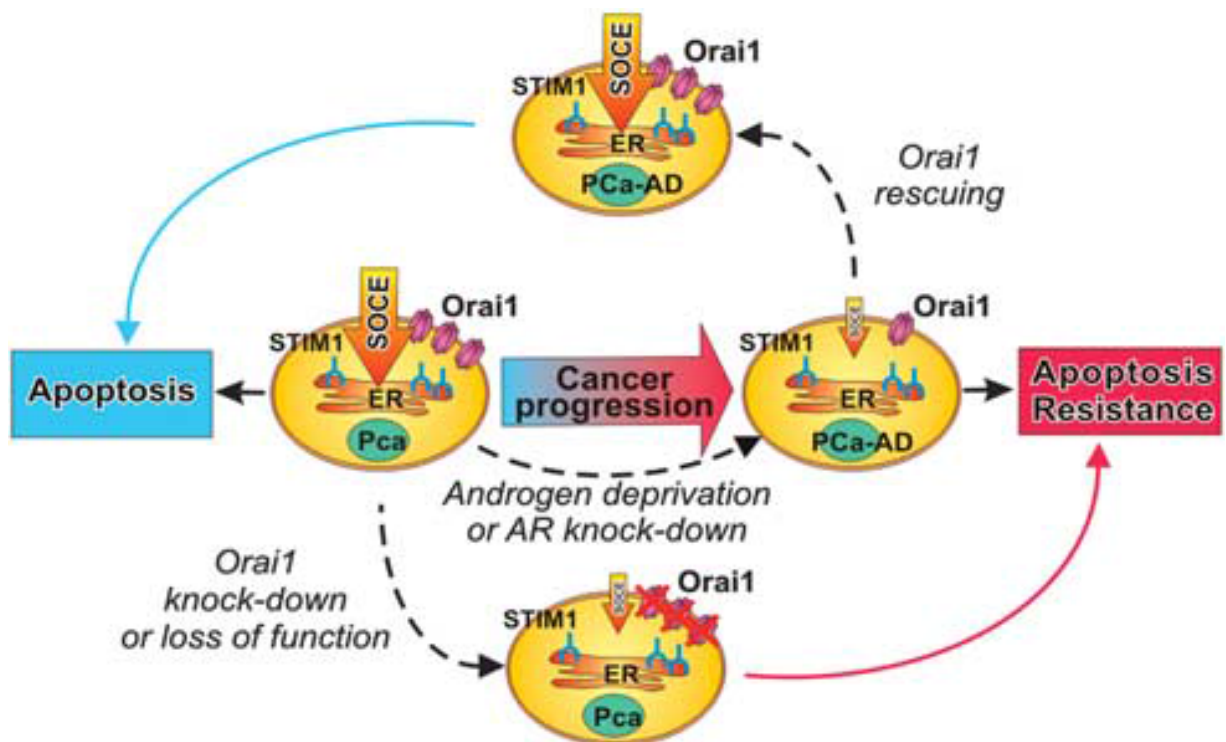


Figure 4: La diminution du SOCE est associée à la résistance à l'apoptose acquise au cours de la différenciation neuro-endocrine des cellules cancéreuses prostatiques.



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

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

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

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

Subject Category: Cancer

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Results

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

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

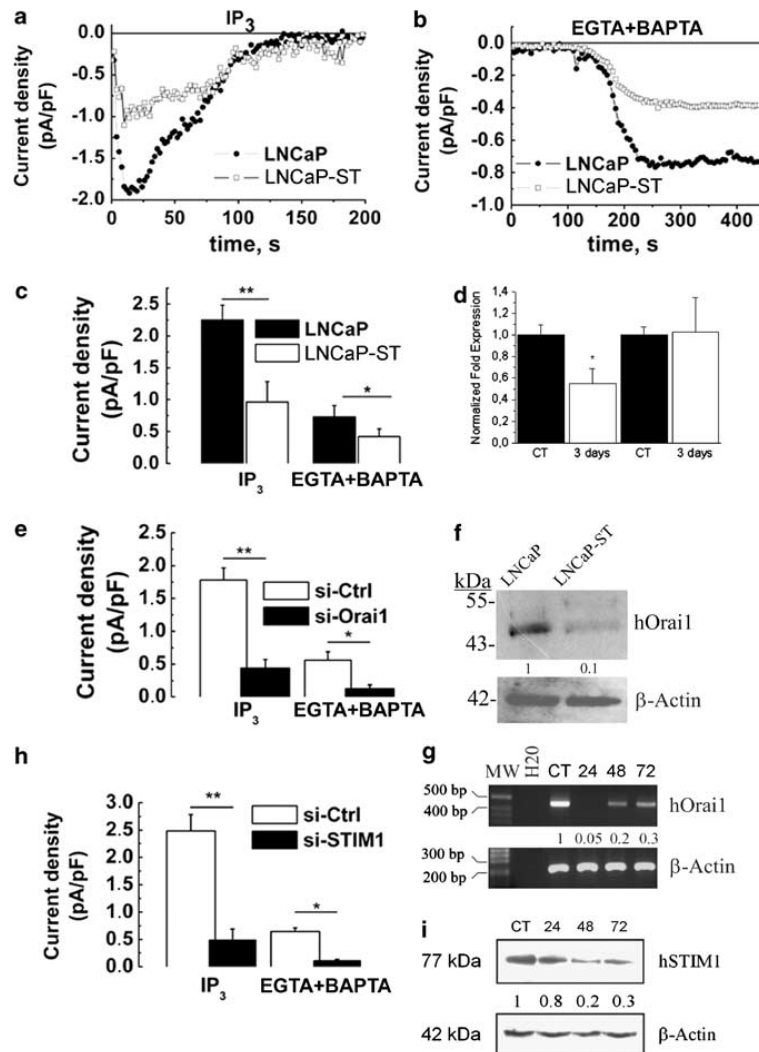
**Downregulation of Orai1 confers apoptosis resistance to LNCaP cells.** In view of the major role of Orai1 in PCa cells' SOCE and the decrease in Orai1 expression following androgen withdrawal, we next sought to examine Orai1 involvement in apoptosis. The classic apoptosis inducer, thapsigargin (Tg,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

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

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

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

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

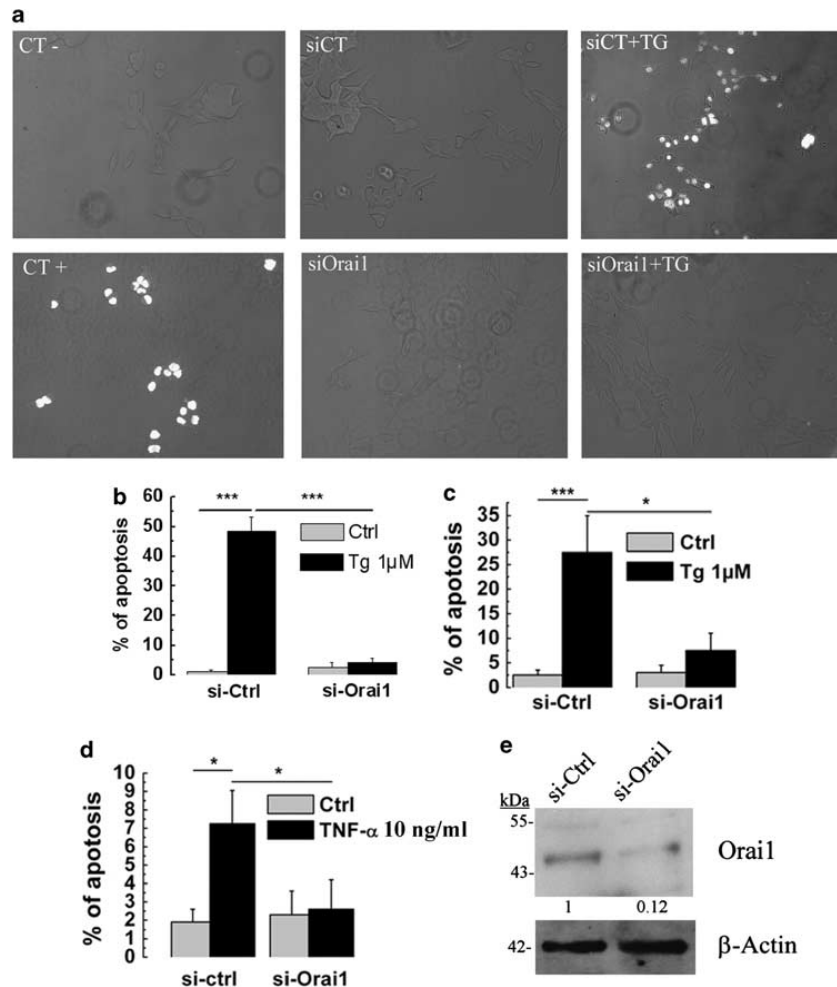


**Figure 1** The expression of Orai1 and STIM1 in steroid-deprived prostate cancer epithelial cells and their involvement in SOCE. (a, b) Representative time courses of  $I_{SOCE}$  development (measured at  $-100$  mV holding potential) in control LNCaP (black circles) and LNCaP-ST (white squares) cells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

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

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

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

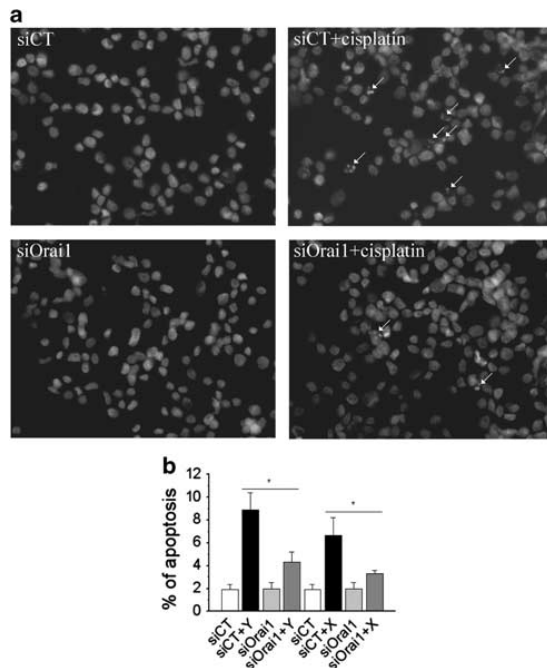


**Figure 2** Underexpression of Orai1 protects LNCaP cells against apoptosis. (a) Apoptotic cells revealed using TUNEL technique. (b) Quantification using TUNEL of the apoptosis rate (Ctrl, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg ( $1 \mu\text{M}$ , 24 h, black columns) in control LNCaP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

increase in the  $I_{\text{SOC}}$  density in response to the infusion of either  $\text{IP}_3$  or EGTA + BAPTA compared with the respective controls (Figure 4c). At the same time, the co-expression of Orai1 and STIM1 more than doubled the Tg-induced apoptosis ( $50 \pm 6\%$  versus  $22 \pm 4\%$  apoptosis rate; Figure 4d). The control of CFP-tagged Orai1 and YFP-tagged STIM1 transfections into LNCaP cells was performed using confocal microscopy (Figure 4e). Thus, the amplification of SOCE due to Orai1 and STIM1 overexpression correlates with the marked increase in Tg-induced apoptosis.

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

shown that the decrease in Orai1 expression and the density of  $I_{\text{SOC}}$  were responsible for the apoptosis resistance of androgen-deprived LNCaP-ST cells. To further demonstrate the role of Orai1 in apoptosis, we rescued Orai1 expression in LNCaP-ST cells. The cells were transfected with CFP-tagged Orai1. Orai1 overexpression in LNCaP-ST cells resulted in an approximate twofold increase of both  $\text{IP}_3$ - and EGTA + BAPTA-activated  $I_{\text{SOC}}$  densities compared with the respective controls (Figure 5a), indicating that Orai1 overexpression was able, at least in part, to rescue SOCs downregulated by androgen deprivation. This rescue essentially restored the rate of Tg-induced apoptosis



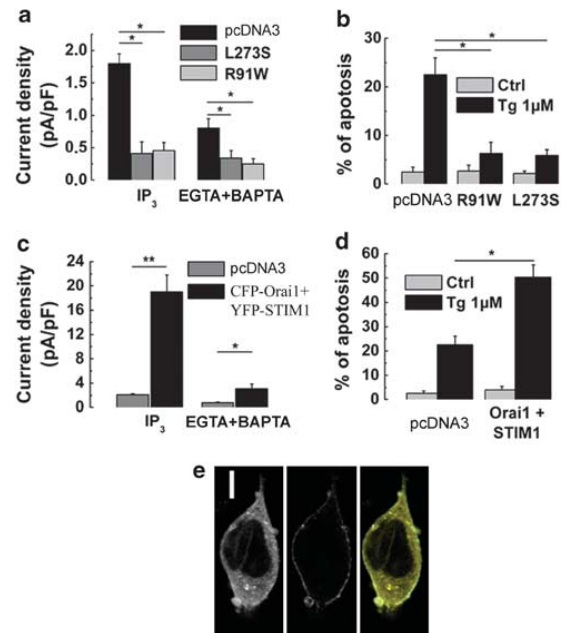
**Figure 3** The role of Orai1 in apoptosis induced by alkylating agents cisplatin and oxaliplatin. (a) Representative images of apoptosis rate measured using the Hoechst technique of LNCaP cells treated with 20  $\mu$ M cisplatin. White arrows indicate the apoptotic nuclei. (b) A corresponding histogram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

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

To establish the link between Orai1 and the androgen-independent PCA phenotype, we sought to examine whether the androgen receptor (AR) could regulate Orai1 expression. To directly demonstrate that the *orai1* gene is dependent on the functional AR, we used siRNA against AR (si-AR). As shown in Figure 5d, after 48 h of siAR transfection, the mRNA level of Orai1 was decreased by 70% in the LNCaP cells. Patch-clamp experiments using siAR-transfected cells revealed that their  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-evoked  $I_{SOC}$  were also reduced by 63% and 67%, respectively (Figure 5c). This result indicates that the AR could regulate Orai1 expression. To further study this potential regulation, we have also used the MatInspector 7.7.3 program (Genomatix Software GmbH, Munich, Germany) to analyze the putative AR binding sites on *Orai1* promoter (see the appropriate section of the discussion).

## Discussion

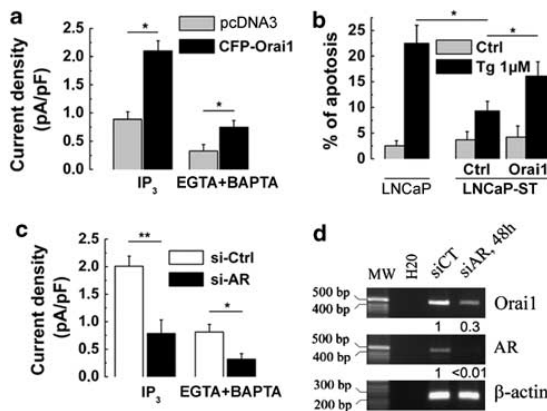
The appearance of apoptotic resistance in cancer cells is a crucial step for the development and progression of human



**Figure 4** Loss of Orai1 function protects LNCaP cells against thapsigargin (Tg)-induced apoptosis. (a) Quantification of  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in control LNCaP cells (pcDNA3, black columns,  $1.8 \pm 0.15$  pA/pF,  $n = 18$  and  $0.8 \pm 0.15$  pA/pF,  $n = 14$ , respectively) and LNCaP cells transfected with YFP-Orai1 L273S (dark gray columns,  $0.41 \pm 0.18$  pA/pF,  $n = 18$  and  $0.34 \pm 0.12$  pA/pF,  $n = 16$ , respectively) or YFP-Orai1 R91W (gray columns,  $0.46 \pm 0.12$  pA/pF,  $n = 18$  and  $0.25 \pm 0.08$  pA/pF,  $n = 16$ , respectively). (b) Quantification of the baseline apoptosis (pcDNA3, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg (1  $\mu$ M, 24 h, black columns) in control LNCaP cells (Ctrl) and LNCaP cells transfected with Orai1-L273S or Orai1-R91W mutants (quantified using Hoechst technique). (c) Quantification of  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in control LNCaP cells (Ctrl, gray columns,  $2.1 \pm 0.18$  pA/pF,  $n = 19$  and  $1.9 \pm 2.8$  pA/pF,  $n = 32$ , respectively) and LNCaP cells co-transfected with YFP-STIM1 and CFP-Orai1 (black columns,  $0.75 \pm 0.12$  pA/pF,  $n = 16$  and  $3.1 \pm 0.75$  pA/pF,  $n = 33$ , respectively). (d) Quantification of the baseline apoptosis (pcDNA3, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg (1  $\mu$ M, 24 h, black columns) in control LNCaP cells (pcDNA3) and LNCaP cells co-transfected with YFP-STIM1 and CFP-Orai1 (quantified using Hoechst technique). (e) Representative images of LNCaP cell co-transfected with YFP-STIM1 (left) and CFP-Orai1 (middle) and their overlay (right). A white bar in the left panel represents 5  $\mu$ m distance. Throughout the figure, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences with  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively

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

The involvement of  $Ca^{2+}$ -dependent mechanisms in the induction and regulation of apoptosis is now well established.



**Figure 5** Rescue of Orai1 in androgen-deprived prostate cancer cells abolishes apoptosis resistance. (a) Quantification of  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in control LNCaP-ST cells (pcDNA3, gray columns,  $0.89 \pm 0.13$  pA/pF,  $n=13$  and  $0.33 \pm 0.11$  pA/pF,  $n=14$ , respectively) and LNCaP-ST cells transfected with CFP-Orai1 (black columns,  $2.1 \pm 0.18$  pA/pF,  $n=21$  and  $0.75 \pm 0.12$  pA/pF,  $n=23$ , respectively). (b) Quantification of the baseline apoptosis (pcDNA3, DMSO-treated, gray columns) and apoptosis induced by Tg ( $1 \mu M$ , 24 h, black columns) in control LNCaP cells and in LNCaP-ST cells with or without Orai1 rescued by transfection with CFP-Orai1 (quantified using the Hoechst technique). (c) Quantification of  $IP_3$ - and EGTA + BAPTA-induced  $I_{SOC}$  densities in LNCaP following 48 h of transfection with control siRNA (si-Ctrl, white columns,  $2.01 \pm 0.19$  pA/pF,  $n=19$  and  $0.78 \pm 0.25$  pA/pF,  $n=18$ , respectively) and anti-AR siRNA (si-AR, black columns,  $0.81 \pm 0.14$  pA/pF,  $n=21$  and  $0.32 \pm 0.10$  pA/pF,  $n=15$ , respectively). (d) Representative RT-PCRs showing changes in Orai1 and androgen receptor (AR) mRNA expression in LNCaP cells following 48 h of transfection with anti-AR siRNA (si-AR) compared with the cells transfected with control si-RNA (CT); numbers represent relative amounts of Orai1 and AR mRNA compared with  $\beta$ -actin mRNA. Throughout the figure, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences with  $P < 0.05$  and  $P < 0.02$ , respectively

Alterations in the ER storage capacity and SOC activity seem to have a major role in the establishment of an androgen-independent apoptosis-resistant phenotype of PCa cells. Indeed, as we have shown in our previous works on androgen-independent, apoptosis-resistant phenotypes of LNCaP PCa cells (such as androgen-deprived LNCaP cells, LNCaP cells overexpressing the anti-apoptotic Bcl-2 protein and neuroendocrine-differentiated LNCaP cells), increased resistance to Tg- and TNF- $\alpha$ -induced apoptosis is characterized by (i) the reduced basal  $Ca^{2+}$  filling of the ER pool and (ii) reduced store-operated  $Ca^{2+}$  entry.<sup>5,13</sup> The primary trigger for apoptosis in androgen-dependent cells is ER store depletion and a sustained  $Ca^{2+}$  influx may not even be required.<sup>8</sup> Interestingly, for androgen-independent cells, ER store depletion *per se* is not sufficient to induce cell death without the lethal  $Ca^{2+}$  influx from SOCE.<sup>2,9,14</sup> Therefore, the identification of the molecular nature of SOC and their activation/regulation mechanisms are of great importance for controlling androgen-independent PCa cell apoptosis.

During recent years, a new molecular candidate for SOC termed Orai1 has been identified and characterized. Orai1 mediates CRAC currents and SOCE in a large variety of cells and is involved in a wide range of cell functions, including endothelial cell proliferation,<sup>15</sup> lymphocyte proliferation,<sup>16</sup> mast cell activation,<sup>13</sup> as well as skeletal muscle development

and a contractile function.<sup>17</sup> However, despite the suggested pivotal role of SOCs in the apoptosis resistance of PCa cells, the involvement of Orai1 in prostate-specific SOC, as well as in  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis of PCa cells, has never been studied.

In the present study, we have shown that Orai1, an ion channel in the PM, and STIM1, as a signal transducer from the ER, represent the major molecular components of SOCE in PCa epithelial cells: the siRNA-mediated knockout of any of them strongly diminishes  $I_{SOC}$  in LNCaP cells. However, as only Orai1 expression was found to decrease in LNCaP cells following androgen deprivation, we hypothesized that the downregulation of  $I_{SOC}$ , which follows the transition of PCa cells to androgen independence and apoptosis resistance, is associated, at least in part, with the reduction of Orai1 levels.

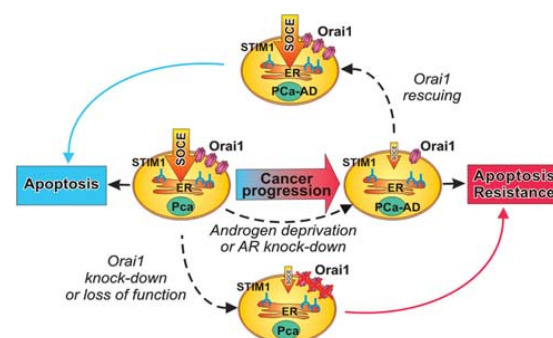
Androgen ablation therapy in prostate adenocarcinoma induces an involution of prostate tissue mainly through the enhancement of cellular apoptosis.<sup>18</sup> However, a subset of malignant cells emerges as a new population of apoptosis-resistant cells. The enrichment of the prostate with such cell phenotypes eventually causes virtually all tumors to relapse into an androgen-independent, more aggressively growing type.<sup>18</sup>

Androgens have an essential role in prostate carcinogenesis and androgen independency of the most malignant androgen-independent phenotype, which is known to arise from loss of the AR (e.g., Bonkhoff<sup>19</sup>). Therefore, we assumed that the decrease in Orai1 expression and  $I_{SOC}$  density following the induction of LNCaP cell differentiation by androgen withdrawal occurs because *orai1* gene expression might be regulated by the functional AR. Our data showed that AR silencing in LNCaP cells leads to a dramatic decrease in Orai1 expression as well as in  $I_{SOC}$  density. The structure of the promoter of such a classic androgen-dependent gene as the prostate-specific antigen usually includes an androgen-responsive element (ARE) close to the transcriptional start site and other AREs located several kilobase pairs upstream within the enhancers.<sup>20</sup> In order to estimate a possible *orai1* gene regulation by AR, we studied the human *Orai1* promoter sequence. The genomic sequence corresponding to 6200 bp upstream and 100 bp downstream of hOrai1 ATG was used for the transcription factor analysis. The MatInspector 7.7.3 program was used to analyze the putative AR binding sites.<sup>21</sup> The *orai1* promoter sequence was analyzed for the presence of AREs using a prostate-specific matrix, which is associated with transcription factors that are expressed and transcriptionally active in this tissue. We identified several AREs: three of them located at -3700, -4105 and -4700 bp from the *Orai1* ATG codon with more than 80% of matrix similarity. These results may suggest that *Orai1* is probably an androgen-responsive gene in the prostate. Moreover, given that Orai1 represents a key component of prostate-specific SOC, we hypothesized that the decrease of functional SOCs during PCa progression to the aggressive androgen-independent stage results from downregulation of the functional AR and ultimately the deregulation of *Orai1*.

The transition to the androgen-independent phenotype not only influences Orai1 expression and the SOCE, but, more importantly, the acquisition of apoptosis resistance also.

We have found that susceptibility of the cells to the induction of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis was always in direct correlation with Orai1 expression and  $I_{SOC}$  density: the lower the current density (i.e., low Orai1 expression), the higher the apoptosis resistance is (i.e., low apoptosis rate). This correlation existed independently of the experimental tools used to reduce Orai1 expression and activity: the androgen-dependence status of the LNCaP cells (i.e., androgen deprivation or AR silencing), the targeted downregulation of Orai1 (anti-Orai1 siRNA) or Orai1 mutants. Interestingly, the pro-apoptotic effects of Orai1 were independent of the apoptosis-inducing stimuli. Orai1 downregulation is likely to diminish the sustained cytosolic  $Ca^{2+}$  increase and protect PCa cells from apoptosis. We first used a classical  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis inducer, Tg. Tg is a very powerful tool and as such was even recently proposed to be used as a 'smart bomb' to target androgen-independent PCa.<sup>22</sup> Our data demonstrate that Tg-evoked apoptosis was predominantly mediated via Orai1 activation and the efficient knockdown of the latter may be an important means to protect the cell from eventual death. To distinguish between direct and indirect  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis, we used another apoptosis inducer,  $TNF\alpha$ , a pro-inflammatory cytokine that deregulates  $Ca^{2+}$  homeostasis by inducing ER stress. According to our previous observations,  $TNF\alpha$  is an effective pro-apoptotic agent of PCa epithelial cells.<sup>9</sup> Indeed,  $TNF\alpha$  induced apoptosis of the LNCaP cells; however, even this non-direct  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism was significantly blocked by the Orai1 knockdown, suggesting that Orai1-mediated  $Ca^{2+}$  entry has a major role in apoptosis, especially in its early phase. Furthermore, we used two other strong apoptosis inducers: cisplatin and oxaliplatin. These alkylating agents react *in vivo* by binding to and causing crosslinking of DNA, which ultimately triggers apoptosis (for a review, see Gonzalez *et al.*<sup>23</sup>). Cisplatin-induced DNA damage seems to be a long and complex process of cell death and because cisplatin is a nonspecific drug that reacts not only with DNA but also with proteins, there is a possibility that an easier process of initiation, such as damage to cytoplasmic proteins, may take place.<sup>23</sup> Moreover, inhibition of the proteasome induces ER stress and also activates the unfolded protein response, thereby triggering apoptosis.<sup>24</sup> Cisplatin has also been shown to stimulate ER stress and increase ER dilation, intracellular  $Ca^{2+}$  levels, and cell death.<sup>25</sup> This eventually links cisplatin with ER stress and increased intracellular  $Ca^{2+}$  levels, which may be successfully inhibited by Orai1 knockdown with the consecutive downregulation of  $I_{SOC}$  and apoptosis in general. In fact, we have previously shown that ER stress induces  $Ca^{2+}$  entry,<sup>26</sup> and we observed that 24-h pretreatment with either cisplatin or oxaliplatin increases the cytoplasmic [ $Ca^{2+}$ ].

Finally, recent studies, concerning Orai1 activation, have shown that the overexpression of both Orai1 and STIM1 induces a 20-fold increase in the  $I_{SOC}$ , resulting in a 'monster CRAC'.<sup>27</sup> The gain of SOC function in the androgen-dependent LNCaP cells in response to the overexpression of Orai1 and STIM1 was manifested by the appearance of a high-amplitude  $I_{SOC}$ , which led to the marked enhancement of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis. Moreover, the rescue of the  $I_{SOC}$  function by Orai1 overexpression in androgen-deprived apoptosis-resistant LNCaP cells is able to restore the



**Figure 6** Schematic diagram summarizing the principal findings of this study. The progression to androgen-independent PCa is associated with the appearance of new cell phenotypes characterized by decreased resistance to  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis. This natural process, which occurred in the *in vivo* tumors, can be mimicked by the artificial silencing of Orai1 expression or inhibition of Orai1 function with dominant-negative mutants. On the other hand, rescuing Orai1 in androgen-independent PCa cell phenotypes can restore the normal rate of  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis, thus providing the means for the perspective therapies of advanced PCa

apoptosis rate close to that of androgen-dependent PCa cells. This result is especially impressive, as it is relevant to the development of perspective therapies for advanced, androgen-independent PCas.

Thus, we have shown the involvement of Orai1 as a principal molecular component of native SOCs in the  $Ca^{2+}$ -dependent apoptosis of PCa cells. Our results conclude that the transition to the androgen-independent PCa phenotype is associated with the loss of Orai1 expression leading to the downregulation of SOCE, which precludes cytosolic  $Ca^{2+}$  increases that are sufficient enough to induce apoptosis via well-known mitochondrial and cytosolic mechanisms. In addition, reduced SOCE may contribute to the chronic underfilling of ER  $Ca^{2+}$  stores, which represent the new state of equilibrium for androgen-independent PCa cells,<sup>2</sup> further enhancing their apoptosis resistance (Figure 6).

Our data are consistent with the notion that SOCE and Orai1 are important players in apoptosis induction. However, it seems that apoptosis is not the only process directly related to SOCE. A recent study revealed that Orai1/STIM1 and SOCE are also essential for breast tumor cell migration, invasion and metastasis.<sup>28</sup> It also has been shown that the SOCE and STIM1/Orai1 are involved in migration, proliferation,<sup>29</sup> and cell cycle progression.<sup>30</sup> Thus, Orai1/STIM1 and SOCE seem to have important roles in the wide spectrum of  $Ca^{2+}$ -dependent cancer-related behaviors, and are expected to have a significant impact on future research.

#### Materials and Methods

**Cell culture.** The androgen-dependent human PCa cell line LNCaP was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and maintained in culture in RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France), 5 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France), and kanamycin 100  $\mu$ g/ml. Charcoal-stripped fetal calf serum (10%) was added to phenol red-free RPMI medium together with kanamycin and L-glutamine (as above) to

**Table 1** List of primers used for Q-PCR assays (1–5) and siRNA sequences targeting hOrai1(6) or hSTIM1 (7)

No.	Name (accession no.)	Forward (5'–...–3')	Backward (5'–...–3')	Expected product size (bp)
1.	hSTIM1 (NM_003156)	<i>TGTGGAGCTGCCTCAGTATG</i>	<i>CTTCAGCACAGTCCCTGTCA</i>	112
2.	hOrai1 (NM_032790)	<i>ATGGTGGCAATGGTGGAG</i>	<i>CTGATCATGAGCGCAAACAG</i>	115
3.	HPRT (NM_000194)	<i>GGCGTCGTGATTAGTGTATG</i>	<i>CGAGCAAGACGTTCAAGTCTT</i>	134
4.	hOrai1 (NM_032790)	<i>CTTCAGTGCCTGCACCACAG</i>	<i>CCTGGAAGTGTCTGGTCAGTC</i>	450
5.	$\beta$ -Actin (NM_001101)	<i>CAGAGCAAGAGAGGCATCCT</i>	<i>GTTGAAGGTCTCAAACATGATC</i>	209
6.	hOrai1 siRNA	5'-UGAGCAACGUGCACAUCU (dTdT)-3'		
7.	hSTIM1 siRNA	5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)-3'		

Sequences for the Q-PCR are indicated in italic script.

create steroid-deprived conditions. Cells were grown at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The medium was replaced every 48 h. For the experiments, cells were seeded in six-well plates for PCR and western blotting, 35-mm culture for the patch-clamp experiments, and onto glass coverslips for the confocal microscopy.

**Electrophysiology and solutions.** Macroscopic currents were recorded from LNCaP cells in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht/Pfalz, Germany), as previously described.<sup>26</sup>

The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, and 10 HEPES, pH 7.4 (adjusted with TEA-OH), osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-mannitol. The patch pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA (1.2-bis(2-aminophenoxy)ethane *N,N,N',N'*-tetraacetic acid), and 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.4 with CsOH and osmolarity 295 mOsm/kg adjusted with D-mannitol). The necessary supplements in the desired concentrations were added to the experimental solutions directly from the appropriate stock solutions, dissolved in water, ethanol or dimethylsulfoxide. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). In the course of the patch-clamp recording, drugs and solutions were applied to the cells through the multiline microperfusion system with common outflow (Cell MicroControls, Norfolk, VA, USA) placed in close proximity (~200  $\mu$ m) to the studied cell. The experiments were carried out at room temperature.

**Western blotting.** LNCaP cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. The lysates were centrifuged at 15 000  $\times$  g and 4°C for 20 min, mixed with a sample buffer containing 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue, and boiled for 5 min at 95°C. The total protein samples were subjected to 8–10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry western blotting (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The membrane was blocked in a 5% milk TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.4, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) overnight, and then probed using a specific rabbit polyclonal anti-Orai1 antibody (1 : 200, ProScience, Poway, CA, USA) anti-mouse monoclonal anti-STIM1 antibody (1 : 250, BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) and anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co., Fremont, CA, USA, 1/1000) antibodies. The bands on the membrane were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce Biotechnologies Inc., Fremont, CA, USA). A densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories).

**RT-PCR.** RT-PCR experiments were performed as previously described.<sup>31</sup> DNA amplification conditions included the initial denaturation step of 7 min at 95°C, and 36 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C, and 30 s at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Primers used are listed in Table 1.

**siRNA transfection.** LNCaP cells were transfected with 50 nM of siRNA against Orai1, STIM1, and AR (Dharmacon Inc., Fremont, CA, USA) using 6  $\mu$ l Hyperfect transfection reagent (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France), following the manufacturer's instructions (see Table 1 for the siRNA sequences).

**Nucleofection.** The transfection of LNCaP with different plasmids was carried out using Nucleofector (Amaxa GmbH, Köln, Germany) according to the

manufacturer's instructions. In brief, 2  $\mu$ g of the plasmid was transfected into 2 million trypsinized cells, which were then plated onto six-well dishes, 35-mm dishes or onto glass coverslips for 48 h.

**Immunocytochemistry.** Cells grown on glass coverslips were washed once with PBS and fixed in 3.5% paraformaldehyde in PBS. Fluorescence analysis was carried out using a Carl Zeiss LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200M with 63  $\times$  1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature. Both channels were excited, collected separately, and then merged to examine colocalization using Carl Zeiss LSM Image Examiner software (Le Pecq, France).

**Apoptosis assay.** The level of apoptosis was estimated from the number of apoptotic nuclei revealed either by TUNEL assay (Roche Biochemicals, Burlington, NC, USA) or by Hoechst staining. The percentage of apoptotic cells was determined by counting at least five random fields for each condition done in triplicate for each *n* (the detailed procedure has been described previously).<sup>8</sup>

**Quantitative real-time PCR.** The quantitative real-time PCR of Orai1, STIM1, and HPRT mRNA transcript was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, Angers, France) on the Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequences of primers are indicated in Table 1. The HPRT gene was used as an endogenous control to normalize variations in the RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results, we used the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen.<sup>32</sup>

**Cloning of Orai1 and STIM1 and the site-directed mutagenesis.** All of the procedures used to clone Orai1 and STIM1 and to create the two Orai1 mutants, the 'selectivity mutant' R91W and the 'coiled-coil mutant' L273S, have been previously described in detail.<sup>12</sup>

**Data analysis.** For each type of experiment, data were accumulated from at least five measurements. Electrophysiological data were analyzed offline using HEKA (HEKA Electronic) and Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA) software. The results were expressed as mean  $\pm$  S.E.M., where appropriate. A Student's *t*-test was used for the statistical comparison of the differences, with *P* < 0.05 considered as significant. In the graphs, (\*) and (\*\*) denote statistically significant differences of *P* < 0.05 and *P* < 0.01, respectively.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Ministère de l'Éducation Nationale et Ligue Nationale Contre le Cancer.

- Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T *et al*. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* 2003; **300**: 135–139.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ca<sup>2+</sup> homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **322**: 1326–1335.



3. Pinton P, Giorgi C, Siviero R, Zecchini E, Rizzuto R. Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* 2008; **27**: 6407–6418.
4. Norberg E, Gogvadze V, Ott M, Horn M, Uhlen P, Orrenius S *et al*. An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1857–1864.
5. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H. Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 2002; **53**: 118–123.
6. Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis *in vitro* and confers resistance to androgen depletion *in vivo*. *Cancer Res* 1995; **55**: 4438–4445.
7. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN *et al*. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med* 2004; **351**: 1502–1512.
8. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, Vanden Abeele F *et al*. Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 2000; **527** (Pt 1): 71–83.
9. Vanoverbergh K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, Bonnal JL *et al*. Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 321–330.
10. Zhang SL, Yu Y, Roos J, Kozak JA, Deerinck TJ, Ellisman MH *et al*. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 2005; **437**: 902–905.
11. Liao Y, Exleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 4682–4687.
12. Muik M, Frischauf I, Derler I, Fahrner M, Bergsmann J, Eder P *et al*. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 8014–8022.
13. Ng SW, di Capite J, Singaravelu K, Parekh AB. Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 2008; **283**: 31348–31355.
14. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, Roudbaraki M *et al*. Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 2002; **1**: 169–179.
15. Abdullaev F, Bludov YV, Dmitriev SV, Kevrekidis PG, Konotop VV. Generalized neighbor-interaction models induced by nonlinear lattices. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2008; **77** (Pt 2): 016604.
16. Gwack Y, Feske S, Srikanth S, Hogan PG, Rao A. Signalling to transcription: store-operated Ca(2+) entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* 2007; **42**: 145–156.
17. Striber J, Hawkins A, Zhang ZS, Wang S, Burch J, Graham V *et al*. STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 688–697.
18. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate* 1996; **28**: 251–265.
19. Bonkhoff H. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 2001; **12**: S141–S144.
20. Nantermet PV, Xu J, Yu Y, Hodor P, Holder D, Adamski S *et al*. Identification of genetic pathways activated by the androgen receptor during the induction of proliferation in the ventral prostate gland. *J Biol Chem* 2004; **279**: 1310–1322.
21. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A *et al*. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; **21**: 2933–2942.
22. Denmeade SR, Isaacs JT. The SERCA pump as a therapeutic target: making a 'smart bomb' for prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 2005; **4**: 14–22.
23. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; **59**: 657–663.
24. Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, Achsel T, Piacentini M, Ceconi F. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem* 2006; **281**: 2693–2700.
25. Nawrocki ST, Carew JS, Dunner Jr K, Boise LH, Chiao PJ, Huang P *et al*. Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2005; **65**: 11510–11519.
26. Flourakis M, Van Coppenolle F, Lehen'kyi V, Beck B, Skryma R, Prevarskaya N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* 2006; **20**: 1215–1217.
27. Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M *et al*. Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 771–773.
28. Yang S, Zhang JJ, Huang XY. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* 2009; **15**: 124–134.
29. Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, Abdullaev IF, Bisailon JM, Singer HA *et al*. Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J* 2009; **23**: 2425–2437.
30. Smyth JT, Petranka JG, Boyles RR, DeHaven WI, Fukushima M, Johnson KL *et al*. Phosphorylation of STIM1 underlies suppression of store-operated calcium entry during mitosis. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1465–1472.
31. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N. TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 2007; **26**: 7380–7385.
32. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.



**Cell Death and Disease** is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

## 2. Discussion

L'acquisition du processus de résistance à l'apoptose par les cellules cancéreuses est une étape cruciale pour le développement et la progression des PCa humaines vers le phénotype réfractaire aux hormones, indépendant des androgènes. Nous avons mis en évidence trois caractéristiques permettant de comprendre ce mécanisme de résistance à l'apoptose dans les PCa : (i) une diminution du courant SOCE endogène dans les cellules PCa indépendantes des androgènes due à une diminution de l'expression du canal Orai1 ; (ii) la diminution du SOCE et de l'expression de Orai1 permet à la cellule PCa d'être résistante à l'apoptose induite par un stress réticulaire et donc sa progression vers le phénotype hormono-réfractaire ; (iii) Orai1 est l'élément clé reliant le calcium et l'apoptose dans ces cellules, quelque soit le stimulus pro-apoptotique.

L'implication de mécanismes dépendant du calcium régulant l'apoptose est maintenant bien connue. L'altération de la capacité de stockage du RE et de l'activité du SOCE semble avoir un rôle majeur dans l'acquisition par les cellules PCa d'un phénotype androgéno-indépendant et résistant à l'apoptose. En effet, comme il a déjà été montré au laboratoire, les cellules PCa LNCaP peuvent acquérir le phénotype androgéno-indépendant résistant à l'apoptose lorsqu'elles sont privées d'androgènes, lorsqu'elles surexpriment la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et lors de la différenciation neuro-endocrine. Ces cellules résistent à l'apoptose induite par la Thapsigargine et le TNF $\alpha$  et sont caractérisées par une diminution du stock calcique réticulaire et de l'entrée capacitive de calcium (SOCE) (Fixemer et al., 2002; Ng et al., 2008). Or, l'événement déclenchant l'apoptose dans les PCa dépendantes des androgènes est la vidange du RE tandis que l'entrée soutenue de calcium par le SOCE n'est pas indispensable (Skryma et al., 2000). Pour les PCa indépendantes des androgènes, la vidange du réticulum uniquement n'est pas suffisante, sans l'influx calcique SOCE, pour induire la mort cellulaire (Vanden Abeele et al., 2002; Vanoverberghe et al., 2004; pour revue voir Prevarskaya et al., 2004). De plus, le mécanisme d'activation et la nature moléculaire des canaux SOC, notamment Orai1, ont été montrés dans plusieurs types cellulaires. Le SOCE a ainsi été impliqué dans les fonctions cellulaires telles que la prolifération des cellules endothéliales (Abdullaev et al., 2008) et des lymphocytes (Gwack et al., 2007), l'activation des mastocytes (Ng et al., 2008), ou encore le développement et la contraction du muscle squelettique (Stiber et al., 2008). Cependant, malgré le rôle important du SOCE dans la résistance à l'apoptose des cellules PCa, l'implication de Orai1 dans le SOCE prostatique tout comme dans l'apoptose induite par le calcium dans les cellules PCa n'avait jusque là pas été étudiée.

Dans notre étude, nous avons démontré que le canal ionique Orai1 et la protéine détectant le calcium dans le RE, Stim1, sont les principaux acteurs du SOCE dans les cellules PCa puisque l'extinction de l'un des deux par des ARN interférents réduit significativement le courant SOCE dans les LNCaP. Cependant, Orai1 est le seul dont l'expression diminue dans les LNCaP privées d'androgènes. Nous avons donc émis l'hypothèse que la diminution du SOCE lors de la transition des cellules PCa vers l'indépendance aux androgènes et la résistance à l'apoptose est associée, au moins en partie, à la perte d'expression d'Orai1.

Lors d'un adénocarcinome prostatique, la thérapie par castration chimique, basée sur la privation d'androgène, provoque tout d'abord une régression du cancer en induisant principalement l'apoptose des cellules. Ensuite, une population minoritaire de cellules résistantes à l'apoptose émerge formant une tumeur récidivante de cellules PCa indépendantes aux androgènes et à croissance plus agressive (Denmeade et al., 1996). La plupart des cellules cancéreuses indépendantes aux androgènes doivent leur phénotype à la perte du récepteur nucléaire aux androgènes (AR) (Bonkhoff, 2001). Il est possible que la diminution de l'expression d'Orai1 suite à l'acquisition du phénotype androgéno-indépendant soit liée à la perte du récepteur aux androgènes (AR) si le gène *orai1* est sous dépendance du AR fonctionnel. Or, nos résultats ont montré que l'extinction du AR par un siARN mène à une diminution dramatique de l'expression d'Orai1 et du courant SOCE. Nous avons alors étudié la séquence du promoteur d'*orai1* par le logiciel MatInspector 7.7.3 (Cartharius et al., 2005) dans lequel nous avons identifié trois sites putatifs, avec plus de 80% de similarité, d'éléments de réponse du récepteur aux androgènes (ARE) à -3700, -4105 et -4700 en amont de l'ATG. Ces données suggèrent que *orai1* pourrait être un gène cible du AR dans les cellules épithéliales prostatiques.

La transition des cellules PCa vers le phénotype indépendant aux androgènes n'influence pas uniquement l'expression d'Orai1 ou le SOCE mais aussi, et surtout, augmente la résistance à l'apoptose. Nous avons démontré que l'apoptose induite par le calcium est directement en relation avec l'expression de Orai1 et le courant SOC (plus l'influx calcique SOCE est faible, plus les cellules PCa sont résistantes à l'apoptose). Nous avons utilisé différents inducteurs de l'apoptose dépendante du calcium dans les PCa. La thapsigargine induit la mort des cellules PCa par une activation directe de la vidange réticulaire (Denmeade and Isaacs, 2005). Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui perturbe l'homéostasie calcique en induisant un stress réticulaire et induit l'apoptose dans les cellules PCa (Vanoverberghe et al., 2004). Les agents alkylants cisplatine et oxaliplatine peuvent endommager l'ADN mais aussi les protéines et provoquer une réponse UPR, accompagnée à long terme par un stress réticulaire, une augmentation du calcium cytosolique et la mort cellulaire (Di Sano et al., 2006; Nawrocki et al., 2005; pour revue voir Gonzalez et al., 2001). Il avait également déjà été montré au laboratoire qu'un stress réticulaire induit un influx calcique dans le cytoplasme (Flourakis et al., 2006) et nous avons montré ici qu'un traitement de 24h par du cisplatine ou de l'oxaliplatine provoque une augmentation du calcium basal dans les cellules PCa LNCaP. L'extinction de Orai1 provoque une résistance à l'apoptose induite par ces 4 différents inducteurs dans les LNCaP. Au contraire, il a été montré qu'une surexpression de Orai1 et Stim1 est à l'origine d'un SOCE jusqu'à 20 fois plus grand (Peinelt et al., 2006). Or, restaurer le SOCE par une surexpression de Orai1 et Stim1 permet de re-sensibiliser les cellules PCa LNCaP privées d'androgènes aux inducteurs de l'apoptose à un niveau quasi-identique à celui des LNCaP contrôles

Le SOCE et Orai1 ont également été impliqués dans la migration et l'invasion métastatique des cellules cancéreuses mammaires (Yang et al., 2009) ainsi que dans la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires (Potier et al., 2009). Ces résultats sont intéressants dans l'optique de développer de nouvelles thérapies contre les adénocarcinomes récidivants de la prostate.

## **B. La réorganisation du cytosquelette, un mécanisme alternatif de contrôle du SOCE dans les cellules neuro-endocrines issues de cellules cancéreuses prostatiques**

### **1. Résumé :**

Nous avons vu précédemment que lors de la différenciation neuro-endocrines (NE) les cellules cancéreuses prostatiques (PCa) deviennent résistantes à l'apoptose induite par un stress réticulaire car l'influx calcique provoqué par le SOCE est amoindri suite à la diminution d'expression du canal Orai1, principal canal SOC dans ce type cellulaire. Ici nous allons voir qu'il existe un autre mécanisme à l'origine de la diminution du SOCE dans les cellules NE.

En effet, nous voyons une fois de plus que la différenciation NE des cellules LNCaP dans un milieu dépourvu d'androgène provoque progressivement une diminution d'environ 60% de l'expression génique de Orai1 sans modification d'expression de Stim1, Orai2 ou Orai3. De plus, après 24H de différenciation, il n'y a qu'une légère baisse de l'entrée capacitive de calcium sans modification du stock calcique réticulaire alors qu'après 4 jours de différenciation, le SOCE est significativement réduit et il y a une diminution de la vidange calcique traduisant aussi une diminution du stock calcique dans le RE. Cette différenciation connaît également des modifications du cytosquelette avec la formation de longues extensions dendritiques suivant le réseau des denses microfilaments d'actine. Or, pour fonctionner le SOCE requiert la mobilisation des protéines Stim1 dans les domaines réticulaires proches de la membrane plasmique et l'interaction entre Stim1 et Orai1. L'acquisition d'un cytosquelette rigide serait donc néfaste au bon fonctionnement du SOCE. Afin d'étudier l'impact du cytosquelette des cellules NE sur le SOCE, nous avons utilisé 3 « poisons », la cytochalasine D (cytD) qui déstabilise le réseau d'actine, la jasplakinolide (JP) et la caliculine A (calA) qui induisent la polymérisation des actines globulaires. Dans un premier temps, nous avons remarqué que l'application de thapsigargine (Tg) sur les cellules NE induit toujours la relocalisation des protéines Stim1 en points focaux après la vidange du calcium réticulaire. Donc le cytosquelette dense des cellules NE ne perturbe pas la migration des Stim1 sur le RE. L'utilisation de cytD sur les cellules NE provoque, en seulement 10 minutes, la perte des longues fibres de stress d'actine sans faire disparaître les longs neurites mettant en jeu les microtubules alors que la JP et la calA provoquent la formation de larges faisceaux condensés d'actine. D'un point de vue électrophysiologique, l'utilisation de la cytD sur les LNCaP provoque une diminution et un retard du SOCE alors que sur les cellules NE, cela augmente le SOCE induit par la Tg qui se développe aussi rapidement que dans les LNCaP contrôles. Donc la dépolymérisation du réseau dense d'actine favorise l'interaction entre Stim1 et Orai1 dans les cellules NE mais une déstabilisation trop importante du cytosquelette d'actine ne permet plus d'assurer l'activation d'Orai1 par Stim1. Au contraire une rigidification du cytosquelette d'actine provoque une diminution et un retard

dans le développement du SOCE dans les LNCaP qui ressemble alors au SOCE de cellules NE sans « poison » et diminue encore plus le SOCE des cellules NE.

Enfin les traitements utilisés n'entraînent pas de modification de l'expression génique des acteurs étudiés ou de variation dans la vidange réticulaire.

En conclusion, la vidange du RE, plus faible dans les cellules NE, n'est pas le résultat de l'hyperpolarisation des microfilaments d'actine mais provoque un défaut dans l'activation du SOCE probablement aussi impliqué dans la résistance à l'apoptose des cellules NE contrôles.

# Cytoskeleton Reorganization as an Alternative Mechanism of Store-Operated Calcium Entry Control in Neuroendocrine-Differentiated Cells

Karine Vanoverberghe<sup>1,2,3</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>1,2,3</sup>, Stéphanie Thébault<sup>1,2,3</sup>, Maylis Raphaël<sup>1,2,3</sup>, Fabien Vanden Abeele<sup>1,2</sup>, Christian Slomianny<sup>1,2</sup>, Pascal Mariot<sup>1,2</sup>, Natalia Prevarskaya<sup>1,2\*</sup>

**1** Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France, **2** Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France

## Abstract

Neuroendocrine differentiation (NED) is a hallmark of advanced androgen-independent prostate cancer, for which no successful therapy exists. NED tumour cells escape apoptotic cell death by alterations of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis where the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE) is known to be a key event. We have previously shown that the downregulation of Orai1 protein representing the major molecular component of endogenous SOCE in human prostate cancer cells, and constituting the principal source of  $\text{Ca}^{2+}$  influx used by the cell to trigger apoptosis, contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype (Cell Death Dis. 2010 Sep 16;1:e75). Here, we report for the first time that the decrease of SOCE during NED may be caused by alternative NED-induced mechanism involving cytoskeleton reorganisation. NED induced by androgen deprivation resulted in a decrease of SOCE due to cortical F-actin over-polymerization which inhibits thapsigargin-induced SOCE. The disruption of F-actin polymerization by Cytochalasin D in NED cells restored SOCE, while the induction of F-actin polymerization by jasplakinolide or calyculin A diminished SOCE without changing the expression of key SOCE players: Orai1, STIM1, and TRPC1. Our data suggest that targeting cytoskeleton-induced pathways of malignant cells together with SOCE-involved channels may prove a useful strategy in the treatment of advanced prostate cancer.

**Citation:** Vanoverberghe K, Lehen'kyi V, Thébault S, Raphaël M, Vanden Abeele F, et al. (2012) Cytoskeleton Reorganization as an Alternative Mechanism of Store-Operated Calcium Entry Control in Neuroendocrine-Differentiated Cells. PLoS ONE 7(9): e45615. doi:10.1371/journal.pone.0045615

**Editor:** Rossella Rota, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Italy

**Received:** May 24, 2012; **Accepted:** August 23, 2012; **Published:** September 25, 2012

**Copyright:** © 2012 Vanoverberghe et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC), the Ligue Nationale contre le Cancer and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

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

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Neuroendocrine differentiation (NED) is a process which occurs in several types of carcinomas. Prostatic carcinoma belongs to the tumours in which NED is suggested as an indicator of poor prognostic as the rate of NED of prostate cancer cells increases with the grade of the prostate cancer [1,2,3]. Even though NED is the subject of intense research, the molecular and cellular mechanisms involved in this process remain unclear.

Prostate cancer (PCa), the second cause of cancer-related men disease in western countries, depends on androgen in the early stages. Androgen deprivation therapies also cause prostate tumour regression. However, such treatments become unsuccessful when PCa cells progress to an androgen-independent stage [4]. Therefore, assessing the mechanisms occurring during the evolution to androgen-independence appears to be crucial. We and others have previously demonstrated that the androgen-dependent LNCaP (Lymph Node Carcinoma of the Prostate, [5] PCa epithelial cells acquire NED characteristics in response to long-term androgen ablation [6,7,8].

It is well known that as NED cells are androgen-independent [9] and characterized by an apoptotic cell death resistance [10,11].

Tumour enrichment in NED cells enhances the malignant potential and drastically affects cancer cell responsiveness to androgen ablation therapy [12]. Normally present in the healthy prostate where they participate in the development and in the regulation of secretory processes of the mature gland, NED cells display structural, functional and morphological characteristics of neurons [12,13,14]. Their resistance to apoptosis does not seem to involve anti-apoptotic oncoprotein bcl-2 overexpression but rather the discovered survival proteins such as survivin and clusterin [15,16,17]. Despite these data, continuing effort is required to determine all characteristic features of NED cell apoptosis-resistance in an attempt to find new targets for therapeutic intervention in advanced PCa.

We previously demonstrated that NED of LNCaP cells induced alterations in  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis including reduced filling of the endoplasmic reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$  store, decreased expression of the endolemmal SERCA 2b  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase and the luminal  $\text{Ca}^{2+}$  binding calreticulin and down-regulated store-operated current ( $I_{\text{SOC}}$ ) [18]. Moreover, NED LNCaP cells display a thapsigargin-(Tg) induced apoptosis resistance. It is well established that Tg induces apoptosis by depleting ER  $\text{Ca}^{2+}$  store followed by a store-operated or capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry (SOCE or CCE) carried by

SOC channels [19]. One of them Orail, represents the major molecular component of endogenous SOCE in human PCa cells, and constitutes the principal source of  $\text{Ca}^{2+}$  influx used by the cell to trigger apoptosis [20]. The downregulation of Orail, and consequently SOCE, protected the cells from diverse apoptosis-inducing pathways, such as those induced by thapsigargin (Tg), tumour necrosis factor  $\alpha$ , and cisplatin/oxaliplatin. Orail rescue, following Orail transfection of steroid-deprived cells, re-established the store-operated channel current and restored the normal rate of apoptosis, suggesting its role in the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in PCa cells. Thus, the apoptosis resistance of androgen-independent PCa cells is associated with the downregulation of Orail expression as well as SOCE. On the other hand, the TRP (transient receptor potential) proteins family which is widely distributed in mammalian tissues [21] is currently known to play a crucial role in the generation of SOCE. Even though their physiological mechanisms of activation and regulation are still unclear, several processes have been proposed to explain SOCE regulation: at the level of TRP proteins expression, or TRP channel activity regulation by accessory proteins [22,23], or by TRPC channels internalization/membrane insertion caused by cytoskeleton reorganization [24,25,26,27,28,29]. Indeed, it has been reported that TRPC channels activity involves their integration in plasmalemmal signaling complexes [30,31], whose stability depends at least on cytoskeleton integrity, especially the actin polymerization. In this respect and as TRP channels and Orail play a key role in SOCE which is one of the pro-apoptotic pathway in NED cells we sought to study how cytoskeleton rearrangements may influence the activity of SOCE, the NED itself, and consequently apoptosis resistance of PCa cells.

## Materials and Methods

### Cell Culture

LNcaP cells from the American Type Culture Collection were cultured in RPMI 1640 medium (Biowhittaker, Fontenay sous Bois, France) supplemented with 5 mM L-glutamine (Sigma, L'Isle d'Abeau, France) and 10% fetal bovine serum (Seromed, Poly-Labo, Strasbourg, France). The culture medium also contained 50,000 IU/l penicillin and 50 mg/l streptomycin. Cells were routinely grown in 50 ml flasks (Nunc, Poly-labo) and kept at 37°C in a humidified incubator in an air/CO<sub>2</sub> (95/5%) atmosphere. For Ca<sup>2+</sup> imaging experiments, the cells were subcultured in Petri dishes (Nunc) coated with polyornithine (Sigma, 5 mg/l) and used after 3 to 6 days. Prior to fluorescence measurements, the cells were removed from the culture flasks with 0.05% trypsin (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and cultivated on glass coverslips in the same culture medium.

### Charcoal Stripped Medium

Tubes containing charcoal 10% (w/v) and FBS were agitated for 16 hours at 4°C. Following 1 hour of centrifugation at 10000 g and 4°C, the supernatant was collected and centrifuged again for 30 min at 27000 g. The resultant supernatant was filtrated through 0.22  $\mu\text{m}$  filters. Before use, the charcoal stripped FBS was decomplexed for 30 min at 56°C. The charcoal stripped culture was obtained using charcoal stripped FBS and RPMI 1640 without Phenol Red, for 4 days.

### Calcium Imaging

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was measured using fura-2 (the detailed procedure has been described previously, [32]). The extracellular solution contained: NaCl-120, KCl-6, CaCl<sub>2</sub>-2, MgCl<sub>2</sub>-2, HEPES-10,

and glucose-12. For Ca<sup>2+</sup>-free HBSS, CaCl<sub>2</sub> was removed and EGTA (0.5 mM) added.

### Electrophysiological Recordings

Membrane currents in LNcaP cells were recorded in the whole-cell configuration using the patch-clamp technique, and also using a computer-controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic, Germany) as described previously [33]. Patch pipettes were made on a P-97 puller (Sutter, USA) from borosilicate glass capillaries (WPI, USA). Extracellular solution used to record Ca<sup>2+</sup>-carried I<sub>SOCE</sub> contained (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 10 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 glucose, 10 HEPES (pH adjusted to 7.3 with TEA OH). The pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs Methane sulfonate, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 BAPTA, 6 MgCl<sub>2</sub> (pH adjusted to 7.2 with CsOH).

### Immunostaining

Cells were cultivated on 14 mm diameter glass coverslips. After 4 days of culture, cells were rinsed once with PBS (pH7.5), fixed with 4% formaldehyde-1X PBS for 30 min, treated with 100 mM glycine-PBS for 30 min, permeabilized with methanol triton 1% for 20 min, and then washed three times with PBS. After washing, the samples were blocked with donkey serum for 30 min, then incubated with the FITC-phalloidin (1:100) 1 hour at 37°C or overnight when cells are treated with pharmacological compounds. After washing, samples were then mounted on glass slides. Slides were examined on a confocal microscope (Zeiss LSM 510) equipped with an argon-krypton laser; 488 nm light was used for the excitation of the FITC-phalloidin, and images were collected using a 40X oil immersion objective.

### Western-blotting

Subconfluent LNcaP cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl, 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and protease inhibitor cocktail from Sigma. The lysates were centrifuged 15,000×g at 4°C for 20 minutes, mixed with a sample buffer containing: 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.01% bromphenol blue, and boiled for 5 min at 95°C. Total protein samples were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semi-dry Western blotting (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked in a 5% milk containing TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) overnight then probed using specific rabbit polyclonal anti-hStim1 (1:250, BD Transduction Laboratories) and mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co.) antibodies. The bands on the membrane were visualized using enhanced chemiluminescence method (1:1000, Pierce Biotechnologies Inc.). Densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories).

### RT-PCR

Total RNA was isolated using the guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction procedure. After DNase I (Life Technologies) treatment to eliminate genomic DNA, 2  $\mu\text{g}$  of total RNA was reverse transcribed into cDNA at 42°C using random hexamer primers (Perkin Elmer) and MuLV reverse transcriptase (Perkin Elmer) in a 20  $\mu\text{l}$  final volume, followed by PCR as described below. The PCR primers used to amplify hStim1, hOrail, Orail2, Orail3 cDNAs as well as the primers for  $\beta$ -actin are specified in Table 1. PCR was performed on the RT-generated cDNA using a GeneAmp PCR System 2400 thermal cycler

(Perkin Elmer). To detect different cDNAs, PCR was performed by adding 1  $\mu$ l of the RT template to a mixture of (final concentrations): 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP, 600 nM of sense and antisense primers, and 1 U AmpliTaq Gold (Perkin Elmer) in a final volume of 25  $\mu$ l. DNA amplification conditions included an initial 5 min denaturation step at 95°C (which also activated the Gold variant of Taq Polymerase), and 33 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 59°C, 30 sec at 72°C, and finally 7 min at 72°C. Then, density measurements were performed with “Quantity one” software (Biorad) and the data were analyzed using Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA).

#### Quantitative Real-time PCR

Quantitative real-time PCR of TRPC1, STIM1, Orail and HPRT mRNA transcripts was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec, France) on the Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequences of primers are indicated in Table 1. The HPRT gene was used as an endogenous control to normalize variations in RNA extractions, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. To quantify the results we used the comparative threshold cycle method  $\Delta\Delta C(t)$ .

#### Reagents and Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma (I'Isle d'Abeau, France) except fura-2/AM and thapsigargin (France Biochem, Meudon, France).

#### Data Analysis and Statistics

Each experiment was repeated at least three times (n). The data were analyzed using PulseFit (HEKA Electronics, Germany) and Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using ANOVA, and  $p < 0.05$  was considered as significant. Asterisks denote: \* -  $p < 0.05$ , and \*\* -  $p < 0.01$ .

#### Results

As it was currently well established that long-term androgen deprivation induces the NED of LNCaP cells [6,8,18,34], we have used a 4-days androgen deprivation by means of charcoal stripped culture medium, in order to induce NED of LNCaP cells (NED-LNCaP). The functional results obtained on NED-LNCaP cells

were compared with regular androgen-dependent LNCaP cells (CT-LNCaP), which served as a control.

#### NED Downregulates Ca<sup>2+</sup> Store-depletion and Subsequent Store-operated Ca<sup>2+</sup> Entry

Our first aim was to determine the effect of NED on endoplasmic reticulum (ER) Ca<sup>2+</sup> stores filling status. The cells were first bathed in a Ca<sup>2+</sup>-free buffered solution and then exposed to a SERCA pumps inhibitor, thapsigargin (Tg at 1  $\mu$ M). Ca<sup>2+</sup> was released from ER Ca<sup>2+</sup> stores into the cytosol by Tg, leading to a transient increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. Subsequently, 2 mM extracellular Ca<sup>2+</sup> was added in the perfusion to permit capacitative calcium entry (SOCE) following store depletion. In these experimental conditions, the NED treatment did not significantly affect the basal Ca<sup>2+</sup> level in the absence of extracellular Ca<sup>2+</sup> ( $52 \pm 1.7$  nM in CT-LNCaP *versus*  $45 \pm 1.6$  nM in NED-LNCaP,  $n = 240$ ). In contrast, a 4-days NE differentiation treatment induced a  $\sim 30\%$  decrease in both store depletion and CCE (CT-LNCaP,  $311 \pm 16$  nM and  $1600 \pm 30$  nM,  $n = 180$  *versus* NED-LNCaP,  $210 \pm 11$  nM and  $1090 \pm 46$  nM,  $n = 253$ , Fig. 1A). A one-day NED treatment only affected CCE (CT-LNCaP  $1946 \pm 22$ ,  $n = 152$  *versus* NED-LNCaP  $1793 \pm 23$ ,  $n = 135$ , Fig. 1B). These results are in accord to our previous data showing that NED caused significant modifications in Ca<sup>2+</sup> homeostasis, as a reduced filling of the ER Ca<sup>2+</sup> store and substantial I<sub>SOCE</sub> down-regulation [18]. In the separate series of experiments we have checked the expression of SOCE key players as Orail, Orail2, Orail3, and STIM1 using semiquantitative (Fig. 1E) and real-time quantitative PCR for Orail and STIM1 (Fig. 1F). Only Orail expression changed twice as we have previously published [20].

#### NED Affects ER Ca<sup>2+</sup> Stores Depletion through Actin Network Over-polymerization

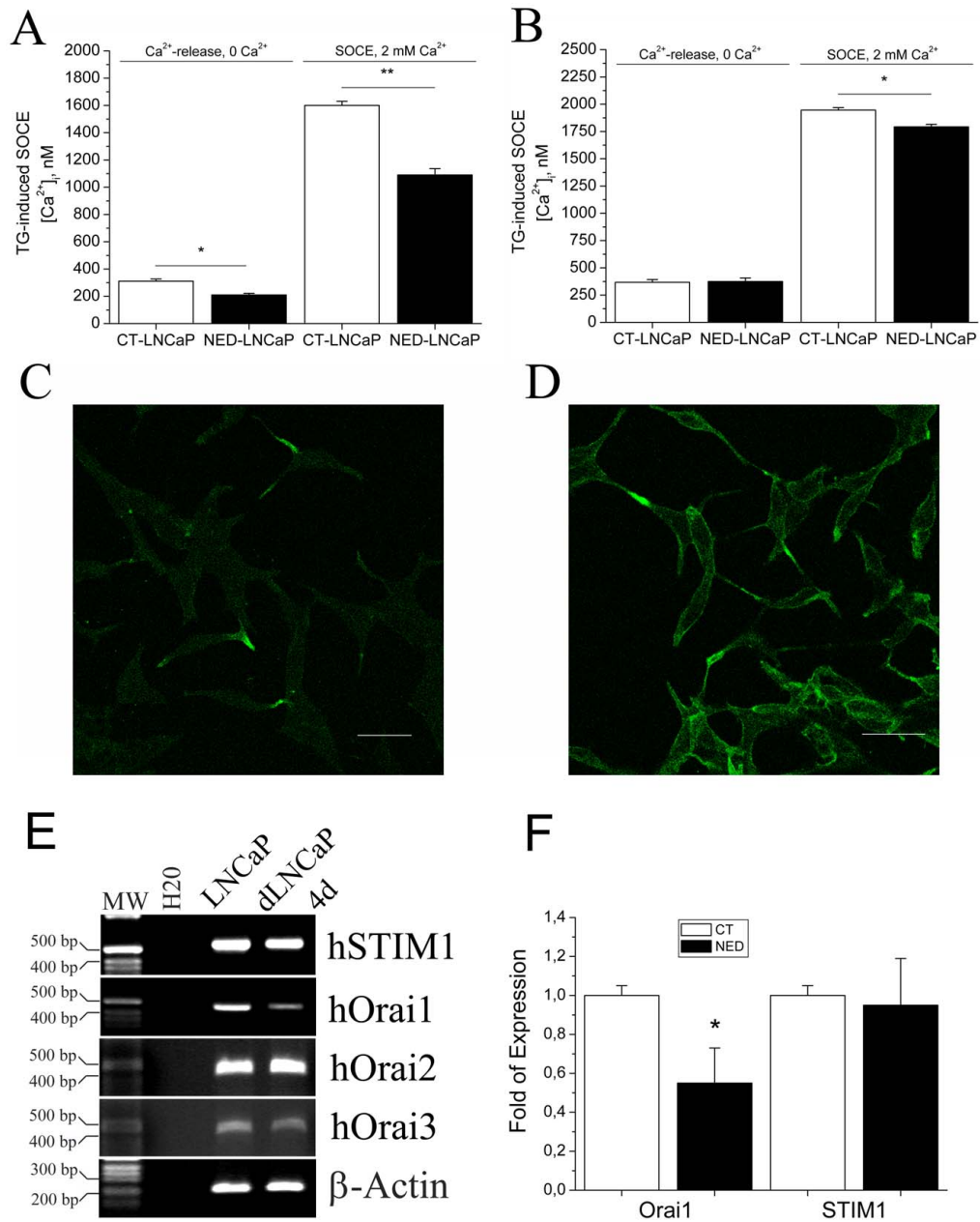
During NED we and others have previously demonstrated that NED-LNCaP cells acquired dendritic-like extensions containing F-actin which is localized under the plasma membrane [7,35,36]. Our immunohistochemical staining using confocal microscopy showed over-polymerization of F-actin in NED-LNCaP cells (Fig. 1D) compared to CT-LNCaP cells (Fig. 1C). We have verified if in NED-LNCaP cells STIM1 is still able to form punctae upon ER Ca<sup>2+</sup> store depletion. 1  $\mu$ M TG was able to induce the formation of punctae upon 1  $\mu$ M TG treatment during 2 minutes (Fig. 2). Thus, we have confirmed the formation of punctae by STIM1 in NED-LNCaP cells.

**Table 1.** Primers used for the for semiquantitative PCR and the real-time quantitative PCR (*in italic script*).

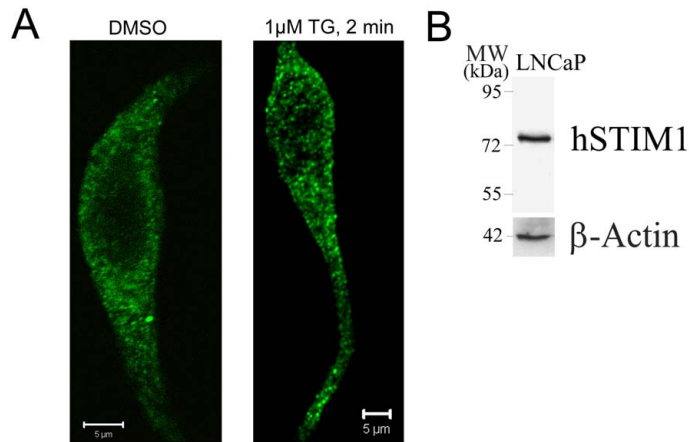
No	Name (Accession No)	Forward (5'...-3')	Backward (5'...-3')	Expected Size (b.p)
1.	hSTIM1 (NM_003156)	GCGGGAGGGTACTGAG	TCCATGTCATCCACGTCGTC	533
2.	hOrail (NM_032790)	CTTCAGTGCCTGCACCACAG	CCTGGAACCTGTCGGTCAGTC	450
3.	hOrail2 (NM_032790)	GGAGACGCAGTACCAGTACC	GTGAAGACCACGAAGATGAGG	395
4.	hOrail3 (NM_032790)	CTGGAGAGTGACCACGAGTAC	GAGATTGGAAGCTGGACTAAG	380
5.	$\beta$ -Actin (NM_001101)	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	209
6.	Orail (NM_032790)	ATGGTGGCAATGGTGAG	CTGATCATGAGCGCAAACAG	115
7.	TRPC1 (NM_003304)	TTAGAGCTGGACTGGCCAAA	ATGCACATTGTGTCTGCAA	95
8.	STIM1 (NM_003156)	TGTGGAGCTGCCTCAGTATG	CTTCAGCACAGTCCCTGTC	112
8.	HPRT (NM_000194)	GGCGTCTGATTAGTGATGAT	CGAGCAAGACGTTCACTCT	134

doi:10.1371/journal.pone.0045615.t001





**Figure 1. Regulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and F-actin polymerization in NED-LNCaP cells.** After 4 (A) or one (B) days of culture in a charcoal-stripped culture medium used to induce NED, the capacitative Ca<sup>2+</sup> entry quantified by Ca<sup>2+</sup> imaging is induced by the application of 1 μM Tg in the presence of 2 mM extracellular CaCl<sub>2</sub>. Asterisks denote statistical significance \* - p<0.05; \*\* - p<0.01, n = 3, N = 30–40 cells, in triplicates. The presence of F-actin fibres was observed in both CT-LNCaP (C) and NED-LNCaP (D) using phalloidin-FITC. Scale bar equals 10 μM. n = 3. E, Expression of Orai1, STIM1, Orai2, and Orai3 as compared to β-Actin in LNCaP cells and NED-LNCaP cells using semiquantitative PCR. n = 2. F, Quantitative real-time PCR for Orai1 and STIM1 in LNCaP (CT) versus LNCaP-NED (NED), n = 3, \* - P<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0045615.g001



**Figure 2. STIM1 forms punctae in NED-LNCaP cells upon induction of SOCE by TG.** (A) NED-LNCaP cells stimulated either with DMSO (left panel) or treated with 1  $\mu$ M TG for 2 min and stained with STIM1 antibody. Scale bar equals 5  $\mu$ m.  $n = 3$ . (B) Western-blotting showing the expression of STIM1 protein in LNCaP cells using the anti-STIM1 antibody.  $n = 1$ . doi:10.1371/journal.pone.0045615.g002

We have shown above that NED of LNCaP cells decreased the Tg-evoked SOCE (Fig. 1). Pharmacological treatments that destabilize the cortical actin network (CytD) prevent the activation of SOCE [37]. Using cytochalasin D (CytD, 3  $\mu$ M, 10 min at 37°C) allows to interfere with the cytoskeleton and depolymerise the actin network [38] in both CT- and NED-LNCaP cells which leads to disappearance of long stress fibres in CT-LNCaP cells (Fig. 3A, top panel). Although stress fibres were broken, the neurite outgrowth of NED-LNCaP cells seemed to be always present, suggesting that NED may involve microtubules (Fig. 3A, bottom panel). The effects of CytD on SOCE of NED-LNCaP measured on-line as compared to NED-LNCaP only are shown in Fig. 3B. Depolymerization of F-actin by CytD (3  $\mu$ M for 10 min at 37°C) decreased the Tg-induced SOCE in CT-LNCaP cells ( $1556 \pm 37$  nM for CT,  $n = 33$  versus  $1345 \pm 31$  nM for CT-CytD,  $n = 40$ ) and partially restored the Tg-induced SOCE in NED-LNCaP ( $620 \pm 63$  nM for NED,  $n = 33$  versus  $871 \pm 90$  nM for NED-CytD,  $n = 42$ ) (Fig. 3C). Depolymerization of actin does not have the same effect on SOCE according to the differentiation status of LNCaP cells.

In patch-clamp experiments we intended to see whether the observed effects of NED and actin depolymerisation on SOCE correlate with the store-operated membrane current. Using whole-cell electrophysiological recording and TG-evoked SOCE we have shown (Fig. 4) that NED largely suppresses store-operated membrane currents ( $0.61 \pm 0.05$  for NED-LNCaP versus  $1.34 \pm 0.047$  pA/pF in control LNCaP,  $n = 23$ ) and actin depolymerisation by CytD (3  $\mu$ M, 10 min) only partially restores it ( $1.02 \pm 0.06$  versus  $0.061 \pm 0.05$  pA/pF in NED-LNCaP,  $n = 23$ ). These results suggest that the over-polymerization of the cortical F-actin observed during the NED may be a key event in the down-regulation of the Tg-induced SOCE in NED-LNCaP cells.

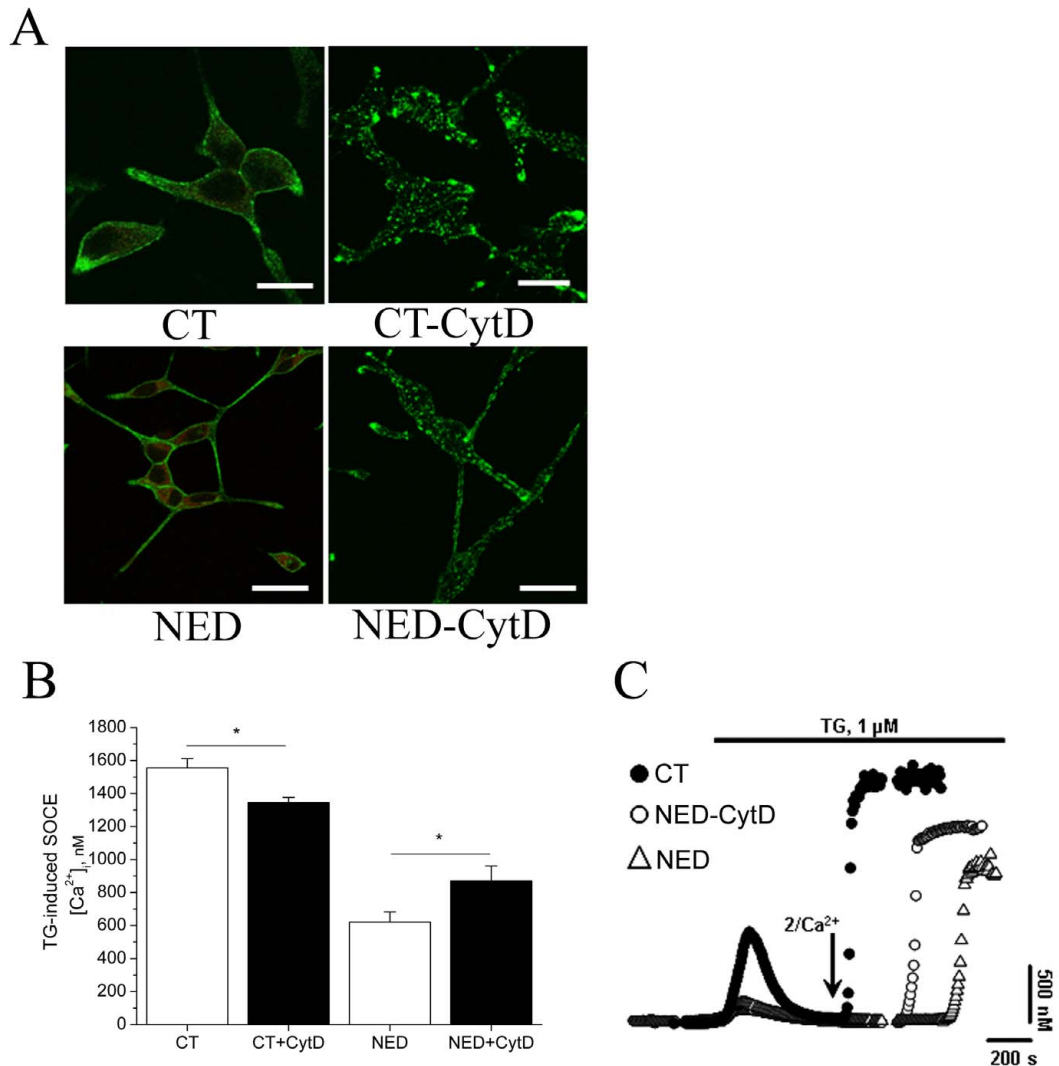
To validate this hypothesis, we tested the effect of actin polymerization on Tg-evoked SOCE by using jasplakinolide (JP). The polymerizing effect of JP on actin is presented in CT- and NED-LNCaP cells (Fig. 5A). JP treatment (5  $\mu$ M for 1 hour at 37°C) reduced SOCE amplitude in both CT- ( $1079 \pm 209$  nM for

CT-JP,  $n = 40$  versus  $1577 \pm 83$  for CT,  $n = 44$ ) and NED-LNCaP cells ( $955 \pm 88$  nM for NED,  $n = 52$  versus  $587 \pm 95$  nM for NED-JP,  $n = 52$ ; Fig. 5B). The most interesting point to note is that the amplitude of SOCE in JP-CT-LNCaP cells, resulting from actin polymerization, is similar to the amplitude of SOCE in NED-LNCaP cells.

Further, we used calyculin A (CalA) which specifically blocks PPI and PP2A phosphatases, inducing cytoskeleton reorganization similar to that induced by JP [39]. In many cell types, actin either becomes condensed at the plasma membrane or condenses into actin bundles inside the cells [40,41]. The polymerizing effect of CalA on actin is presented in NED-LNCaP cells (Fig. 6A). Identical action is observed in CT-LNCaP cells (data not shown). In both CT-LNCaP and NED-LNCaP cells, Tg-induced SOCE was decreased by a rapid treatment with CalA (50 nM for 10 min) (Fig. 6B) ( $1352 \pm 41$  nM for CalA-CT,  $n = 74$  versus  $1588 \pm 52$  nM for CT,  $n = 66$ ) and in NED-LNCaP cells ( $1119 \pm 50$  nM for CalA-NED,  $n = 56$  versus  $1374 \pm 43$  nM for NED,  $n = 62$ ). These observations matched those described with a JP treatment.

As it was previously mentioned, the most interesting finding is that JP-induced actin polymerization treatment mimics the down-regulatory effect of NED on SOCE in NED-LNCaP cells. This would indicate that the cytoskeleton reorganization may be one pathway used by NED to down-regulate SOC channels activity supporting SOCE in LNCaP cells.

Finally, to prove that during our treatments no transcription *de novo* takes place we have performed a real-time quantitative PCR using the primers for Orai1, STIM1, and TRPC1 (Fig. 7). Cells (LNCaP and NED-LNCaP) were stimulated with either CytD, 3  $\mu$ M, 10 min or CalA 50 nM for 10 min both at 37°C, RNA was extracted, reverse-transcribed and a real-time quantitative PCR was performed. As we can see from the Fig. 7, no significant changes in Orai1, STIM1, and TRPC1 expression were detected in either CytD or CalA treated cells. Thus the cytoskeleton reorganisation may take a significant role in modulation of membrane currents and SOCE in both control and NED prostate cancer cells.



**Figure 3. Cytochalasin D treatment disrupts the F-actin in both CT- and NED-LNCaP cells and partially restores the SOCE in differentiated LNCaP cells.** (A) CT-LNCaP (top panel) and NED-LNCaP cells (bottom panel) were treated with 5  $\mu\text{M}$  Cyt D for 10 min at 37°C and stained for F-actin using phalloidin-FITC. Scale bar equals 10  $\mu\text{M}$ .  $n = 3$ . (B) Histograms representing Tg-induced SOCE quantification in CT-, CT-CytD-, NED- and NED-CytD-LNCaP cells. The SOCE was quantified by the application of 1  $\mu\text{M}$  Tg in the presence of 2 mM extracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .  $n = 3$ ,  $N = 30\text{--}40$  cells, in triplicates, \*  $p < 0.05$ . (C) Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration measured in fura-2 loaded cells showing that depolymerization of F-actin in NED-CytD-LNCaP treated cells partially restores the amplitude of the SOCE. doi:10.1371/journal.pone.0045615.g003

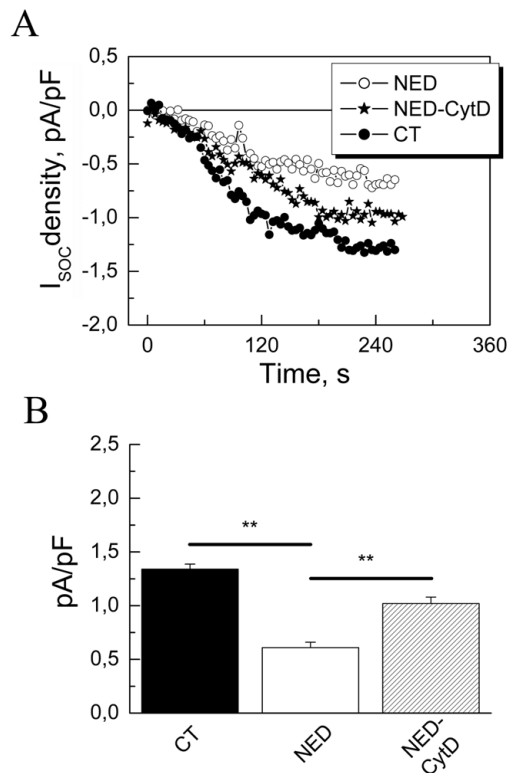
## Discussion

In the present study we report two major findings characterizing the alternative pathway by which NED may contribute apoptosis resistance in PCa. Firstly, we describe that NED mediates SOCE down-regulation through cytoskeleton reorganization, especially F-actin over-polymerization. Secondly, we show that cytoskeleton

reorganization is a pathway used by NED to down-regulate SOC channels activity without changing their expression.

### NED and Calcium Homeostasis Linked by Cytoskeleton

The activation of SOCE is a signalling process of great relevance as this mechanism is a key event in physiological processes such as cellular proliferation and apoptosis [42]. In



**Figure 4. Cytochalasine D (CytD) partially restores the store-operated current induced by TG.** (A) The whole-cell electrophysiological recordings of SOCE induced by 1  $\mu$ M TG in LNCaP cells control (CT), NED (NED), and NED LNCaP cells treated with 3  $\mu$ M CytD (NED-CytD). (B) Histograms showing the current density quantifications in the above conditions,  $n=3$ ,  $N=23$ ; in triplicates, \*\* -  $p<0.01$ . doi:10.1371/journal.pone.0045615.g004

pioneer works [18,43], we showed that NED of LNCaP cells induced by long-term androgen-deprivation decreases the well-characterized store-operated  $Ca^{2+}$  current ( $I_{SOC}$ ). Here, we confirm by  $Ca^{2+}$  imaging measurements that NED in the same conditions down-regulated the SOCE amplitude. In addition, we also show that the Tg-induced SOCE decrease may result from a decrease in  $Ca^{2+}$  stores depletion in NED-LNCaP cells.

Despite these data, the activation mechanisms of SOCE are still unclear. However, three main hypothesis are proposed to explain SOC channels activity regulation: one related to a diffusible messenger termed CIF (Calcium Influx Factor) [44], the second involves a conformational coupling between the plasma membrane [45] and the ER and the last one supporting an exocytosis-related translocation of SOC channels [24,25,27,28,29]. It is known that the two last mechanisms involve cytoskeleton rearrangement [46] as cytoskeleton has been shown to modulate SOCE [47,48]. Indeed, the accumulation of F-actin into a cortical layer under plasma membrane after treatment with calyculin A and jasplakinolide prevents SOC channels activation in several models [49,50]. In addition, cell morphology has been shown to play an essential role in agonist-induced ER  $Ca^{2+}$  stores depletion

in endothelial cells [48]. We first studied the potential cytoskeleton involvement in ER  $Ca^{2+}$  store depletion as this process is the key event in SOCE induction [51,52]. We and others have previously shown that NED causes the rearrangement of the cortical F-actin [18,53]. Our data show that actin polymerization enhances, whereas actin depolymerization decreases Tg-induced  $Ca^{2+}$  stores depletion in undifferentiated LNCaP cells. Our results correlate with those obtained by Wang *et al.* (2002) on primary hippocampal cell cultures [54]. As both polymerizing (jasplakinolide and calyculin A) and depolymerizing agents (cytochalasine D) affect Tg-evoked  $Ca^{2+}$  stores release whatever the differentiation status of LNCaP cells, we suggest that the  $Ca^{2+}$  stores depletion down-regulation in NED-LNCaP cells does not result from the actin over-polymerization.

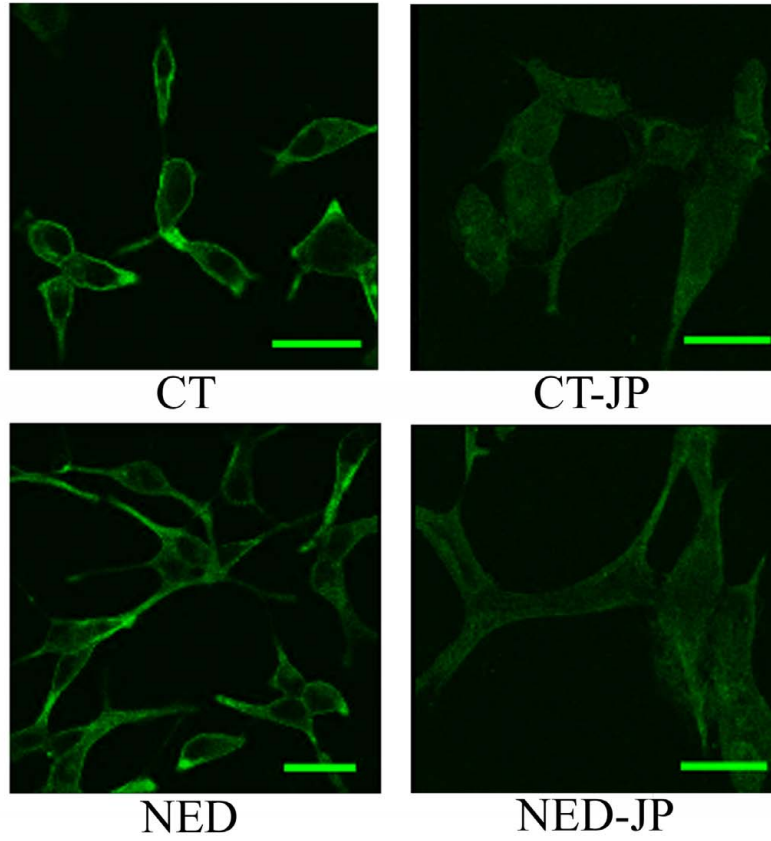
Concerning SOCE, as previously mentioned, cytoskeleton can regulate SOCE in many cellular types [49,51,55]. Although CytD induces filaments depolymerization, its predominant effect is the induction of filaments dissociation from the plasma membrane [49]. In this case, we show that depolymerization of cortical F-actin and its detachment from the plasma membrane refreshes the SOCE in NED-LNCaP cells. In contrast, the stimulation of the polymerization of the cortical F-actin by JP potentiates the SOCE amplitude decrease. Furthermore, the SOCE amplitude of JP-CT-LNCaP cells is identical to that of NED-LNCaP cells. This suggests that the polymerization of F-actin due to JP reproduces the NED effect on LNCaP cell's cytoskeleton. The results obtained in control cells are in agreement with studies on vascular endothelial cells and human platelets [47,50]. The conflicting effect produced by the CytD in control and NED cells can be explained by the percentage of F-actin contained in cells and suggests that in control cell, the cytoskeleton is required for channel function. This may also suggest the involvement of physical-coupling model in SOCE induction.

It has been suggested that Cal A activates a translocation of existing F-actin to the cell periphery, independent of polymerization and consistent with the phosphorylation events described above [49]. In our model, this translocation seems to be grouped around a pole of the cell. In these conditions, CalA failed to exactly reproduce the JP effect. Therefore, we suggest that, under NED, cortical F-actin is desorganized exclusively at the cell periphery. In summary, our data strongly suggest that the cytoskeleton reorganization may be another pathway used by NED to down-regulate SOC channels activity without changing their expression and consequently downregulate SOCE in LNCaP cells.

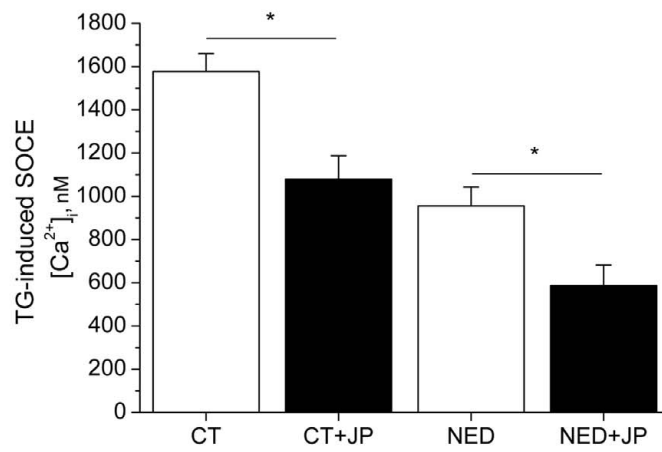
#### Possible Mechanisms of SOCE-downregulation by NED

TRP (Transient Receptor Potential) protein family was shown to be involved in SOCE [46,56,57]. The mechanisms of TRP-channel regulation are still the subject of intense research as SOCE activation and down-regulation seems to be required in physiological processes such as immune response [27]. Several processes have been proposed to explain SOCE regulation: at the level of TRP proteins expression [58], activity regulation of TRP channels due to accessory proteins [59,60] or by TRPC channels internalization/membrane insertion caused by cytoskeleton reorganization [24,25,26,27,28,29]. TRP proteins are characterized by an ankyrin domain permitting the connection of proteins to the cytoskeleton. Consequently, modulations of the polymerization state of the cortical F-actin could modulate the activation of the TRP proteins. Indeed, Lockwich *et al.* have shown that the status of the actin cytoskeleton affects the localization of the TRPC3-associated signalling complex. These authors suggest that stabilization of cortical actin induces internalization of TRPC3 and

A



B



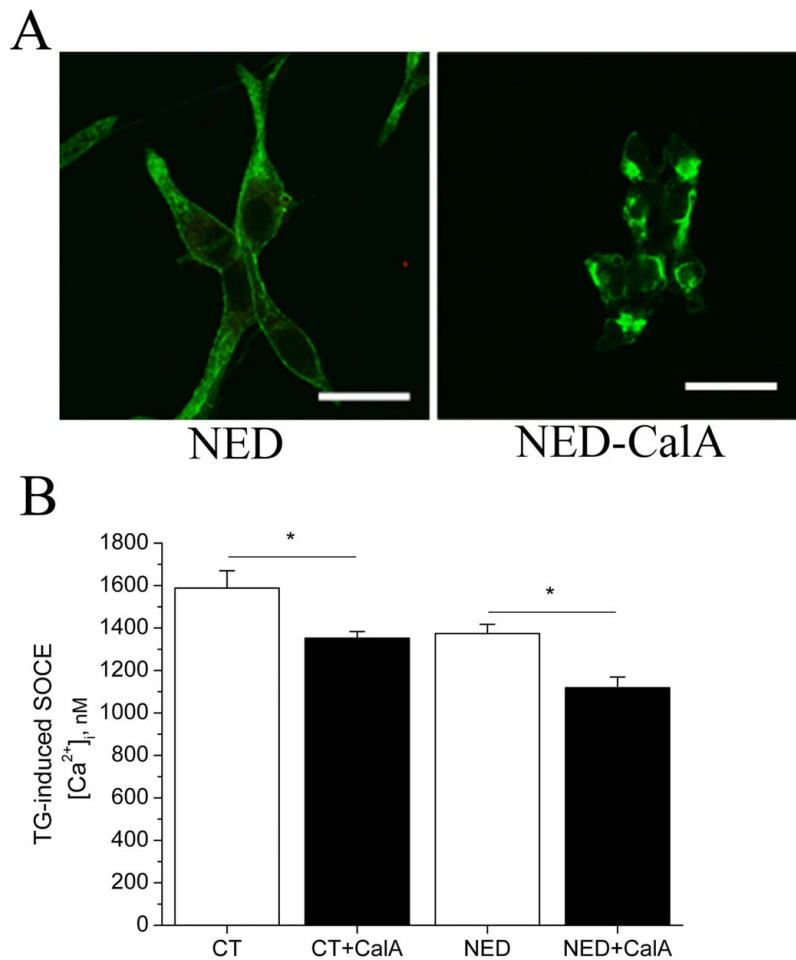
**Figure 5. F-actin polymerization by jaspakinolide (JP) in both control and NED-LNCaP cells.** (A) Representative images of immunofluorescence staining of F-actin with phalloidin-FITC in CT-, CT-JP (5  $\mu$ M for 1 hour at 37°C), NED- and NED-JP-LNCaP cells. Scale bar equals 10  $\mu$ M. n=3. (B) Histograms representing Tg-induced SOCE quantification (Tg 1  $\mu$ M, 2 mM extracellular  $Ca^{2+}$ ) in CT-, CT-JP-, NED- and NED-JP-LNCaP cells. n=3, N=30–40 cells, in triplicates. Asterisks denote statistical significance: \* p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0045615.g005

induces the loss of calcium influx [61]. Thus, TRP-channel internalization by the cytoskeleton reorganization may be proposed as a pathway used by NED to down-regulate SOC channels activity and consequently SOCE in prostate cancer cells.

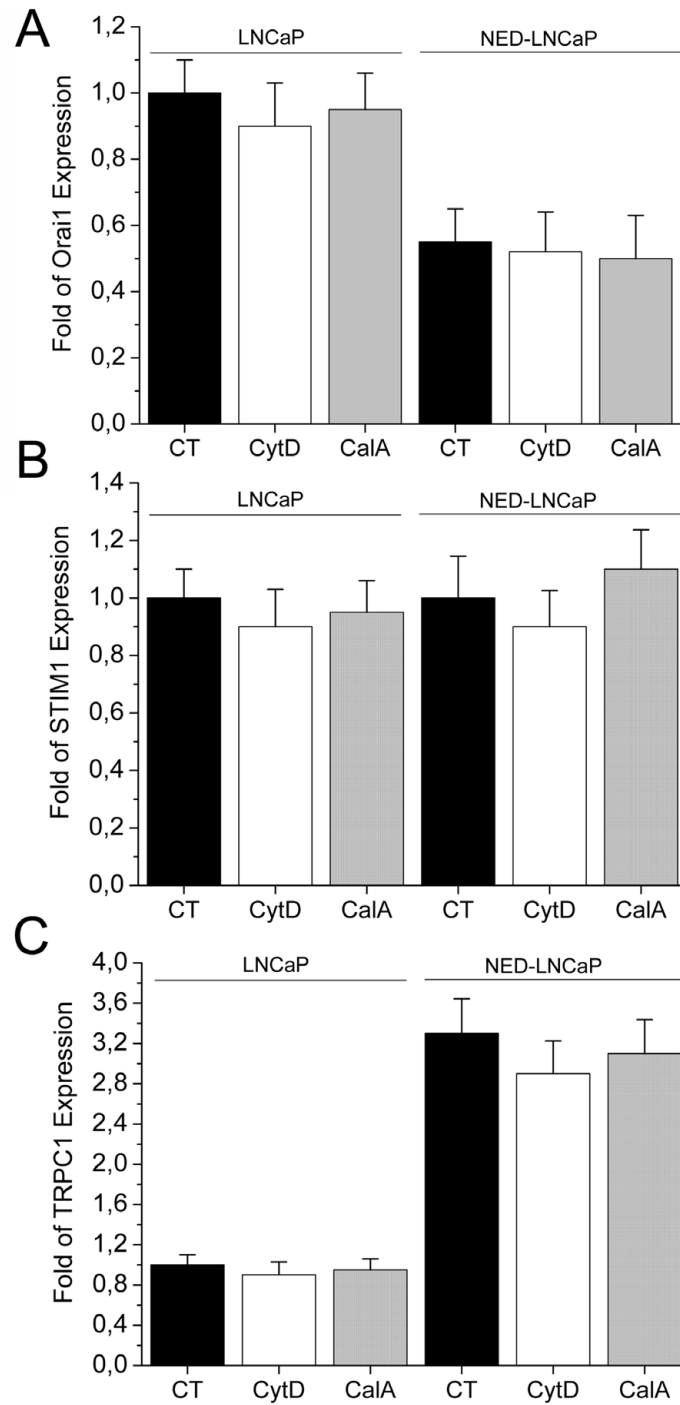
#### Implications for Androgen-independent Prostate Cancer

Apoptosis is essential in maintaining tissue homeostasis. The acquisition of a resistance to apoptosis plays a pivotal role in tumor

genesis by disrupting the balance between cell proliferation and cell death. Androgen-independent prostate cancer is characterized by tumor enrichment in apoptosis resistant cell phenotypes as NED cells. Anti-apoptotic mechanisms involve basic changes in intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis as  $I_{SOC}$  down-regulation during the NED of prostate cancer epithelial cells [18]. In addition, we have previously identified TRPC1 and TRPC4 as proteins involved in Tg-evoked  $I_{SOC}$  in LNCaP cells [52], and demonstrated that NED



**Figure 6. F-actin polymerization by calyculin A (CalA) in both control and NED-LNCaP cells.** (A) Representative images of immunofluorescence staining of F-actin with phalloidin-FITC in NED- and NED-CalA (50 nM for 10 min)-LNCaP cells. n=3. (B) Histograms representing Tg-induced SOCE quantification (Tg 1  $\mu$ M, 2 mM extracellular  $Ca^{2+}$ ) in CT-, CT-CalA-, NED- and NED-CalA-LNCaP cells. n=3, N=30–40 cells, in triplicates. Asterisks denote statistical significance: \* p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0045615.g006



**Figure 7. The expression of Orai1, STIM1 and TRPC1 does not change during CytD and CalA treatment in both LNCaP and NED-LNCaP. (A)** Real-time quantitative PCR for the Orai1 transcripts in both LNCaP and NED-LNCaP cells treated with 50 nM CalA for 10 min or 5  $\mu$ M Cyt D for 10 min. **(B)** Real-time quantitative PCR for the STIM1 transcripts in both LNCaP and NED-LNCaP cells treated with 50 nM CalA for 10 min or 5  $\mu$ M Cyt D for 10 min. **(C)** Real-time quantitative PCR for the TRPC1 transcripts in both LNCaP and NED-LNCaP cells treated with 50 nM CalA for 10 min or 5  $\mu$ M Cyt D for 10 min. There was no statistical significance observed in each condition (LNCaP and NED-LNCaP). n = 3, done in triplicates. doi:10.1371/journal.pone.0045615.g007

LNCaP cells display a thapsigargin- (Tg) induced apoptosis resistance [18]. Our latest work showed Orai1 protein represents the major molecular component of endogenous store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human prostate cancer cells, and constitutes the principal source of  $\text{Ca}^{2+}$  influx used by the cell to trigger apoptosis [20]. The functional coupling of STIM1 to Orai1, as well as Orai1  $\text{Ca}^{2+}$ -selectivity as a channel, is required for its pro-apoptotic effects we have also shown that the apoptosis resistance of androgen-independent PCa cells is associated with the down-regulation of Orai1 expression as well as SOCE. Thought, in our recent work we clearly show that the alternative cytoskeleton-related mechanism may exist employing the downregulation of SOCE without changing the expression of neither Orai1 nor STIM1, nor TRPC1.

## References

- di Sant'Agnese PA, Cockett AT (1996) Neuroendocrine differentiation in prostatic malignancy. *Cancer* 78: 357–361.
- Cohen RJ, Glezeron G, Haffejee Z (1991) Neuro-endocrine cells—a new prognostic parameter in prostate cancer. *Br J Urol* 68: 258–262.
- Tarle M, Frkovic-Grazio S, Kraljic I, Kovacic K (1994) A more objective staging of advanced prostate cancer—routine recognition of malignant endocrine structures: the assessment of serum TPS, PSA, and NSE values. *Prostate* 24: 143–148.
- Feldman BJ, Feldman D (2001) The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 1: 34–45.
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, et al. (1983) LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 43: 1809–1818.
- Burchardt T, Burchardt M, Chen MW, Cao Y, de la Taille A, et al. (1999) Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *J Urol* 162: 1800–1805.
- Mariot P, Vanoverberghe 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.
- Zelivianski S, Verni M, Moore C, Kondrikov D, Taylor R, et al. (2001) Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1539: 28–43.
- Bonkhoff H (2001) Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann Oncol* 12 Suppl 2: S141–144.
- Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H (2002) Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 53: 118–123.
- Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitan JS, et al. (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.
- Abrahamson PA (1999) Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocr Relat Cancer* 6: 503–519.
- di Sant'Agnese PA (1992) Neuroendocrine differentiation in human prostatic carcinoma. *Hum Pathol* 23: 287–296.
- di Sant'Agnese PA (1998) Neuroendocrine cells of the prostate and neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma: a review of morphologic aspects. *Urology* 51: 121–124.
- Xue Y, Verhoefstad A, Lange W, Smedts F, Debruyne F, et al. (1997) Prostatic neuroendocrine cells have a unique keratin expression pattern and do not express Bcl-2: cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate. *Am J Pathol* 151: 1759–1765.
- Xing N, Qian J, Bostwick D, Bergstralh E, Young CY (2001) Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *Prostate* 48: 7–15.
- July LV, Akbari M, Zellweger T, Jones EC, Goldenberg SL, et al. (2002) Clusterin expression is significantly enhanced in prostate cancer cells following androgen withdrawal therapy. *Prostate* 50: 179–188.
- Vanoverberghe K, Vanden Abeele F, Mariot P, Lepage G, Roudbaraki M, et al. (2004)  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 11: 321–330.
- Putney JW, Jr. (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7: 1–12.
- Flourakis M, Lchen'kyi V, Beck B, Raphael M, Vandenberghe M, et al. (2010) Orai1 contributes to the establishment of an apoptosis-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 1: e75.
- Clapham DE (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426: 517–524.
- Boulay G (2002)  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin regulates receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells. *Cell Calcium* 32: 201–207.
- Singh BB, Liu X, Tang J, Zhu MX, Ambudkar IS (2002) Calmodulin regulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent feedback inhibition of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx by interaction with a site in the C terminus of TrpC1. *Mol Cell* 9: 739–750.
- Ambudkar IS (2004) Cellular domains that contribute to  $\text{Ca}^{2+}$  entry events. *Sci STKE* 2004: pe32.
- Ambudkar IS, Brazer SC, Liu X, Lockwich T, Singh B (2004) Plasma membrane localization of TRPC channels: role of caveolar lipid rafts. *Novartis Found Symp* 258: 63–70; discussion 70–64, 98–102, 263–106.
- Brazer SC, Singh BB, Liu X, Swaim W, Ambudkar IS (2003) Caveolin-1 contributes to assembly of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  influx channels by regulating plasma membrane localization of TRPC1. *J Biol Chem* 278: 27208–27215.
- Itagaki K, Kamman KB, Singh BB, Hauser CJ (2004) Cytoskeletal reorganization internalizes multiple transient receptor potential channels and blocks calcium entry into human neutrophils. *J Immunol* 172: 601–607.
- Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, Boulay G (2004) Exocytotic Insertion of TRPC6 Channel into the Plasma Membrane upon Gq Protein-coupled Receptor Activation. *J Biol Chem* 279: 7241–7246.
- Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6: 709–720.
- Montell C (2004) Exciting trips for TRPs. *Nat Cell Biol* 6: 690–692.
- Montell C (2004) Molecular genetics of *Drosophila* TRP channels. *Novartis Found Symp* 258: 3–12; discussion 12–17, 98–102, 263–106.
- Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppéolle FV, Shuba Y, et al. (2000) Store depletion and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 527 Pt 1: 71–83.
- Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebaud S, Lepage G, Parys JB, et al. (2004) Two types of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 30326–30337.
- Bang YJ, Pirmia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, 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.
- Rumpold H, Heinrich E, Untergasser G, Hermann M, Pfister G, et al. (2002) Neuroendocrine differentiation of human prostatic primary epithelial cells in vitro. *Prostate* 53: 101–108.
- Hsieh TC, Xu W, Chiao JW (1995) Growth regulation and cellular changes during differentiation of human prostatic cancer LNCaP cells as induced by T lymphocyte-conditioned medium. *Exp Cell Res* 218: 137–143.
- Sanada M, Matsuura H, Omatsu-Kanbe M, Sango K, Kashiwagi A, et al. (2004) Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  under high glucose with suppressed  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  pump activity in rat sensory neurons. *Neuroreport* 15: 197–201.
- Prentki M, Chaponnier C, Jeanrenaud B, Gabbiani G (1979) Actin microfilaments, cell shape, and secretory processes in isolated rat hepatocytes. Effect of phalloidin and cytochalasin D. *J Cell Biol* 81: 592–607.
- Hirano K, Charrier L, Taylor RG, Allen RE, Fusetani N, et al. (1992) Changes in the cytoskeleton of 3T3 fibroblasts induced by the phosphatase inhibitor, calyculin-A. *J Muscle Res Cell Motil* 13: 341–353.



40. Kreienbuhl P, Keller H, Niggli V (1992) Protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A alter cell shape and F-actin distribution and inhibit stimulus-dependent increases in cytoskeletal actin of human neutrophils. *Blood* 80: 2911–2919.
41. Shinoki N, Sakon M, Kambayashi J, Ikeda M, Oiki E, et al. (1995) Involvement of protein phosphatase-1 in cytoskeletal organization of cultured endothelial cells. *J Cell Biochem* 59: 368–375.
42. Berridge MJ (1995) Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 17: 491–500.
43. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, et al. (2002) Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1: 169–179.
44. Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, et al. (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6: 113–120.
45. Putney JW, Jr. (1999) “Kissin’ cousins”: intimate plasma membrane-ER interactions underlie capacitative calcium entry. *Cell* 99: 5–8.
46. Venkatachalam K, van Rossum DB, Patterson RL, Ma HT, Gill DL (2002) The cellular and molecular basis of store-operated calcium entry. *Nat Cell Biol* 4: E263–272.
47. Grimaldi M, Favit A, Alkon DL (1999) cAMP-induced cytoskeleton rearrangement increases calcium transients through the enhancement of capacitative calcium entry. *J Biol Chem* 274: 33557–33564.
48. Holda JR, Blatter LA (1997) Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett* 403: 191–196.
49. Patterson RL, van Rossum DB, Gill DL (1999) Store-operated Ca2+ entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98: 487–499.
50. Rosado JA, Sage SO (2000) Coupling between inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and human transient receptor potential channel 1 when intracellular Ca2+ stores are depleted. *Biochem J* 350 Pt 3: 631–635.
51. Rosado JA, Lopez JJ, Harper AG, Harper MT, Redondo PC, et al. (2004) Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent on the actin cytoskeleton in human platelets. *J Biol Chem* 279: 29231–29235.
52. Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebault S, Lepage G, Parys J, et al. (2004) Two types of store-operated Ca2+ channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem*.
53. Donald CD, Cooper CR, Harris-Hooker S, Emmett N, Scanlon M, et al. (2001) Cytoskeletal organization and cell motility correlates with metastatic potential and state of differentiation in prostate cancer. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47: 1033–1038.
54. Wang Y, Mattson MP, Furukawa K (2002) Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J Neurochem* 82: 945–952.
55. Wu S, Sangerman J, Li M, Brough GH, Goodman SR, et al. (2001) Essential control of an endothelial cell ISOC by the spectrin membrane skeleton. *J Cell Biol* 154: 1225–1233.
56. Peng JB, Brown EM, Hediger MA (2003) Epithelial Ca2+ entry channels: transcellular Ca2+ transport and beyond. *J Physiol* 551: 729–740.
57. Clapham DE, Runnels LW, Strubing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2: 387–396.
58. Putney JW, Jr., Trebak M, Vazquez G, Wedel B, Bird GS (2004) Signalling mechanisms for TRPC3 channels. *Novartis Found Symp* 258: 123–133; discussion 133–129, 155–129, 263–126.
59. Vennekens R, Hoenderop JG, Prenen J, Stuijver M, Willems PH, et al. (2000) Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J Biol Chem* 275: 3963–3969.
60. Nilius B, Prenen J, Vennekens R, Hoenderop JG, Bindels RJ, et al. (2001) Modulation of the epithelial calcium channel, ECaC, by intracellular Ca2+. *Cell Calcium* 29: 417–428.
61. Lockwich T, Singh BB, Liu X, Ambudkar IS (2001) Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca2+ signaling complex and loss of Ca2+ influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association. *J Biol Chem* 276: 42401–42408.

## 2. Discussion

Dans cette étude nous avons décrit 2 caractéristiques par lesquelles les cellules LNCaP neuroendocrines pourraient contribuer à la résistance à l'apoptose dans les stades avancés du PCa. La différenciation neuro-endocrine est accompagnée d'une diminution du SOCE due à une réorganisation du cytosquelette et, en particulier, à l'hyperpolymérisation des filaments d'actine qui inhibe l'activité des canaux SOC sans modifier l'expression.

L'activation du SOCE est une voie de signalisation de grande importance puisqu'elle est impliquée dans les processus physiologiques de prolifération et d'apoptose (pour revue voir Berridge, 1995). Des études pionnières ont montré que la différenciation neuro-endocrine des LNCaP par une longue privation d'androgènes réduit le SOCE (Vanden Abeele et al., 2002; Vanoverberghe et al., 2004). Nous avons montré, par l'utilisation de l'imagerie calcique, une diminution de l'amplitude du SOCE dans les LNCaP NE accompagnée d'une diminution du stock calcique dans le RE.

La morphologie cellulaire exerce une grande influence sur la vidange du stock calcique réticulaire induite par un agoniste dans les cellules endothéliales (Holda and Blatter, 1997). Comme d'autres équipes, nous avons montré que la différenciation NE des LNCaP provoque un réarrangement cortical des filaments d'actine (Vanoverberghe et al., 2004; Donald et al., 2001), généralisable à la progression du cancer (pour revue voir Hall, 2009). Nos résultats dans les LNCaP contrôles indiquent qu'une augmentation de la polymérisation des filaments d'actine à court terme amplifie la vidange calcique du RE induite par la Thapsigargine (Tg) alors que leur dépolymérisation en réduit l'amplitude. Le même effet a été montré dans des cultures primaires neuronales de l'hippocampe (Wang et al., 2002). Cependant, la diminution de la vidange réticulaire induite par la Tg n'est pas amplifiée par une dépolymérisation transitoire des filaments d'actine dans les LNCaP NE. De plus, nous avons constaté une diminution du SOCE dès le premier jour de privation d'androgène sans modification de la vidange réticulaire induite par la Tg et nous avons déjà montré que cela est lié à une diminution de l'expression de Orai1, principal canal SOC dans les LNCaP (Flourakis et al., 2010). Quatre jours de traitement provoquent une diminution encore plus importante de l'expression de Orai1, du SOCE mais aussi de la vidange calcique induite par la Tg. Or, depuis sa découverte, le courant SOCE est considéré crucial pour re-remplir le réticulum de calcium (Putney, 2011). Il est donc possible que la diminution de la vidange calcique du RE soit une conséquence à long terme de la diminution du SOCE dans les LNCaP NE.

Concernant le SOCE, il a déjà été montré que son amplitude est régulée par le cytosquelette dans de nombreux types cellulaires (Patterson et al., 1999), (Rosado et al., 2004), (Wu et al., 2001). La dépolymérisation des filaments d'actine par la cytochalasine D intervient principalement au niveau de la membrane plasmique (Patterson et al., 1999) ce qui restaure le courant SOCE dans les LNCaP NE quasiment au niveau du SOCE des LNCaP CTL. Au contraire, une hyperpolymérisation corticale des filaments d'actine par l'utilisation de la Jasplakinolide ou de la calyculine A accroît la diminution d'amplitude du SOCE dans les LNCaP NE. De plus, l'utilisation de Jasplakinolide dans les LNCaP contrôles réduit significativement l'amplitude du SOCE et reproduit celui des LNCaP NE. Cela suggère que l'hyperpolymérisation des filaments d'actine dans les LNCaP NE est responsable de la

diminution du SOCE. Les mêmes résultats ont été obtenus dans des cellules endothéliales humaines (plaquettes) (Grimaldi et al., 1999), (Rosado et al., 2000).

Le réarrangement du cytosquelette dans les LNCaP NE pourrait alors avoir un impact sur le SOCE, indépendamment de l'expression d'Orai1, en empêchant qu'il soit transactivé par Stim1 (Galán et al., 2011) qui est pourtant toujours capable de migrer sur la membrane réticulaire. Tout comme nous l'avons vu dans l'article précédent, ce mécanisme pourrait également être impliqué dans la résistance à l'apoptose induite par un stress réticulaire dans les cellules PCa androgéno-indépendantes neuro-endocrines.

### III. IMPLICATION DE TRPV6 DANS LA PROGRESSION DU CANCER DE LA PROSTATE

#### A. Introduction

Introduction tirée de la revue que nous avons publiée en 2012 (Lehen'kyi V. et 2012) présentée à la suite :

Physiologiquement, chez l'Homme, le canal TRPV6 est exprimé dans les épithelia des systèmes digestif et excréteur comme le duodenum, le jejunum, le colon et les reins où il participe à l'absorption intestinale et à la réabsorption rénale du  $Ca^{2+}$  ainsi que dans les glandes exocrines comme le pancréas, les glandes mammaires, sébacées et salivaires (Peng et al. 2000; Hoenderop et al. 2001; Zhuang et al. 2002). TRPV6 est également exprimé dans l'épiderme où il participe à la différenciation terminale des kératinocytes (Lehen'kyi et al. 2007a). Les souris transgéniques  $trpv6^{-/-}$  souffrent alors d'une hypocalcémie avec hypercalciurie, d'une faible croissance, d'une diminution de la fertilité et d'une alopecie partielle avec un épiderme plus fin (Bianco et al. 2007). Le canal TRPV6 est surexprimé dans les carcinomes de la prostate, du sein, des ovaires, de la thyroïde et du colon (Peng et al. 2001; Wissenbach et al. 2001; Zhuang et al. 2002; Fixemer et al. 2003) (Fig.annexe 5).

En ce qui concerne le cancer de la prostate (PCa), les transcrits de TRPV6 ne sont détectables ni dans la prostate saine, ni dans les néoplasies intra-épithéliales prostatiques bénignes ou de hauts grades (Wissenbach et al., 2004). N'étant toujours pas détectables dans les tumeurs prostatiques de petites tailles et confinées (grade T1), ces transcrits deviennent détectables dans 20% des tumeurs de grades pT2a et pT2b, dans 79% des pT3a ainsi que dans plus de 90% des tumeurs pT3b possédant des extensions extra-prostatiques (Fig.annexe 6). Dans ce contexte, TRPV6 pourrait être proposé comme marqueur de la progression du PCa (Fixemer et al., 2003). Le canal TRPV6 est aussi très présent dans les métastases des ganglions lymphatiques d'origine prostatique (Peng et al., 2001; Wissenbach et al., 2001). Ainsi,

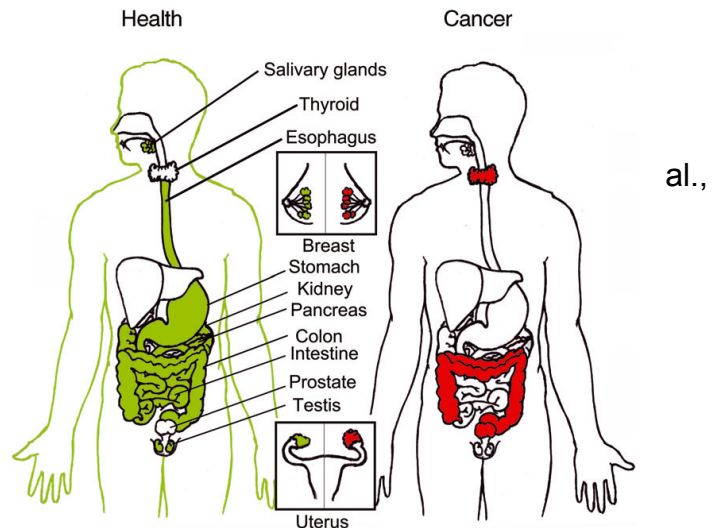


Figure 5: Expression du canal TRPV6 dans les tissus sains (en vert à gauche) et tissus surexprimant TRPV6 en cas de cancer (en rouge à droite). (Lehen'kyi V. et al., 2012)

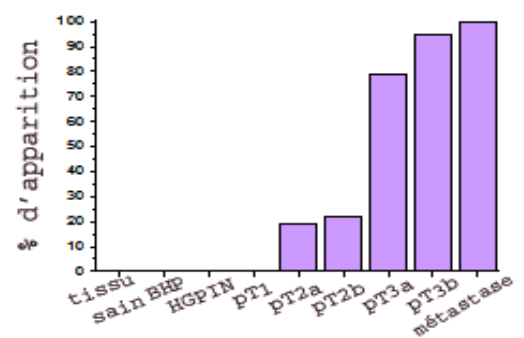


Figure 6 : L'expression de TRPV6 (ARNm) est corrélée au score de Gleason du PCa. (Wissenbach et al., 2004)

contrairement à TRPC6, les taux d'ARNm de TRPV6 ont pu être corrélés significativement à la progression du PCa. Nous avons vu que les androgènes peuvent réguler l'expression de Orai1 (Flourakis M. et al., 2010) mais en ce qui concerne l'expression de TRPV6 cela n'est pas clairement établi.

Selon les premières études, le récepteur aux androgènes (AR) inhibe l'expression de TRPV6 (Peng et al. 2001; Vanden Abeele et al. 2003; Boddington et al. 2003). Il n'a pourtant pas été détecté dans les lignées de cellules PCa androgéno-indépendantes (Fixemer et al. 2003). Par la suite, il a été montré que l'expression de TRPV6 dans les LNCaP est dépendante du AR mais indépendamment de son activation par un ligand (Lehen'kyi et al. 2007b). La curcumine, un agoniste du récepteur à la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (VDR), stimule l'expression de TRPV6 *in vivo* mimant les effets protecteurs de la vitamine D3 contre le cancer du colon en favorisant la charge calcique (Bartik et al., 2010). De plus, l'analyse par puce à ADN a montré que le promoteur de *trpv6* est une cible directe du VDR (White JH. Et al., 2005). Or, la castration chimique et l'utilisation de la 1,25-dihydroxyvitamine D3 sont deux traitements utilisés contre le cancer de la prostate (Lam JS. Et al., 2006 ; Krishan AV. et al., 2003) qui ont un effet plus ou moins clair sur l'expression du canal TRPV6 dont l'implication dans le PCa s'est révélée très intéressante par la suite.

Plus récemment, il a été montré par Schwarz et ses collaborateurs (Schwarz et al., 2005) que TRPV6 augmente la prolifération des cellules HEK-293 de façon dépendante du  $Ca^{2+}$ . De même l'extinction de TRPV6 par un siRNA a mis en évidence l'implication de ce canal dans la prolifération des cellules PCa androgéno-dépendantes, les LNCaP, via l'activation du facteur de transcription NFAT ainsi que sa contribution à la résistance à l'apoptose constitutive de ces cellules (Lehen'kyi et al., 2007c).

## SYMPOSIUM REVIEW

## The role of the TRPV6 channel in cancer

V'yacheslav Lehen'kyi, Maylis Raphaël and Natalia Prevorskaya

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

**Abstract** The TRPV6 channel belongs to the superfamily of transient receptor potential (TRP) channels, subfamily vanilloid, member 6. Its expression in health is mainly confined to epithelial tissue of different organs such as digestive tract, kidney, testis, ovaries and skin. Due to its high calcium selectivity over other TRP channels, this channel was shown to participate in close regulation of calcium homeostasis in the body. In cancer a number of pieces of evidence demonstrate its upregulation and correlation with the advanced stages in prostate, colon, breast, thyroid, and ovarian carcinomas. Little is known about its role in initiation or progression for most of cancers, though in prostate cancer its oncogenic potential *in vitro* has been suggested. The most probable mechanisms involve calcium signalling in the control of processes such as proliferation and apoptosis resistance, though in some cases first evidence was reported as to its likely protective role in some cancers such as colon cancer. Further studies are needed to confirm whether this channel does really have an oncogenic potential or is just the last hope for transformed cells/tissues to stop cancer.

(Received 6 December 2011; accepted after revision 7 February 2012; first published online 13 February 2012)

**Corresponding author** N. Prevorskaya: Head of Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics; Bât. SN3, 2<sup>ème</sup> étage, p. 232, Cité Scientifique, 59650 Villeneuve d'Ascq, France. Email: natacha.prevorskaya@univ-lille1.fr

### Introduction

Transient receptor potential (TRP) channels constitute a large and functionally versatile superfamily of cation channel proteins that are expressed in many cell types from yeast to mammals (for reviews see Clapham, 2003; Vriens *et al.* 2004). The TRP superfamily contains

a growing number of proteins in vertebrates and invertebrates unified by their homology to the product of the *Drosophila trp* gene, which is involved in light perception in the fly eye (Montell & Rubin, 1989). On the basis of structural homology, the superfamily can be subdivided into seven main subfamilies: TRPC

**V'yacheslav Lehen'kyi** (left) graduated from the Department of Biochemistry, University of Taras Shevchenko, Kyiv, Ukraine. In 2001 he obtained his PhD in the physiology of vascular smooth muscles at the Institute of Pharmacology and Toxicology in Kyiv, Ukraine, before doing his first postdoc in cardiology in the University of Paris XI. For the second postdoc he moved to the Laboratory of Cell Physiology, Lille, France where he is currently doing his research as a Professor Assistant qualified as biochemist, molecular biologist together with his PhD student **Maylis Raphaël** (right). Prof. **Natalia Prevorskaya** (centre) is a full professor of physiology at the University of Lille, North of France, and a Head of the Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003, certified by the INSERM (National Institute for Health and Medical Research), the part of Laboratory of Excellence, Ion Channels Science and Therapeutics, the head of the team "Calcium signatures of prostate cancer" certified by the National League Against Cancer. The field of expertise includes the function and regulation of ion channels, the role of ion channels and calcium signaling in carcinogenesis, calcium signaling in proliferation, apoptosis, migration and differentiation, in prostate cancer.



This report was presented at the First International Meeting on Ion Channel Signaling Mechanisms, *Ion channel signalling mechanisms: from basic science to clinical applications*, Marrakesh, Morocco, 31 October–4 November 2011.

(canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPP (polycystin), TRPML (mucolipin), TRPA (ankyrin) and TRPN (no mechanoreceptor potential C, NOMPC) (for review see Vennekens *et al.* 2002; Clapham, 2003; Montell, 2005). Among them, in vertebrates, six TRPV channels have been identified. TRPV1 mediates nociception and contributes to the detection and integration of diverse chemical and thermal stimuli (Caterina *et al.* 2000; Jordt & Julius, 2002), TRPV2 and TRPV3 open upon heating, activating in the warm and noxious heat range (Kanzaki *et al.* 1999; Smith *et al.* 2002), TRPV4 plays a role in osmosensing, nociception and warm sensing (Liedtke *et al.* 2000; Nilius *et al.* 2004), and finally TRPV5 and TRPV6 are highly  $\text{Ca}^{2+}$ -selective channels that play a role in  $\text{Ca}^{2+}$  reabsorption in the kidney and intestine (den Dekker *et al.* 2003; Hoenderop *et al.* 2003). It is really notable that among all TRP channels TRPV5 and TRPV6 are highly  $\text{Ca}^{2+}$  selective, with  $P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}}$  values exceeding 100; such high  $\text{Ca}^{2+}$  selectivity is unique within the TRP superfamily and makes these channels quite distinguishable, especially in  $\text{Ca}^{2+}$ -related intracellular pathways.

#### TRPV6 channel in health

TRPV6 channel cDNA was cloned in 1999 from rat duodenum by expression cloning using *Xenopus* oocytes (Peng *et al.* 1999). The tissue distribution of TRPV6 has been studied extensively by Northern blot, RT-PCR analysis and immunohistochemistry, and in humans this channel is predominantly expressed in epithelia and the organs that mediate transcellular  $\text{Ca}^{2+}$  transport such as duodenum, jejunum, colon and kidney, and also in exocrine tissues such as pancreas, mammary gland, sweat gland and salivary gland (Peng *et al.* 2000; Hoenderop

*et al.* 2001; Zhuang *et al.* 2002) (Fig. 1). TRPV6 is also expressed and plays an important role in the epidermis where the role of calcium is pivotal for skin differentiation (Lehen'kyi *et al.* 2007a). TRPV6-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  transport is not coupled to  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , or  $\text{H}^+$ , which is consistent with the prediction of early studies that  $\text{Ca}^{2+}$  uptake is not energy dependent. On the basis of electrophysiological analysis, the characteristics of TRPV6 were determined as it is strongly  $\text{Ca}^{2+}$  selective compared with other cations ( $\text{Ca}^{2+} \gg \text{Ba}^{2+}, \text{Sr}^{2+}$ ) and its apparent affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_m$ ) is 0.44 mM (Peng *et al.* 1999; Yue *et al.* 2001). This evidence strongly suggests that TRPV6 is a molecular candidate for the apical  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathway. Considering the transcriptional regulation of TRPV6, it has been revealed that the mRNA expression increased owing to a low- $\text{Ca}^{2+}$  diet (30-fold) or 1,25-vitamin D injection (21.5-fold) (Song *et al.* 2003). Moreover, recent studies conducted with TRPV6 knockout (KO) mice demonstrated that TRPV6 serves as a principle mechanism for apical intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption (Bianco *et al.* 2007). The TRPV6 KO mice exhibit disordered  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis, including defective intestinal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption, increased urinary  $\text{Ca}^{2+}$  excretion, deficient weight gain and reduced fertility, suggesting the pivotal role in calcium homeostasis in tissues where this channel is expressed. The other group has shown that despite TRPV6 and other proteins involved in transcellular  $\text{Ca}^{2+}$  transport being dynamically expressed in bone cells, TRPV6 appears not to be crucial for bone metabolism and matrix mineralization in mice (van der Eerden *et al.* 2011). TRPV6 is also expressed in epididymal epithelium where the protein was detected in the apical membrane (Weissgerber *et al.* 2011). The replacement of a negatively charged aspartate in the pore-forming region with

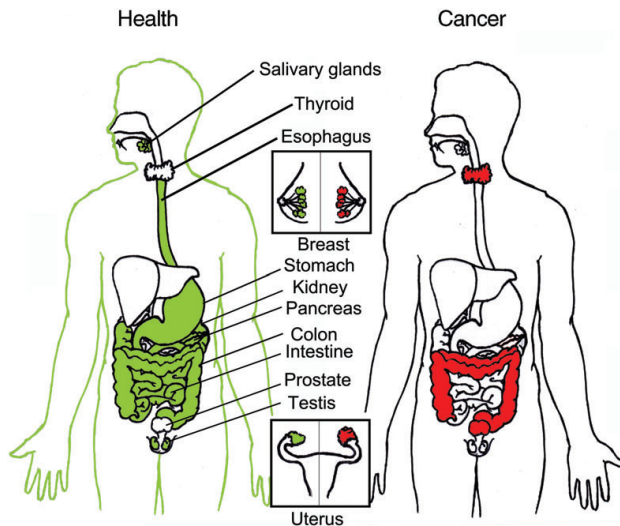


Figure 1. The expression of TRPV6 channel in health (left image, green) and its upregulation in cancer (right image, red)

**Table 1. TRPV6 expression in non-pathological and pathological tissues and cell lines**

Tissues	Non-pathological	Pathological (carcinoma)	Tissues	Non-pathological	Pathological (carcinoma)
Leukocytes	-1,4		Trachea	+ <sup>1</sup>	
Fetal brain	+/- <sup>1</sup>		Thyroid	+ <sup>5</sup>	+++ <sup>5</sup>
Whole brain	- <sup>4</sup> + <sup>1</sup> ++ <sup>2</sup>		Parathyroid Gland	- <sup>4</sup>	
Cerebral cortex	+ <sup>1</sup>		Thymus	-1,4	
Caudate nucleus	+ <sup>1</sup>		Fetal heart	++ <sup>1</sup>	
Occipital lobe	+ <sup>1</sup>		Heart	-2,4	
Putamen	+ <sup>1</sup>		Liver	- <sup>2</sup>	
Substantia nigra	+ <sup>1</sup>		Spleen	-1,2,4	
Temporal lobe	+ <sup>1</sup>		Pancreas	+ <sup>4,5</sup> +++ <sup>1,2</sup>	
Hippocampus	+ <sup>1</sup>		Lung	- <sup>2,4</sup>	
Pituitary gland	+ <sup>1</sup>		Fetal kidney	++ <sup>1</sup>	
Spinal cord	+ <sup>1</sup>		Kidney	- <sup>4</sup> + <sup>1</sup> ++ <sup>2,3</sup>	+ <sup>12</sup>
Salivary glands	+ <sup>4</sup> +++ <sup>1</sup>		Mammary gland	+ <sup>1,5</sup>	+++ <sup>5</sup>
Oesophagus	- <sup>2</sup> + <sup>1,5</sup>		Ovary	- <sup>4</sup> + <sup>5</sup>	+ <sup>5</sup>
Stomach	-2,4 +1,5		Placenta	++ <sup>2</sup> +++ <sup>1,4</sup>	
Duodenum	+++ <sup>1,2</sup>		Endometrium	- <sup>4</sup>	
Small intestine	- <sup>4</sup> + <sup>5</sup>		Testis	+ <sup>4</sup> ++ <sup>2</sup>	
Jejunum	+ <sup>1</sup> +++ <sup>1,5</sup>		Prostate	Healthy - <sup>4,6</sup> + <sup>1,2,3,5</sup>	Low grade (GS<7) - <sup>4,6</sup> + <sup>3</sup>
Ileus	-1,2				High grade (GS≥7) ++ <sup>3,4,5,6</sup>
Large intestine	+/- <sup>1</sup> + <sup>5</sup>	+++ <sup>5</sup>			
Colon-rectum	- <sup>4</sup> + <sup>5</sup> ++ <sup>2</sup>	+++ <sup>5</sup>		BPH - <sup>4,6</sup> + <sup>3</sup>	
Bones	+++ <sup>9</sup>				Lymph node metastasis +++ <sup>4</sup>
Skeletal muscle	-1,2,4,5				
Epidermis	+++ <sup>10</sup>				
Sweat gland	+++ <sup>5</sup>				
Cell lines	Non-pathological	Pathological (carcinoma)	Cell lines	Non-pathological	Pathological (carcinoma)
HeLa S3		- <sup>1</sup>	HaCaT	u + <sup>7,10</sup> d +++ <sup>7,10</sup>	
HL60		- <sup>1</sup>	hPK	u + <sup>7,10</sup> d +++ <sup>7,10</sup>	
K-562		+ <sup>1</sup>	A549		- <sup>1</sup>
MOLT-4		- <sup>1</sup>	HEK293	-3,7	
Raji		- <sup>1</sup>	MCF-7		+++ <sup>11</sup>
SW480		+++ <sup>1</sup>	hBCE		+++ <sup>11</sup>
Caco-2		++ <sup>8</sup>	PrEC	+ <sup>3</sup>	
Human Osteoblast	+++ <sup>9</sup>		hPS	- <sup>3</sup>	
Human Osteoclast	+++ <sup>9</sup>		BPH1	+ <sup>3</sup>	
G361		- <sup>1</sup>	LNCaP		+++ <sup>3</sup>
16HBE14o	++ <sup>8</sup>		PC3		+ <sup>3</sup>
			DU-145		+ <sup>3</sup>

-, negative; +/-, faint; +, weak; ++, moderate; +++, strong. BPH, benign prostatic hyperplasia; GS, Gleason score; HL60, promyelocytic leukaemia HL-60; K-562, chronic myelogenous leukaemia K-562; MOLT-4, lymphoblastic leukaemia MOLT-4; Raji, Burkitt's lymphoma Raji; SW480, colorectal adenocarcinoma SW480; A549, lung carcinoma A549; G361, melanoma G361; Human bronchial epithelial, 16HBE14o; Caco-2, heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma cells; HaCaT, human keratinocytes cell line, undifferentiated (u) or differentiated (d); hPK, human primary keratinocytes, undifferentiated (u) or differentiated (d); HEK293, human embryonic kidney; hBCE, human breast cancer epithelial primary culture; MCF-7, human breast cancer cell line; PrEC, healthy human prostate epithelial cells; hPS, human prostate stromal cells; BPH1, human benign prostatic hyperplasia immortalized cell lines; DU-145, androgen resistant prostate adenocarcinoma cell lines from brain metastasis; PC3 androgen resistant prostate adenocarcinoma cell lines from bone metastasis; LNCaP, androgen responsive prostate adenocarcinoma cell line from lymph node metastasis. <sup>1</sup>Peng *et al.* (2000), <sup>2</sup>Müller *et al.* (2000), <sup>3</sup>Peng *et al.* (2001), <sup>4</sup>Wissenbach *et al.* (2001), <sup>5</sup>Zhuang *et al.* (2002), <sup>6</sup>Fixemer *et al.* (2003), <sup>7</sup>Lehen'kyi *et al.* (2007), <sup>8</sup>Borthwick *et al.* (2008), <sup>9</sup>Van der Eerden *et al.* (2011), <sup>10</sup>Lehen'kyi *et al.* (2011), <sup>11</sup>Dhennin-Duthille *et al.* (2011), <sup>12</sup>Yongyang *et al.* (2011).



an uncharged alanine (D541A) renders heterologously expressed TRPV6 channels non-functional. The authors also found that male, but not female, mice homozygous for this mutation (Trpv6(D541A/D541A)) showed severely impaired fertility. The other interesting data concern one of the *trpv6* allele containing three derived non-synonymous SNPs (157C, 378M, 681M) the frequency of which has been increased by positive selection in non-African populations (Sudo *et al.* 2010). Both electrophysiological and  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging analyses suggested that populations having these SNPs in TRPV6 in non-African areas may absorb higher  $\text{Ca}^{2+}$  from the intestine than ancestral-TRPV6 in the African area. Whether this polymorphism has any role in diseases or cancer is not known yet.

### TRPV6 channel in cancer

When compared with normal tissue or cells, the expression of TRPV6 mRNA (measured using semi-quantitative or real time quantitative RT-PCR) and/or expression of the TRPV6 protein (measured by immunofluorescence) is substantially increased in prostate cancer tissue, and in human carcinomas of the colon, breast, thyroid and ovary (Peng *et al.* 2001; Wissenbach *et al.* 2001; Zhuang *et al.* 2002; Fixemer *et al.* 2003) (Fig. 1).

More extensive studies of TRPV6 expression have been made in prostate cancer. The expression of TRPV6 mRNA is very low or not detectable in healthy and benign human prostate tissue (Wissenbach *et al.* 2001; Fixemer *et al.* 2003). Studies with prostate cancer tissue obtained from biopsies or resections show substantial expression of TRPV6 mRNA which increases with the degree of aggressiveness of the cancer, assessed by the Gleason score (grading of the pathological stage) and the degree of metastasis outside the prostate (Peng *et al.* 2001; Fixemer *et al.* 2003). These observations have led to the suggestion that the level of expression of TRPV6 could be used as a marker to predict the clinical outcome of prostate cancer (Fixemer *et al.* 2003; Bodding, 2007).

Increased expression of TRPV6 mRNA is also observed in human prostate cancer cell lines (LNCaP, PC-3) as compared to the normal and benign epithelial cells (PrEC, BPH1) (Peng *et al.* 2001). The hypothesis on the potential involvement of TRPV6 channel in prostate cancer carcinogenesis has been made. The first data showed that TRPV6 increases cell proliferation of HEK-293 cells in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner and the increased proliferation correlates with slightly increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels without interfering with the intrinsic  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of HEK-293 cell proliferation (Schwarz *et al.* 2006). Prevarskaya's team have subsequently shown that TRPV6 is directly involved in the control of proliferation in LNCaP cells since its specific siRNA decreases (i) proliferation rate, (ii) cell accumulation into S-phase of the cell cycle, and

(iii) proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression (Lehen'kyi *et al.* 2007b). This team has demonstrated that  $\text{Ca}^{2+}$  uptake into LNCaP cells is mediated by TRPV6, with the subsequent downstream activation of nuclear factor of activated T cells (NFAT). The possible role of androgens in the regulation of TRPV6 mRNA expression remains unclear. Previous studies have shown that the androgen receptor agonist dihydrotestosterone inhibits TRPV6 expression while the androgen receptor antagonist bicalutamide increases TRPV6 expression (Peng *et al.* 2001; Vanden Abele *et al.* 2003; Bodding *et al.* 2003). However, TRPV6 expression has not been identified in androgen-insensitive prostate cancer cell lines DU-145 and PC-3 (Fixemer *et al.* 2003) and, moreover, Lehenkyi *et al.* have shown that TRPV6 expression in LNCaP cells is regulated by androgen receptor, but in a ligand-independent fashion (Lehen'kyi *et al.* 2007b). To date, little is known about whether the observed increased expression of TRPV6 mRNA and protein in prostate cancer cells is associated with increased  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^{+}$  entry through functional TRPV6 channels, and what the physiological and pathological consequences might be (Bodding, 2007). Thus, LNCaP cells might be a useful model to study TRPV6 in a more native environment than is the case in the various overexpression systems. So far, no electrophysiological data have yet become available from non-transfected cell lines and primary cell cultures. Therefore, it is also unknown whether TRPV6 channels are functional in malignant tissue. The independent study on the known two alleles of *trpv6*, *a* and *b*, in healthy control individuals and prostate cancer patients has revealed them as not significantly different, suggesting that in the case of prostate cancer the TRPV6 genotype does not correlate with the onset of the cancer, the Gleason score and the tumour stage (Kessler *et al.* 2009).

TRPV6 mRNA is also expressed in the colorectal cancer cell line SW480 and to a lesser extent in the chronic myelogenous leukaemia cell line K-562 (Peng *et al.* 2000). This is at least partially in agreement with the immunohistochemical experiments showing an elevated expression of TRPV6 in comparison with normal tissues in colon, breast, thyroid and ovarian carcinomas (Zhuang *et al.* 2002). However, no up-regulation of TRPV6 transcripts was observed in other malignancies such as pancreatic carcinoma, arguing against TRPV6 as a general marker for neoplasms (Wissenbach *et al.* 2001).

In this context, a novel mechanism has been recently shown by which the TRPV6 channel might exert anti-tumour effects via its up-regulation in colon cancer (Bartik *et al.* 2010). TRPV6 is a major calcium transporter in the small intestine (Zhuang *et al.* 2002; Song *et al.* 2003), where its role in vitamin D-stimulated calcium transport has been well demonstrated (Nijenhuis *et al.* 2003). Several studies have indicated that high dietary calcium protects against risk for colon cancer

**Table 2. Methods for TRPV6 detection and sequences of probes, primers and antibody epitopes**

Ref.	Authors	Methods used	Human TRPV6 Target	Technique details (probes, sequences of primers, antibody epitopes)
1	Peng <i>et al.</i> (2000)	Northern/dot blot	Human small intestine hCaT1 (GenBank No. AF304463)	<sup>32</sup> P-Labelled hCaT1 cDNA
2	Müller <i>et al.</i> (2000)	Dot blot Qualitative PCR	Human Kidney Cortex hECaC1 (GenBank No. AJ271207)	Forward: 5'-GACCTCAGAGATCGACTCG-3'  Reverse: 5'-TCTGTGAGGTCATAGAGAGTC-3'
3	Peng <i>et al.</i> (2001)	Slot blot  In situ hybridization	hCaT1 (GenBank No. AF304463)	( $\alpha$ - <sup>32</sup> P)dCTP-labelled hCaT1 probes  Nucleotides 772–1323 from the start codon from full length hCaT1 Sens: 5'-GGGATTAGGTGACACTATAGAAGCACCTGATGGGATTAGGTGACACTATAGAAGCACCTGATGCAGAAGCGGA-3' Antisense: 5'-CTGTAATACGACTCACTATAGGGCACCATGGT CACCAGCACC-3' Forward: 5'-AGCCTACATGACCCCTAAGGACG-3'
		Real-time PCR (2- $\Delta\Delta C_t$ )		Reverse: 5'-GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCGG-3'
4	Wissenbach <i>et al.</i> (2001)	Northern blot	Human placenta CaT-La/b (GenBank No. AJ243500/AJ243501)	probe was a 345-bp EcoRI/BamHI fragment spanning the protein coding region of amino acid residues 528–643 of the CaT-L protein
5	Zhuang <i>et al.</i> (2002)	Immunohistochemistry	hCaT1	Anti-serum against the last 19 amino-acid residues of the carboxyl terminus of hCaT1. Rabbit polyclonal Anti-CaT1 (R65291) and Chicken polyclonal IgY Anti-CaT1 (CH2747).
6	Fixemer <i>et al.</i> (2003)	In situ hybridization	Human TRPV6	Sense and antisense oligodesoxynucleotides (biotinylated at the 3' end) of the amino-acid residues L111LCLWSK, Q637DLNRQRI and F651HTRGSED of the TRPV6 sequence. Oligonucleotides Antisens of human TRPV6 fragment (nucleotides 1584 to 1928)
7	Lehen'kyi <i>et al.</i> (2007)	Qualitative PCR	Human TRPV6 (NCBI No. NM_018646)	Forward: 5'-ATGGTGATGCGGCTCATCAGTG-3'  Reverse: 5'-GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCG-3'
		Western blot immunofluorescence	Human TRPV6 (SwissProt Q9H1D0)	Rabbit polyclonal Anti-TRPV6 (ACC 036) against the last 19 amino-acid residues of the carboxyl terminus (NH2-NRGLLEDGESWEYQI-COOH)
8	Borthwick <i>et al.</i> (2008)	Western blot immunoprecipitation	Human TRPV6	Goat polyclonal antibody human TRPV6 (sc-31445) raised against a peptide mapping near the N-terminus.
9	Van der Eerden <i>et al.</i> (2011)	Real time PCR (2- $\Delta\Delta C_t$ )	Human TRPV6	Forward: 5'-GCTTTGCTTCAGCCTTCTATATCAT <sub>3</sub>
		Northern blot		Reverse: 5'-TGGTAAAGAACAGCTCGAAGGT-3' Probes <sup>5</sup> 6-carboxyfluorescein and <sup>3</sup> 6-carboxytetramethylrhodamine labelled
		Immunofluorescence		5'-AGGAGCTAGGCCACTTCTACGACTACCCCA-3' Rabbit polyclonal Anti-mouse TRPV6 against the last 15 amino-acid residues of the carboxyl terminus (NH2-INRGLLEDGESWEYQI-COOH)

Table 2. Continued.

Ref.	Authors	Methods used	Human TRPV6 Target	Technique details (probes, sequences of primers, antibody epitopes)
10	Lehen'kyi <i>et al.</i> (2011)	Real-time PCR (2- $\Delta$ C <sub>t</sub> )  Immunofluorescence immuno-histochemistry Biotinylation/Western blot Immunohistochemistry Western blot	Human TRPV6 (NCBI accession No. NM_018646)	Forward: 5'-GCCTTCTATATCATCTTCC-3'  Reverse: 5'-GGTGATGCTGTACATGAAGG <sub>3</sub> Rabbit polyclonal Anti-TRPV6 (ACC 036) against the last 19 amino-acid residues of the carboxyl terminus (NH <sub>2</sub> -NRGLEDGESWEYQI-COOH)
11	Dhennin-Duthille <i>et al.</i> (2011)	Real time PCR  Western blot	Human TRPV6 (NCBI accession No. NM_018646)	Forward: 5'-ATGGTGATGCGGCTCATCAGTG-3'  Reverse: 5'-GTAGAAGTGGCCTAGCTCCTCG-3' Goat polyclonal antibody human TRPV6 (sc-31445)

The articles numbers refer to the same articles cited in superscript for the Table 1.

(Lipkin & Newmark, 1985; Slattery *et al.* 1988). Thus, a ligand of 1,25-vitamin D<sub>3</sub> receptor that up-regulates TRPV6 *in vivo*, such as curcumin, may perhaps play a role similar to that of 1,25-vitamin D<sub>3</sub> in promoting calcium uptake as part of the protective effect against colon cancer (Bartik *et al.* 2010). The other evidence has been brought by the studies showing that TRPV6, and not TRPV1 (the well-known capsaicin receptor), can mediate capsaicin-induced apoptosis in gastric cells (Chow *et al.* 2007). Therefore, the abundance of TRPV6 channel in gastric cells can determine their destiny under capsaicin treatment making the latter a promising dietary candidate for cancer chemoprevention.

From the other side, in humans, overexpression of TRPV6 was associated with early-stage colon cancer, and inhibition of TRPV6 expression by small interfering RNA inhibited proliferation and induced apoptosis in colon carcinoma cells (Peleg *et al.* 2010). TRPV6 small interfering RNA also diminished the transcriptional activity of the calcium-dependent nuclear factors in activated T cells. The authors showed that the aberrant overexpression of TRPV6 contributes to colonic crypt hyperplasia in mice and to colon cancer cell proliferation in humans. Therefore, they concluded it is likely that the suppression of TRPV6 by a high calcium diet is required for its protective effects in the colon (Peleg *et al.* 2010).

TRPV6 is strongly expressed in breast adenocarcinoma tissue (Bolanz *et al.* 2008). The *in vitro* model showed that TRPV6 can be regulated by oestrogen, progesterone, tamoxifen and 1,25-vitamin D<sub>3</sub> and has a large influence on breast cancer cell proliferation (Bolanz *et al.* 2009). The effect of tamoxifen on cell viability was enhanced when TRPV6 expression was silenced with small interfering

RNA. TRPV6 may be a novel target for the development of calcium channel inhibitors to treat breast adenocarcinoma expressing TRPV6. The recent work has shown that TRPV6 is mainly overexpressed in the invasive breast cancer cells and the selective silencing of TRPV6 inhibited MDA-MB-231 migration and invasion, as well as MCF-7 migration (Dhennin-Duthille *et al.* 2011).

TRPV6 was also shown to be expressed in rat basophilic leukaemia cells where it functions as a Ca<sup>2+</sup>-sensing Ca<sup>2+</sup> channel independently of procedures known to deplete Ca<sup>2+</sup> stores (Bodding *et al.* 2002). It has been demonstrated that TRPV5 and TRPV6 channel proteins are present in both the total lysates and the crude membrane preparations from leukaemia cells (Semenova *et al.* 2009). Immunoprecipitation revealed that a physical interaction between TRPV5 and TRPV6 may take place. In this work single-channel patch-clamp experiments demonstrated the presence of inwardly rectifying monovalent currents that displayed kinetic characteristics of unitary TRPV5 and/or TRPV6 currents and were blocked by extracellular Ca<sup>2+</sup> and ruthenium red.

It should be noted that TRPV5, a channel very close to TRPV6 (75% of homology), was originally cloned from rabbit kidney, and belongs to the 'apical calcium channels' family like TRPV6 channel. Unlike the other four members of the TRPV family that are non-selective cation channels, TRPV5 together with TRPV6 is a remarkable Ca<sup>2+</sup>-selective channel that serves for apical calcium entry in absorptive and secretory tissues (Nijenhuis *et al.* 2003). However no data have been provided so far regarding the potential involvement of TRPV5 or TRPV6 channels in renal cancers, although the decreased TRPV5/TRPV6 expression was already reported in renal cell carcinoma,

which correlated with the vitamin D receptor (Wu *et al.* 2011). On the other hand, endogenous TRPV5 mRNA expression was observed using RT-PCR analysis in human Jurkat T leukaemia cell line (Vasil'eva *et al.* 2008) and in K562 erythroleukaemia cell line (Semenova *et al.* 2009). K562 cells co-express TRPV5 and TRPV6 calcium channels that form a functional homotetrameric structure by interacting with each other. Based on the evidence that TRPV5/V6 expression levels are strongly controlled by 1,25-dihydroxyvitamin D3 that exerts anti-proliferative effects and induces K562 cell differentiation, it has been suggested that TRPV5/TRPV6 channels regulate leukaemia cell differentiation in a 1,25-vitamin D3-dependent manner (Semenova *et al.* 2009).

In conclusion, TRPV6 expression correlates with tumour grades in many tissues, which inspires the idea of this channel as encoded by a possible oncogene. Yet, little is known about its exact role in initiation and/or progression for most of cancers, though the involvement of calcium signalling via the TRPV6 channel in the control of aberrant proliferation and apoptosis resistance has already been demonstrated. Besides, in some cases first evidence was reported as to its likely protective role in some cancers, such as colon cancer, which opens an avenue for further studies to confirm whether this channel does really have an oncogenic potential or is just the last hope for transformed cells/tissues to stop cancer.

## References

- Bartik L, Whitfield GK, Kaczmarek M, Lowmiller CL, Moffet EW, Furrick JK, Hernandez Z, Haussler CA, Haussler MR & Jurutka PW (2010). Curcumin: a novel nutritionally derived ligand of the vitamin D receptor with implications for colon cancer chemoprevention. *J Nutr Biochem* **21**, 1153–1161.
- Bianco SD, Peng JB, Takanaga H, Suzuki Y, Crescenzi A, Kos CH, Zhuang L, Freeman MR, Gouveia CH, Wu J *et al.* (2007). Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the *Trpv6* calcium channel gene. *J Bone Miner Res* **22**, 274–285.
- Bodding M (2007). TRP proteins and cancer. *Cell Signal* **19**, 617–624.
- Bodding M, Fecher-Trost C & Flockerzi V (2003). Store-operated  $Ca^{2+}$  current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem* **278**, 50872–50879.
- Bodding M, Wissenbach U & Flockerzi V (2002). The recombinant human TRPV6 channel functions as  $Ca^{2+}$  sensor in human embryonic kidney and rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem* **277**, 36656–36664.
- Bolanz KA, Hediger MA & Landowski CP (2008). The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol Cancer Ther* **7**, 271–279.
- Bolanz KA, Kovacs GG, Landowski CP & Hediger MA (2009). Tamoxifen inhibits TRPV6 activity via estrogen receptor-independent pathways in TRPV6-expressing MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Res* **7**, 2000–2010.
- Borthwick LA, Neal A, Hobson L, Gerke V, Robson L, Muimo R. The annexin 2-S100A10 complex and its association with TRPV6 is regulated by cAMP/PKA/CnA in airway and gut epithelia. *Cell Calcium*. 2008 Aug;44(2):147–57. Epub 2008 Jan 9. PubMed PMID: 18187190.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI & Julius D (2000). Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* **288**, 306–313.
- Chow J, Norng M, Zhang J & Chai J (2007). TRPV6 mediates capsaicin-induced apoptosis in gastric cancer cells – mechanisms behind a possible new “hot” cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 565–576.
- Clapham DE (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* **426**, 517–524.
- den Dekker E, Hoenderop JG, Nilius B & Bindels RJ (2003). The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* **33**, 497–507.
- Dhennin-Duthille I, Gautier M, Faouzi M, Guilbert A, Brevet M, Vaudry D, Ahidouch A, Sevestre H & Ouaïd-Ahidouch H (2011). High expression of transient receptor potential channels in human breast cancer epithelial cells and tissues: correlation with pathological parameters. *Cell Physiol Biochem* **28**, 813–822.
- Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V & Bonkhoff H (2003). Expression of the  $Ca^{2+}$ -selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* **22**, 7858–7861.
- Hoenderop JG, Vennekens R, Muller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels RJ & Nilius B (2001). Function and expression of the epithelial  $Ca^{2+}$  channel family: comparison of mammalian *ECaC1* and 2. *J Physiol* **537**, 747–761.
- Hoenderop JG, Voets T, Hoefs S, Weidema F, Prenen J, Nilius B & Bindels RJ (2003). Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial  $Ca^{2+}$  channels TRPV5 and TRPV6. *EMBO J* **22**, 776–785.
- Jordt SE & Julius D (2002). Molecular basis for species-specific sensitivity to “hot” chili peppers. *Cell* **108**, 421–430.
- Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H, Li L, Shibata H & Kojima I (1999). Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I. *Nat Cell Biol* **1**, 165–170.
- Kessler T, Wissenbach U, Grobholz R & Flockerzi V (2009). TRPV6 alleles do not influence prostate cancer progression. *BMC Cancer* **9**, 380.
- Lehen'kyi V, Beck B, Polakowska R, Charveron M, Bordat P, Skryma R & Prevarskaya N (2007a). TRPV6 is a  $Ca^{2+}$  entry channel essential for  $Ca^{2+}$ -induced differentiation of human keratinocytes. *J Biol Chem* **282**, 22582–22591.
- Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R & Prevarskaya N (2007b). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via  $Ca^{2+}$ /NFAT-dependent pathways. *Oncogene* **26**, 7380–7385.
- Lehen'kyi V, Vandenberghe M, Belaubre F, Julié S, Castex-Rizzi N, Skryma R, Prevarskaya N. Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011 Feb;25 Suppl 1:12-8.
- Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM & Heller S (2000). Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* **103**, 525–535.

- Lipkin M & Newmark H (1985). Effect of added dietary calcium on colonic epithelial-cell proliferation in subjects at high risk for familial colonic cancer. *N Engl J Med* **313**, 1381–1384.
- Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.
- Montell C & Rubin GM (1989). Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* **2**, 1313–1323.
- Müller D, Hoenderop JG, Meij IC, van den Heuvel LP, Knoers NV, den Hollander AI, Eggert P, Garca-Nieto V, Claverie-Martín F, Bindels RJ. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca<sup>2+</sup> channel (ECAC1). *Genomics*. 2000 Jul 1;67(1):48–53. PubMed PMID: 10945469.
- Nijenhuis T, Hoenderop JG, Nilius B & Bindels RJ (2003). (Patho)physiological implications of the novel epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *Pflugers Arch* **446**, 401–409.
- Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G & Voets T (2004). TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C195–205.
- Peleg S, Sellin JH, Wang Y, Freeman MR & Umar S (2010). Suppression of aberrant transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 6 expression in hyperproliferative colonic crypts by dietary calcium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**, G593–601.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Vassilev PM, Tsukaguchi H, Brown EM & Hediger MA (1999). Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J Biol Chem* **274**, 22739–22746.
- Peng JB, Chen XZ, Berger UV, Weremowicz S, Morton CC, Vassilev PM, Brown EM & Hediger MA (2000). Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 326–332.
- Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, Brown EM, Hediger MA & Freeman MR (2001). CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 729–734.
- Schwarz EC, Wissenbach U, Niemeier BA, Strauss B, Philipp SE, Flockerzi V & Hoth M (2006). TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* **39**, 163–173.
- Semenova SB, Vassilieva IO, Fomina AF, Runov AL & Negulyaev YA (2009). Endogenous expression of TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human leukemia K562 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**, C1098–1104.
- Slattery ML, Sorenson AW & Ford MH (1988). Dietary calcium intake as a mitigating factor in colon cancer. *Am J Epidemiol* **128**, 504–514.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L *et al.* (2002). TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* **418**, 186–190.
- Song Y, Peng X, Porta A, Takanaga H, Peng JB, Hediger MA, Fleet JC & Christakos S (2003). Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25 dihydroxyvitamin D3 in the intestine and kidney of mice. *Endocrinology* **144**, 3885–3894.
- Sudo Y, Matsuo K, Tetsuo T, Tsutsumi S, Ohkura M, Nakai J & Uezono Y (2010). Derived (mutated)-types of TRPV6 channels elicit greater Ca<sup>2+</sup> influx into the cells than ancestral-types of TRPV6: evidence from *Xenopus* oocytes and mammalian cell expression system. *J Pharmacol Sci* **114**, 281–291.
- van der Eerden BC, Weissgerber P, Fratzl-Zelman N, Olausson J, Hoenderop JG, Schreuders-Koedam M, Eijken M, Roschger P, de Vries TJ, Chiba H *et al.* (2011). The transient receptor potential channel TRPV6 is dynamically expressed in bone cells but is not crucial for bone mineralization in mice. *J Cell Physiol* **227**, 1951–1959.
- Vanden Abeele F, Shuba Y, Roudbaraki M, Lemonnier L, Vanoverbergh K, Mariot P, Skryma R & Prevarskaya N (2003). Store-operated Ca<sup>2+</sup> channels in prostate cancer epithelial cells: function, regulation, and role in carcinogenesis. *Cell Calcium* **33**, 357–373.
- Vasil'eva IO, Neguliaev Iu A, Marakhova, II & Semenova SB (2008). [TRPV5 and TRPV6 calcium channels in human T cells]. *Tsitologiya* **50**, 953–957.
- Vennekens R, Voets T, Bindels RJ, Droogmans G & Nilius B (2002). Current understanding of mammalian TRP homologues. *Cell Calcium* **31**, 253–264.
- Vriens J, Owsianik G, Voets T, Droogmans G & Nilius B (2004). Invertebrate TRP proteins as functional models for mammalian channels. *Pflugers Arch* **449**, 213–226.
- Weissgerber P, Kriebis U, Tsvilovskyy V, Olausson J, Kretz O, Stoerger C, Vennekens R, Wissenbach U, Middendorff R, Flockerzi V *et al.* (2011). Male fertility depends on Ca<sup>2+</sup> absorption by TRPV6 in epididymal epithelia. *Sci Signal* **4**, ra27.
- Wissenbach U, Niemeier BA, Fixemer T, Schneidewind A, Trost C, Cavalié A, Reus K, Meese E, Bonkhoff H & Flockerzi V (2001). Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* **276**, 19461–19468.
- Wu Y, Miyamoto T, Li K, Nakagomi H, Sawada N, Kira S, Kobayashi H, Zakohji H, Tsuchida T, Fukazawa M *et al.* (2011). Decreased expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5 and TRPV6 in human renal cell carcinoma associated with vitamin D receptor. *J Urol* **186**, 2419–2425.
- Wu Y, Miyamoto T, Li K, Nakagomi H, Sawada N, Kira S, Kobayashi H, Zakohji H, Tsuchida T, Fukazawa M, Araki I, Takeda M. Decreased expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV5 and TRPV6 in human renal cell carcinoma associated with vitamin D receptor. *J Urol*. 2011 Dec;186(6):2419–25. Epub 2011 Oct 21. PubMed PMID: 22019165.
- Yue L, Peng JB, Hediger MA & Clapham DE (2001). CaT1 manifests the pore properties of the calcium-release-activated calcium channel. *Nature* **410**, 705–709.
- Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA & Freeman MR (2002). Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* **82**, 1755–1764.

## B. TRPV6 détermine l'effet de la Vitamine D3 sur la croissance des cellules PCa

### 1. Résumé

Le récepteur à la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (VDR) est exprimé dans les cellules prostatiques saines mais aussi cancéreuses et son activation provoque généralement l'inhibition de la croissance et l'arrêt du cycle cellulaire (Lou YR. Et al., 2004). Cependant, les premiers tests cliniques utilisant la 1,25-dihydroxyvitamine D3 (Vit-D3) dans le traitement du cancer de la prostate (PCa) se sont révélés, dans de nombreux cas, soit imprévisibles soit inefficaces ce qui doit faire intervenir d'autres récepteurs nucléaires et voies de signalisation (Peehl DL. Et al., 2004).

Dans l'article suivant, nous avons donc cherché à comprendre les effets antagonistes de la Vit-D3 sur les cellules PCa et sur le canal TRPV6 dont l'expression peut être régulée par le VDR et par le récepteur aux androgènes (AR) (pour revue voir Lehen'kyi V. et al., 2011c).

Nous avons donc commencé par étudier l'effet de la Vit-D3 sur la lignée de cellules PCa androgéno-dépendantes LNCaP. Nous avons alors observé une diminution de la prolifération cellulaire mais pas d'effet sur l'expression de TRPV6 tandis qu'en conditions pauvres en sérum (2% SVF), selon la dose utilisée de Vit-D3, l'expression de TRPV6 augmente ainsi que la prolifération des LNCaP. Donc, l'effet de la Vit-D3 sur la prolifération des LNCaP dépend de la concentration en hormones stéroïdiennes (présentes dans le sérum). Cependant, l'extinction de TRPV6 ou du AR annule l'effet pro-prolifératif de la Vit-D3 sur les LNCaP en condition 2% SVF et augmente le nombre de cellules dans la phase sub-G1 du cycle cellulaire. L'effet de la Vit-D3 sur la prolifération des LNCaP en 2% SVF dépend donc de l'expression de TRPV6 dont l'absence entraîne l'apoptose de ces cellules PCa.

Ensuite nous avons montré que l'entrée constitutive de  $Ca^{2+}$  dans les LNCaP en condition 2% SVF dépend principalement du canal TRPV6 et que l'utilisation de la Vit-D3 augmente non seulement la  $[Ca^{2+}]_{\text{cytoplasmique}}$  basale mais aussi l'entrée constitutive de  $Ca^{2+}$  via TRPV6.

Enfin, nous avons étudié l'effet de la Vit-D3 sur les lignées de cellules PCa androgéno-indépendantes (DU-145) dépourvues du AR et androgéno-insensibles (LNCaP C4-2) dont le AR est non fonctionnel. Dans les DU-145, la Vit-D3 augmente la prolifération cellulaire et l'expression de TRPV6 (dans une moindre mesure par rapport aux LNCaP) en condition 2% SVF mais n'a pas d'effet sur la prolifération et l'expression de TRPV6 en condition 10% SVF. Dans les LNCaP C4-2, la Vit-D3 a un effet anti-prolifération très fort indépendamment de la concentration de sérum. Or, dans les LNCaP NE (sérum déstéroïdé), la Vit-D3 n'a plus d'effet sur l'expression de TRPV6 donc l'effet de la Vit-D3 sur l'expression de TRPV6 dépend non seulement de la présence d'un AR fonctionnel mais aussi de la présence de stéroïdes à faible concentration.

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

V'yacheslav Lehen'kyi<sup>1,2,3</sup>, Maylis Raphaël<sup>1,2,3</sup>, Agathe Oulidi<sup>1,2,3</sup>, Matthieu Flourakis<sup>1,2</sup>, Sergii Khalimonchik<sup>1,2</sup>, Artem Kondratskyi<sup>1,2</sup>, Dmitri V. Gordienko<sup>3</sup>, Brigitte Mauroy<sup>4</sup>, Jean-Lois Bonnal<sup>4</sup>, Roman Skryma<sup>1,2</sup>, Natalia Prevarskaya<sup>1,2\*</sup>

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

## Abstract

Despite remarkable advances in the therapy and prevention of prostate cancer it is still the second cause of death from cancer in industrialized countries. Many therapies initially shown to be beneficial for the patients were abandoned due to the high drug resistance and the evolution rate of the tumors. One of the prospective therapeutical agents even used in the first stage clinical trials, 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, was shown to be either unpredictable or inefficient in many cases. We have already shown that TRPV6 calcium channel, which is the direct target of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor, positively controls prostate cancer proliferation and apoptosis resistance (Lehen'kyi *et al.*, *Oncogene*, 2007). However, how the known 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> antiproliferative effects may be compatible with the upregulation of pro-oncogenic TRPV6 channel remains a mystery. Here we demonstrate that in low steroid conditions 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> upregulates the expression of TRPV6, enhances the proliferation by increasing the number of cells entering into S-phase. We show that these pro-proliferative effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> are directly mediated via the overexpression of TRPV6 channel which increases calcium uptake into LNCaP cells. The apoptosis resistance of androgen-dependent LNCaP cells conferred by TRPV6 channel is drastically inverted when 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> effects were combined with the successful TRPV6 knockdown. In addition, the use of androgen-deficient DU-145 and androgen-insensitive LNCaP C4-2 cell lines allowed to suggest that the ability of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> to induce the expression of TRPV6 channel is a crucial determinant of the success or failure of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-based therapies.

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

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

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

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

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

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

\* E-mail: [natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr](mailto:natacha.prevarskaya@univ-lille1.fr)

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

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

Different nuclear receptors have been targeted for therapy and among them 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> which exerts a multitude of anti-tumor activities against cultured prostate cancer cells and xenografts [5]. Normal and malignant prostatic epithelial cells express vitamin D<sub>3</sub> receptor (VDR), and activation of VDR by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> generally results in inhibition of proliferation and cell cycle arrest [6]. However, to prevent or

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

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

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

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

## Materials and Methods

### Cell culture

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

### RT- PCR

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

### Quantitative real-time PCR

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

### Western-blotting

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

### Immunocytochemistry

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

**Table 1.** Primers and siRNA.

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

doi:10.1371/journal.pone.0016856.t001



### Cell proliferation

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

### Cell cycle and apoptosis assays

Flow cytometry assays were performed on cell populations cultured in triplicate 25-cm<sup>2</sup> flasks as originally described [18]. Approximately 10<sup>6</sup> cells were fixed with 1 ml ice-cold 70% methanol for 30 min. After fixing, cells were pelleted by centrifugation to remove the fixatives, washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) at 4°C, resuspended in 100  $\mu$ l PBS, treated with 100  $\mu$ l RNase A (1 mg/ml, Sigma), and stained with propidium iodide (PI, Sigma) at a final concentration of 50  $\mu$ g/ml. The stained cells were stored at 4°C in the dark and analyzed within 2 h. The stained samples were measured on a FACScan flow cytometer (Becton–Dickinson, San Jose, CA). Data were acquired for 7000 events with a variation coefficient of less than 5%, and red fluorescence was measured using a fluorescence detector 3 (FL3) on the X-axis. The data were stored and analyzed using CellQuest software to assess cell-cycle distribution patterns (subG1 (apoptotic), G0/G1, S, and G2/M phases).

### Calcium Imaging

Cells were plated onto glass coverslips and were loaded with 4  $\mu$ M Fura-2 AM at room temperature for 45 min in the growth medium. Recordings were performed in HBSS containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose and 10 HEPES adjusted to pH 7.4 with NaOH. CaCl<sub>2</sub> was adjusted to 0.07 mM or 1.8 mM depending on the experiment. The coverslips were then placed in a perfusion chamber on the stage of the microscope. Fluorescence images of the cells were recorded with a video image analysis system (Quanticell). The Fura-2 fluorescence, at the emission wavelength of 510 nm, was recorded by exciting the probe alternatively at 340 and 380 nm. The signal ratio at 340/380 nm was converted into [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> level using an *in vitro* calibration.

### siRNA cell transfection

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

### Reagents

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

### Statistics

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

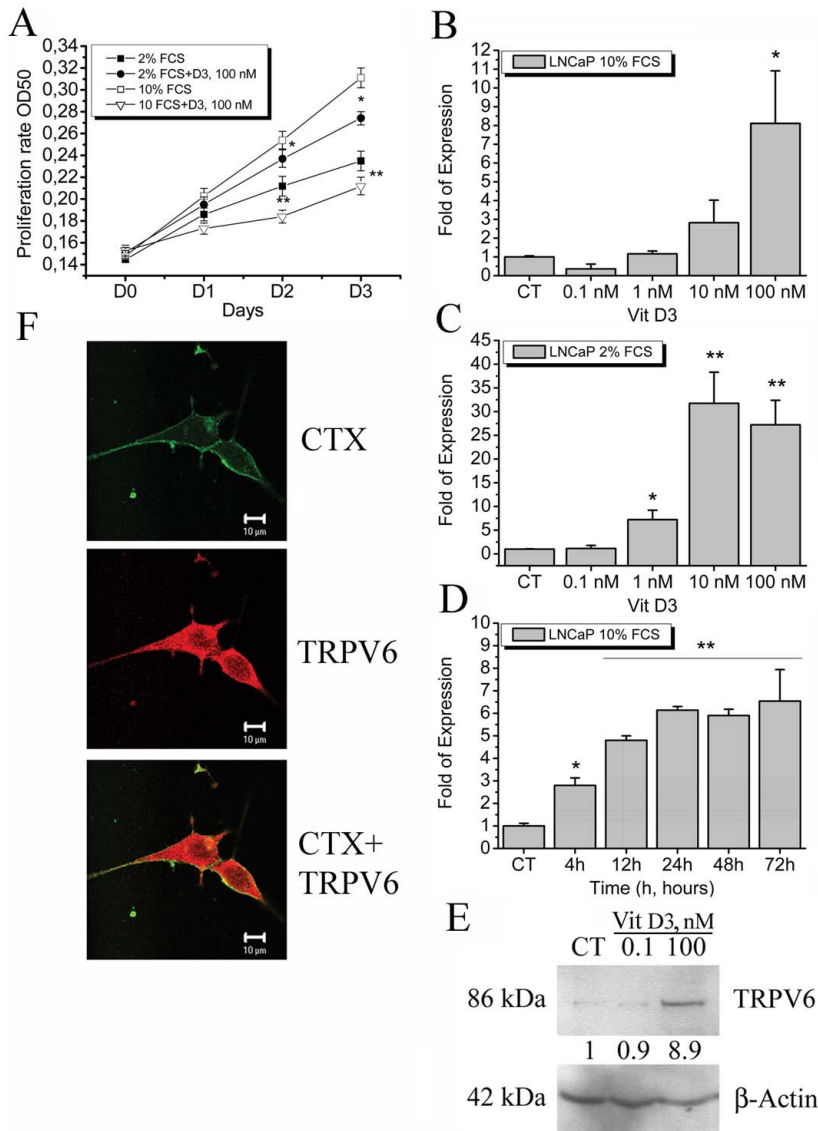
## Results

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

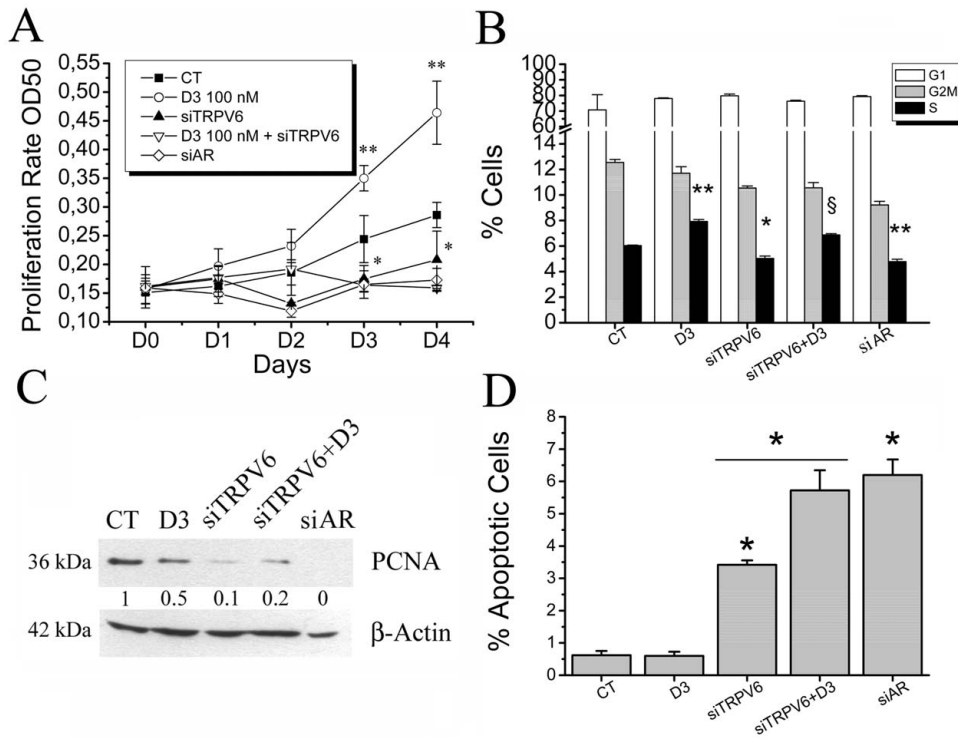
### TRPV6 is involved in 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced proliferation of LNCaP cells

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

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



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



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

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

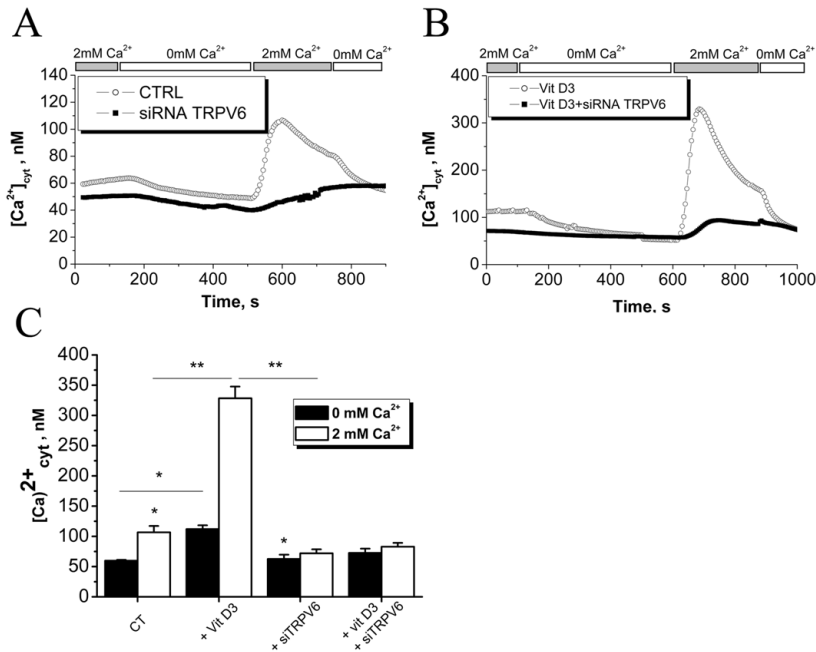
We also monitored a protein level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) using the same conditions. PCNA appeared to be significantly decreased upon siRNA-TRPV6 knockdown. 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated cells expressed 2-fold less PCNA as was also observed by the combined treatment of siRNA-TRPV6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

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

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

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

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



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

LNCaP cells and TRPV6 also accounts for 1,25-dihydroxyvitamin D3-mediated enhanced Ca<sup>2+</sup>-uptake.

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

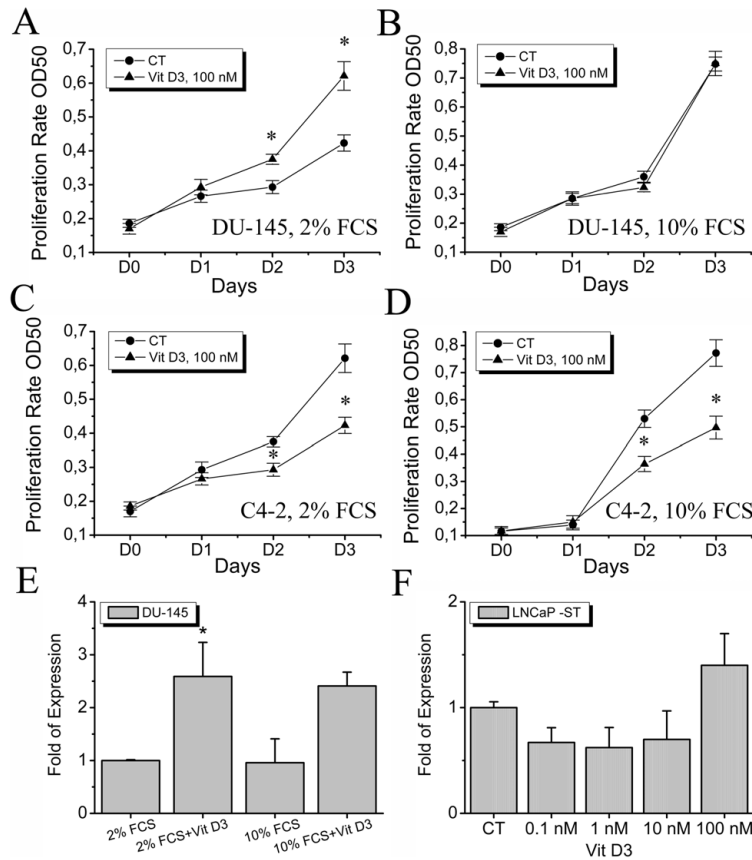
Two different androgen-independent cell lines were used: an androgen receptor-deficient DU-145 and androgen-insensitive LNCaP C4-2 cell lines. Cells were cultivated in the same conditions of 2 or 10% FCS supplemented RPMI medium and the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 were studied (Fig. 4). The effects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

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

#### Discussion

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

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



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

doi:10.1371/journal.pone.0016856.g004

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Author Contributions

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

## References

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

10. Vanden Abeele F, Skryma R, Shuba Y, Van Coppenolle F, Slomianny C, et al. (2002)  $\text{Bcl-2}$ -dependent modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1: 169–179.
11. Skryma R, Mariot P, Bourhis XL, Coppenolle FV, Shuba Y, et al. (2000) Store depletion and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J Physiol* 527(Pt 1): 71–83.
12. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, et al. (2004) TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6  $\text{Ca}^{2+}$  channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1359–1363.
13. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H (2003) Expression of the  $\text{Ca}^{2+}$ -selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22: 7858–7861.
14. Vanden Abeele F, Lemonnier L, Thebaud S, Lepage G, Parys JB, et al. (2004) Two types of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 30326–30337.
15. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N (2007) TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via  $\text{Ca}^{2+}$ /NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26: 7380–7385.
16. Peng JB, Zhuang L, Berger UV, Adam RM, Williams BJ, et al. (2001)  $\text{CaT1}$  expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 282: 729–734.
17. Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, MacLeod NB, et al. (2005) Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 19: 2685–2695.
18. Krishan A (1975) Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 66: 189–193.
19. van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels RJ (2003) Regulation of the epithelial  $\text{Ca}^{2+}$  channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285: G78–85.
20. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ (2005) TRPV5 and TRPV6 in  $\text{Ca}^{2+}$  (re)absorption: regulating  $\text{Ca}^{2+}$  entry at the gate. *Pflügers Arch* 451: 181–192.
21. Yamauchi D, Ravendran NN, Pondugula SR, Kampalli SB, Sanneman JD, et al. (2005) Vitamin D upregulates expression of ECaC1 mRNA in semicircular canal. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1353–1357.
22. Bodding M, Fecher-Trost C, Flockerzi V (2003) Store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J Biol Chem* 278: 50872–50879.
23. Zhao XY, Ly LH, Pechl DM, Feldman D (1997)  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinology* 138: 3290–3298.
24. Cheskis B, Lemon BD, Uskokovic M, Lomedico PT, Freedman LP (1995) Vitamin D<sub>3</sub>-retinoid X receptor dimerization, DNA binding, and transactivation are differentially affected by analogs of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Mol Endocrinol* 9: 1814–1824.
25. Banerjee P, Chatterjee M (2003) Antiproliferative role of vitamin D and its analogs—a brief overview. *Mol Cell Biochem* 253: 247–254.
26. Hsieh TY, Ng CY, Mallouh C, Tazaki H, Wu JM (1996) Regulation of growth, PSA/PAP and androgen receptor expression by 1  $\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  in the androgen-dependent LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 141–146.
27. Hsieh T, Wu JM (1997) Induction of apoptosis and altered nuclear/cytoplasmic distribution of the androgen receptor and prostate-specific antigen by  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  in androgen-responsive LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 235: 539–544.
28. Eelen G, Verlinden L, van Camp M, van Hummelen P, Marchal K, et al. (2004) The effects of  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  on the expression of DNA replication genes. *J Bone Miner Res* 19: 133–146.
29. Gniadecki R (1996) Activation of Raf-mitogen-activated protein kinase signaling pathway by 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in normal human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 106: 1212–1217.
30. Martin JL, Pattison SL (2000) Insulin-like growth factor binding protein-3 is regulated by dihydrotestosterone and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in LNCaP prostate carcinoma cells. *Endocrinology* 141: 2401–2409.
31. Koh E, Morimoto S, Fukuo K, Itoh K, Hironaka T, et al. (1988) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. *Life Sci* 42: 215–223.
32. Krohn K, Hallner D, Hugel U, Himmele R, Klaus G, et al. (2003) 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 73: 400–410.
33. Buitrago CG, Pardo VG, de Boland AR, Boland R (2003) Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase C $\alpha$  mediates  $1\alpha,25\text{(OH)}_2\text{-vitamin D}_3$  regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *J Biol Chem* 278: 2199–2205.
34. Gniadecki R (1996) Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: dependence on cell culture conditions. *J Invest Dermatol* 106: 510–516.
35. Gache C, Berthois Y, Cvitkovic E, Martin PM, Saez S (1999) Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Breast Cancer Res Treat* 55: 29–39.
36. Rashid SF, Mountford JC, Gombart AF, Campbell MJ (2001)  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  displays divergent growth effects in both normal and malignant cells. *Steroids* 66: 433–440.
37. Wiers KM, Lozano Y, Messingham KA, Metz RJ, Young MR (1997)  $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$  activates T cells of tumor bearers through protein phosphatase 2A. *Cancer Immunol Immunother* 44: 97–102.
38. Tischler AS, Powers JF, Downing JC, Riseberg JC, Shahsavari M, et al. (1996) Vitamin D<sub>3</sub>, lactose, and xylitol stimulate chromaffin cell proliferation in the rat adrenal medulla. *Toxicol Appl Pharmacol* 140: 115–123.
39. Grauer A, Baier R, Ziegler R, Raue F (1995) Crucial role of c-myc in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> control of C-cell-carcinoma proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 922–927.
40. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, et al. (2005) MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21: 2933–2942.
41. Banwell CM, Singh R, Stewart PM, Uskokovic MR, Campbell MJ (2003) Antiproliferative signalling by 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in prostate and breast cancer is suppressed by a mechanism involving histone deacetylation. *Recent Results Cancer Res* 164: 83–96.
42. Gavrilov V, Steiner M, Shany S (2005) The combined treatment of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and a non-steroid anti-inflammatory drug is highly effective in suppressing prostate cancer cell line (LNCaP) growth. *Anticancer Res* 25: 3425–3429.
43. Swami S, Krishnan AV, Pechl DM, Feldman D (2005) Genistein potentiates the growth inhibitory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in DU145 human prostate cancer cells: role of the direct inhibition of CYP24 enzyme activity. *Mol Cell Endocrinol* 241: 49–61.

## 2. Discussion

L'une des principales nouveautés apportée par ces résultats est l'effet pro-prolifératif de la 1,25-dihydroxy-vitamine D3 (Vit-D3) sur les cellules PCa androgéno-dépendantes LNCaP. En effet, nous avons montré qu'un traitement à la Vit-D3 induit à la fois une augmentation du taux de prolifération cellulaire et du nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire. Cependant, ces effets dépendent de l'expression et de l'activité du canal calcique TRPV6, déjà impliqué dans la croissance et la résistance à l'apoptose des cellules PCa (Lehen'kyi et al., 2007c). Ainsi, les effets anti-prolifératifs de la Vit-D3 reportés précédemment pourraient être compromis lors d'une surexpression de TRPV6.

En effet, de nombreuses publications ont déjà montré que la Vit-D3 est capable d'induire l'expression de TRPV6 dans l'intestin (van Abel et al., 2006), dans les reins (Nijenhuis et al., 2005), dans les canaux semi-circulaires (Yamauchi et al., 2005) ainsi que dans les cellules cancéreuses de la prostate (Bödding et al., 2003). Cinq éléments de réponse au récepteur de la Vit-D3 ont été détectés dans le promoteur du gène *trpv6* suggérant une activation directe de l'expression de ce gène par la Vit-D3 via son récepteur nucléaire (Wang et al., 2005). Nous avons alors confirmé cette induction de l'expression de TRPV6 par un traitement à la Vit-D3 avec une intensité croissante selon la dose et le temps de traitement. Cependant, nos résultats suggèrent également que cette induction est dépendante de la présence d'androgènes dans le milieu de culture. Il est connu que les effets de la VitD3 dans les LNCaP dépendent également de la présence des androgènes qui exercent avec la VitD3 une co-régulation des gènes cibles. Ainsi, l'ajout de DHT (dihydrotestostérone, métabolite biologiquement actif de la testostérone) restaure les effets anti-prolifératifs de la VitD3 tandis que l'ajout de Casodex (antagoniste des androgènes sur le récepteur nucléaire) bloque totalement les effets anti-prolifératifs de la Vit-D3 ainsi que la stimulation de la PSA dans les LNCaP en culture dans un milieu complété en Sérum de veau foetal (SVF) (Zhao et al., 1997).

La propriété de la Vit-D3 à inhiber la croissance cellulaire prostatique a tout d'abord été mise en évidence sur des cellules primaires issues de prostatites saines ou d'hyperplasies bénignes de la prostate (BHP), puis issues de cancers de la prostate (PCa) et enfin dans plusieurs modèles de xénogreffes de cellules PCa *in vivo* (Krishnan et al., 2003). Cependant, aucune relation avec l'expression de TRPV6 n'avait été démontrée jusque là.

Le mécanisme sous-jacent à cette propriété de la Vit-D3 n'est pas encore tout à fait clair mais multifactoriel et les voies de signalisation par p21 et p27 semblent être cruciales (Banerjee and Chatterjee, 2003).

Nous sommes les premiers à avoir montré que la Vit-D3 peut favoriser la prolifération cellulaire lorsqu'elle est directement impliquée dans l'induction de l'expression de TRPV6 dans la lignée de cellules PCa androgéno-dépendantes LNCaP. Ainsi, la problématique concernant l'efficacité d'un traitement à la Vit-D3 est toujours d'actualité, surtout dans les stades de cancers prostatiques où TRPV6 est fortement exprimé ou lorsque les cellules PCa répondent au traitement par une augmentation de l'expression de ce canal.

Nos données ne sont pas en contradiction avec les résultats publiés précédemment et sont au contraire en accord avec l'hypothèse selon laquelle les effets anti-prolifératifs de la Vit-D3



passeraient par une modulation de l'expression de PCNA (Hsieh et al., 1996). En effet la diminution du taux de protéine PCNA après un traitement à la Vit-D3 dans les LNCaP est encore plus importante en l'absence de TRPV6 (siTRPV6) et cela provoque un arrêt de la prolifération cellulaire suggérant un mécanisme d'opposition de TRPV6 aux effets de la Vit-D3.

La vit-D3 active aussi l'expression de la PSA et du récepteur aux androgènes dont la présence augmente dans le noyau (Hsieh and Wu, 1997). Or, la combinaison entre la Vit-D3 et le DHT favorise la synthèse d'ADN dans les LNCaP (Martin and Pattison, 2000). La Vit-D3 stimule également la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires de rat (Koh et al., 1988), des myoblastes (Buitrago et al., 2003), des chondrocytes (Krohn et al., 2003), des lignées cellulaires de leucémie myéloïde HL-60 et KG-1a (Rashid et al., 2001), des cellules chromaffines (Tischler et al., 1996) et des cellules épithéliales mammaires saines ou cancéreuses (Gache et al., 1999). De plus, l'analyse du promoteur de *trpv6* par MatInspector 7.7.3 a révélé des sites putatifs de réponse au récepteur de la Vit-D3 mais aussi à d'autres récepteurs stéroïdiens (récepteurs aux glucocorticoïdes et récepteurs aux androgènes) ce qui pourrait expliquer pourquoi, en conditions riches en hormones stéroïdiennes, l'expression de TRPV6 n'est pas affectée ou même diminuée par la présence de Vit-D3.

Finalement, nous avons montré que TRPV6 est directement impliqué dans les effets pro-prolifératifs de la Vit-D3 sur les LNCaP lorsque le milieu contient peu d'hormones stéroïdiennes. Donc le succès ou non d'un traitement du cancer de la prostate par la Vit-D3 dépend entre autre de la capacité des cellules PCa à exprimer TRPV6 sous l'effet de la Vit-D3 en fonction de la présence ou non d'un récepteur fonctionnel aux androgènes ou d'hormones stéroïdiennes dans l'environnement tumoral.

## C. TRPV6 est transloqué à la membrane plasmique par un mécanisme lié au SOCE par Orai1 et contrôle la survie des cellules PCa

### 1. Résumé

De précédents travaux au laboratoire montrent que le canal TRPV6 est impliqué dans la prolifération des cellules PCa androgéno-dépendantes LNCaP en activant la voie du facteur de transcription NFAT mais participe aussi à la résistance à l'apoptose basale de ces cellules (Lehen'kyi et al., 2007c). Précédemment, ce canal avait déjà été mis en évidence dans la prolifération de la lignée de cellules embryonnaires rénales HEK (Schwarz et al., 2006). Or, l'expression de ce canal évolue au cours de la progression du PCa (Fixemer et al., 2003). Nous avons donc voulu comprendre le rôle de ce canal dans les cellules PCa *in vitro* et dans le développement tumoral *in vivo*.

Nous avons alors commencé par vérifier l'expression différentielle de la protéine TRPV6 au cours de la progression du PCa ainsi que celle d'Orai1, de TRPC1 et de Stim1 corrélés à des marqueurs de prolifération (Ki-67), d'apoptose (caspase 3 clivée) et de PCa (antigène spécifique de la prostate-PSA). Nous avons confirmé que TRPV6 n'est presque pas détectable dans les hyperplasies bénignes de la prostate et que son expression augmente dans les adénocarcinomes de grade 7 avec une localisation hétérogène à l'apex de certaines cellules. Le canal Orai1 qui est plutôt basal dans la prostate saine se trouve délocalisé au niveau luminal et apical dans les BHP et adénocarcinomes 7. L'expression des protéines Stim1 et TRPC1 est plutôt homogène et stable dans la prostate saine, la BHP et l'adénocarcinome.

Ensuite, à partir de clones stables de surexpression de TRPV6 dans les lignées cellulaires HEK (embryonnaire de rein) et LNCaP, PC3 (cancéreuses prostatiques androgéno-dépendantes et -indépendantes respectivement), nous avons confirmé que le canal TRPV6 stimule la prolifération cellulaire, mais alors qu'il potentialise l'apoptose induite par la thapsigargine (TG) et le cisplatine (CIS) dans les cellules HEK-pIRES-TRPV6, il protège les cellules LNCaP-pIRES-TRPV6 et PC3-pIRES-TRPV6 de l'apoptose induite par ces agents pharmacologiques inducteurs de stress réticulaire. Au contraire, l'extinction de TRPV6 par un siTRPV6 dans les cellules LNCaP augmente le nombre de cellules apoptotiques après traitement à la TG ou au CIS. Donc le canal TRPV6 confère aux cellules PCa une résistance à l'apoptose due à un stress réticulaire en plus d'une meilleure capacité à proliférer ce qui n'est pas le cas pour les cellules HEK.

Puis, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de régulation de TRPV6 qui pourraient expliquer le lien entre ce canal et la résistance à l'apoptose induite par un stress réticulaire. Sachant que la régulation du canal TRPV6 relève principalement de la quantité de canaux à la membrane plasmique, nous avons étudié l'effet de la TG sur la translocation de ce canal à la membrane. Nous avons observé un effet rapide de la TG, après seulement 2 minutes de traitement, puis une augmentation progressive de canaux TRPV6 membranaires sous l'effet

de la TG pendant 6H et enfin un retour au niveau basal après 24 h de traitement ce qui montre que la TG induit la translocation de TRPV6 à la membrane plasmique. De plus, il est connu que la translocation de TRPV6 peut être régulée par le complexe S100A10-Annexine II (Van de Graaf et al., 2003). Dans les LNCaP, nous avons montré l'expression de S100A10 et de l'annexine I qui, après extinction par siRNA, n'assurent plus la translocation de TRPV6 à la membrane plasmique sous l'effet de la TG d'une part et augmentent le taux de cellules LNCaP en apoptose après un traitement à la TG ou au CIS. C'est donc bien la translocation de TRPV6 à la membrane plasmique par le complexe dépendant du calcium S100A11-Annexine I qui provoque la résistance à l'apoptose après un stress réticulaire (Fig. annexe 7).

Enfin, nous avons étudié le potentiel oncogénique de TRPV6 *in vivo* en réalisant des xéno greffes sur des souris mâles immunodéprimées (swiss nude) âgées de 6 semaines par une unique injection sous cutanée des clones stables PC3-pIRES-TRPV6 et DU-pIRES-TRPV6 ou des clones contrôles. Les analyses de la taille et de la masse des tumeurs ont clairement prouvé que TRPV6 potentialise la formation des tumeurs et donc rend les cellules cancéreuses PC3 et DU-145 encore plus agressives. Les analyses immunohistologiques ont effectivement montré la surexpression de TRPV6 dans les tumeurs générées par les clones de surexpression (PC3-pIRES-TRPV6 et DU-pIRES-TRPV6) ainsi qu'une sur-représentation des marqueurs de prolifération cycline D1, cdk4 et PCNA. De plus, ces tumeurs sont plus grosses (volume et masse) que celles générées par les clones PC3-pIRES-CTL et DU-pIRES-CTL respectivement tandis que l'injection intra-péritonéale quotidienne de siTRPV6 (voir annexe II) ralentit la croissance tumorale *in vivo*.

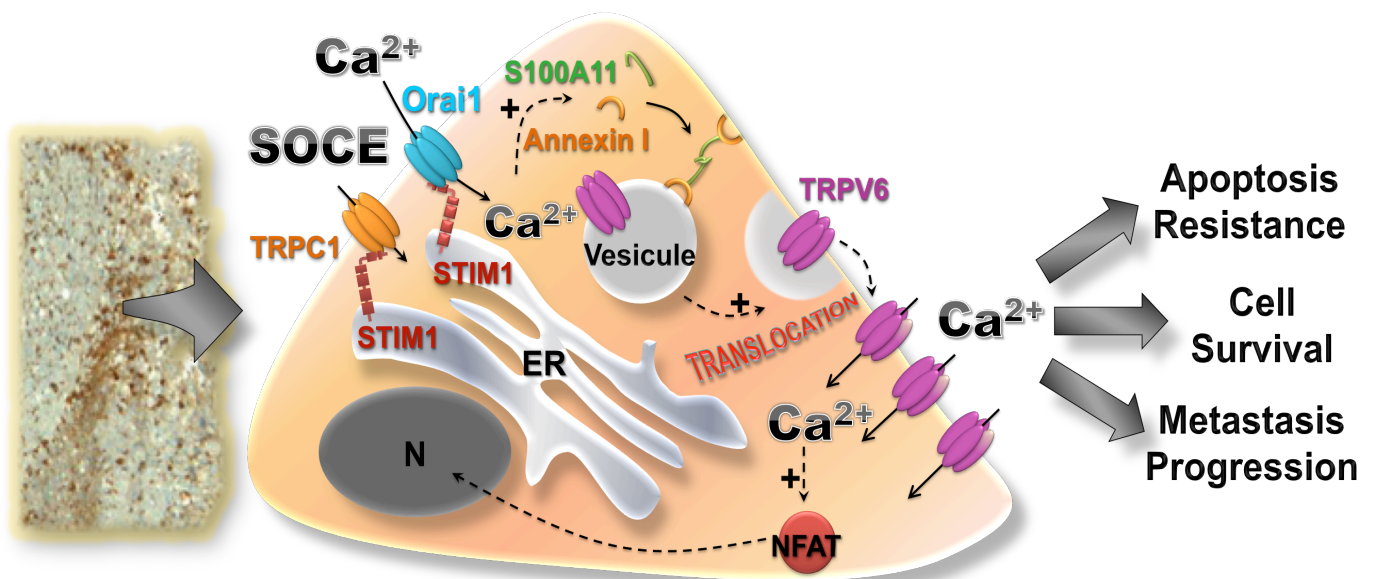


Figure 7: Implication du canal calcique TRPV6 et de sa translocation à la membrane plasmique dans la progression des cellules cancéreuses prostatiques

# TRPV6 calcium channel translocates to the plasma membrane via Orai1-mediated mechanism and controls cancer cell survival

Maylis Raphaël<sup>a,1</sup>, V'yacheslav Lehen'kyi<sup>a,1,2</sup>, Matthieu Vandenberghe<sup>a,1,3</sup>, Benjamin Beck<sup>a,4</sup>, Sergiy Khalimonchuk<sup>a</sup>, Fabien Vanden Abeele<sup>a</sup>, Leonardo Farsetti<sup>a</sup>, Emmanuelle Germain<sup>a</sup>, Alexandre Bokhobza<sup>a</sup>, Adriana Mihalache<sup>b</sup>, Pierre Gosset<sup>c</sup>, Christoph Romanin<sup>c</sup>, Philippe Clézardin<sup>d</sup>, Roman Skryma<sup>a</sup>, and Natalia Prevarskaya<sup>a,2,5</sup>

<sup>a</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1003, Equipe Labellisée par la Ligue Nationale Contre le Cancer, Laboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; <sup>b</sup>Department of Cell Pathology, Catholic Institute of Lille, University of Lille Nord de France, St. Vincent Hospital, 59020 Lille, France; <sup>c</sup>Institute for Biophysics, Johannes Kepler Universität, A-4040 Linz, Austria; and <sup>d</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité Mixte de Recherche 1033, Faculty of Medicine Lyon-Est, 69372 Lyon Cedex 08, France

Edited by Lutz Birnbaumer, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, and approved August 1, 2014 (received for review July 15, 2014)

**Transient receptor potential vanilloid subfamily member 6 (TRPV6) is a highly selective calcium channel that has been considered as a part of store-operated calcium entry (SOCE). Despite its first discovery in the early 2000s, the role of this channel in prostate cancer (PCa) remained, until now, obscure. Here we show that TRPV6 mediates calcium entry, which is highly increased in PCa due to the remodeling mechanism involving the translocation of the TRPV6 channel to the plasma membrane via the Orai1/TRPC1-mediated Ca<sup>2+</sup>/Annexin I/S100A11 pathway, partially contributing to SOCE. The TRPV6 calcium channel is expressed de novo by the PCa cell to increase its survival by enhancing proliferation and conferring apoptosis resistance. Xenografts in nude mice and bone metastasis models confirmed the remarkable aggressiveness of TRPV6-overexpressing tumors. Immunohistochemical analysis of these demonstrated the increased expression of clinical markers such as Ki-67, prostate specific antigen, synaptophysin, CD31, and CD56, which are strongly associated with a poor prognosis. Thus, the TRPV6 channel acquires its oncogenic potential in PCa due to the remodeling mechanism via the Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup>/Annexin I/S100A11 pathway.**

Prostate cancer (PCa) develops as a slow cancer in the majority of cases and is still the second most lethal tumor among men (1, 2). It belongs to the group of malignant tumors where enhanced proliferation is accompanied by acquired resistance to apoptosis (3, 4). In addition, PCa cells become resistant to any anticancer treatment during PCa progression, acquiring more aggressive phenotype characterized by the enhanced cell survival and apoptosis resistance. Despite a growing number of studies, the mechanisms leading to these phenotypes are still poorly defined. An understanding of the factors that drive the evolution of PCa is vital for the development of new therapies and new markers for advanced PCa.

One such target has already been suggested. Transient receptor potential vanilloid subfamily member 6 (TRPV6) is a highly selective calcium channel (5). Intriguingly, it is absent in the healthy prostate and becomes expressed in prostate adenocarcinoma, and TRPV6 mRNA levels were shown to significantly correlate with the Gleason grading and are abundantly expressed in lymph node metastasis of prostate origin (6, 7). Although, in the beginning of the 2000s, TRPV6 was suggested as a prognostic marker to treat advanced prostate cancer (8), nothing is known thus far regarding the molecular mechanisms in which it is involved or the reason why PCa cells express the TRPV6 channel: does it have an oncogenic potential or play a role as a tumor suppressor?

The role of calcium in global cancer-related cell signaling pathways is uncontested (9, 10). Alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in PCa are known to increase proliferation (11, 12) and induce differentiation (13) and apoptosis (14–16). Indeed, Ca<sup>2+</sup> transients

in cancer cells were shown to stimulate proliferation (12) or induce migration (17), while sustained increase may prevent apoptosis (18). Because, on one hand, TRPV6 is overexpressed in PCa, and on the other hand, it controls Ca<sup>2+</sup> homeostasis in these cells, our studies were devoted to show the role and significance of the TRPV6 channel in Ca<sup>2+</sup> signaling/remodeling in PCa, with a particular insight into molecular mechanisms of its implication therein, its involvement in such calcium-dependent processes as cell survival and apoptosis resistance, and to confirm its role in PCa tumorigenesis in vivo.

## Results

**The Expression of TRPV6 Protein Is Associated with the Cancer Progression.** Although the expression of the TRPV6 channel in human tissues has already been reported using mRNA-specific probes (7, 8) and antibodies (19), we intended to study its expression in human PCa samples using an antibody verified against

## Significance

**Transient receptor potential vanilloid subfamily member 6 (TRPV6) is a highly selective Ca<sup>2+</sup> channel that exercises its normal physiological function via Ca<sup>2+</sup> absorption in the intestine and kidney. Intriguingly, we show that the TRPV6 channel may switch from its well-known constitutive activity to the store operated due to the remodeling mechanism involving STIM1/Orai1/TRPC1-induced activation of TRPV6 channel translocation to the plasma membrane via the Ca<sup>2+</sup>/Annexin I/S100A11 pathway. Moreover, we demonstrate that the discovered mechanism is used by prostate cancer cells. This channel is absent in healthy prostate and is expressed de novo in prostate cancer cells, where it changes the role by supplying Ca<sup>2+</sup>, which is used in cancer to increase cell survival.**

Author contributions: M.R., V.L., F.V.A., and N.P. designed research; V.L., P.G., C.R., P.C., and R.S. contributed new reagents/analytic tools; M.R., V.L., M.V., B.B., S.K., F.V.A., L.F., E.G., A.B., and A.M. performed research; M.R., V.L., M.V., B.B., S.K., F.V.A., L.F., E.G., A.M., P.G., C.R., P.C., and R.S. analyzed data; and V.L. and N.P. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>M.R., V.L., and M.V. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>V.L. and N.P. contributed equally to this work.

<sup>3</sup>Present address: Department of Medicine, Dermatology Research, University of California, San Diego, La Jolla, CA 92121.

<sup>4</sup>Present address: Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Université Libre de Bruxelles, 1070 Bruxelles, Belgium.

<sup>5</sup>To whom correspondence should be addressed. Email: [Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr](mailto:Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr).

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1413409111/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1413409111/-DCSupplemental).

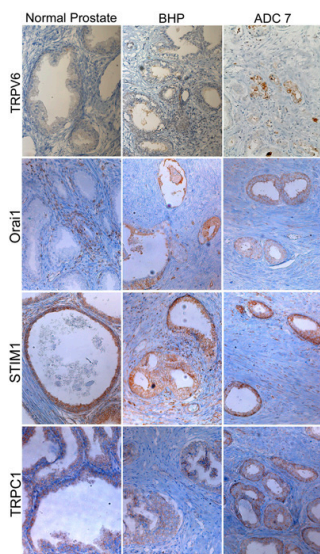
heterologously expressed TRPV6-YFP chimera following anti-GFP antibody, as well as in confocal imaging using pIRES-TRPV6 nucleofected HEK293 cells (Fig. S1 A and B). Our data show that TRPV6 may be very slightly expressed in benign prostatic hyperplasia (BHP), and its expression increases in carcinomatous prostates (Fig. 1). Its expression is heterogeneous and is found at the apex of certain epithelial cancer cells in samples of adenocarcinomas (ADCs) having a Gleason score of 7. The Orai1 channel is mostly expressed in basal cells in the normal prostate and is subject to relocation in apex/intra luminal cells in BHP and cancer. STIM1 and TRPC1 are homogeneously expressed in prostate epithelial and cancer cells. The sections from the same patients were also stained for Ki-67, caspase-3–cleaved fragment, and prostate specific antigen (PSA). Like the TRPV6 channel, Ki-67 staining was also elevated in ADCs having a Gleason score of 7, and the caspase-3–cleaved fragment is almost absent in apical epithelial cells from the same patients (Fig. S1C). Antibody against PSA showed uniform staining of benign or malignant epithelial cells. Thus, TRPV6 expression correlates with the Gleason score, Orai1, TRPC1, PSA, and the expression of the proliferation marker Ki-67.

**TRPV6 Channel Translocation to the Plasma Membrane Is Regulated via  $Ca^{2+}$ /Annexin I/S100A11 Signaling Independent of STIM1.** Because we have previously shown that store-operated channels (SOCs) play an important role in apoptosis regulation and remodeling in apoptosis-resistant phenotypes (13, 20), we aimed at studying whether the TRPV6 channel is involved in calcium entry following endoplasmic reticulum (ER) store depletion [store-operated calcium entry (SOCE)]. ER store depletion by thapsigargin (TG) is known to induce  $I_{SOCE}$  currents with distinct kinetics and magnitude (21). To determine ion channels involved in SOCE, we used an siRNA strategy to inhibit the expression of each protein candidate (Fig. 2 A and B; see Fig. S2 A–F for siRNA controls). In

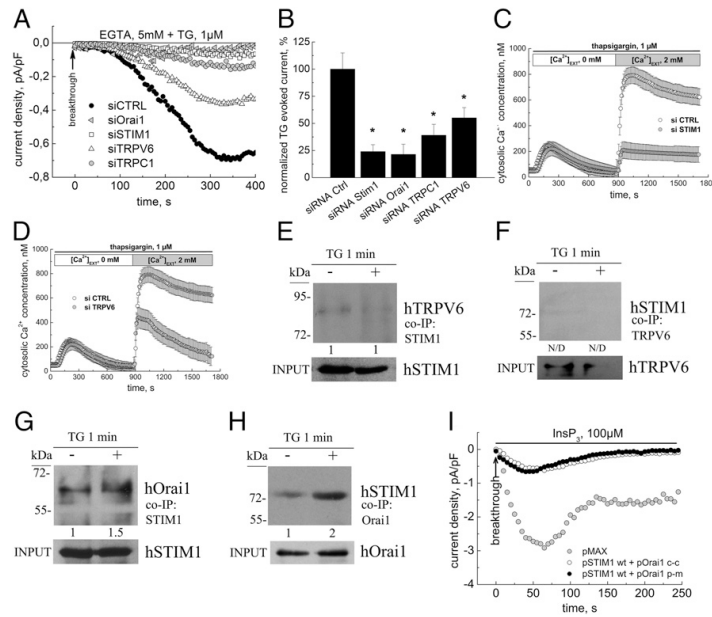
lymph node cancer of the prostate (LNCaP) cells, silencing of either Stim1 or Orai1, which is now considered as the hard core of SOCs, inhibited TG-evoked  $I_{SOCE}$  by 80% (Fig. 2 A and B;  $n = 15$  per condition). The same data were obtained using inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3)-evoked  $I_{SOCE}$  (Fig. S1 G and H). Down-regulation of TRPC1 and TRPV6 also decreased  $I_{SOCE}$  magnitude, suggesting a composition of endogenous SOC wider than Stim1/Orai1. Indeed, siRNA against TRPV6 decreased SOC magnitude by 50% ( $45 \pm 9.6\%$ ;  $n = 14$ ; Fig. 2 A and B). This result was confirmed by FURA-2  $Ca^{2+}$  imaging experiment where STIM1 was used as a positive control (Fig. 2C), showing that in cells down-expressing TRPV6, SOCE magnitude is two times lower than in control conditions (Fig. 2D). To know whether the TRPV6 channel is transactivated by STIM1, we studied its coimmunoprecipitation with STIM1 under store depletion using 1  $\mu$ M TG. STIM1 failed to precipitate the TRPV6 channel (Fig. 1E) and vice versa (Fig. 2F), whereas STIM1 did precipitate Orai1 and vice versa (as it did for TRPC1; Fig. S2 I and J), which has already been reported (22) and is used as a control in these studies (Fig. 2 G and H). Surprisingly, coimmunoprecipitation of the TRPV6 channel yielded TRPC1 bands (Fig. S2K). Moreover, although the TRPC1 channel was precipitated, we revealed TRPV6-specific bands (Fig. S2L), suggesting a possible interaction between TRPC1 and TRPV6 channels. Finally, to prove that the real cointeraction between STIM1 and Orai1 takes place, both chimeras of Orai1 such as hOrai1 (L273S) designed as Orai1c-c (coi-coil mutant preventing the functional coupling of STIM1 to Orai1 channel) and hOrai1 (E106Q) designed as Orai1p-m (pore mutant preventing Orai1 functioning as a channel) were used. Both chimeras cotransfected with STIM1wt-blocked SOCE in LNCaP cells (Fig. 2J). The control of complex cotransfection with both plasmids was monitored and is shown in Fig. S2P. Because we showed that STIM1 failed to cointeract with the TRPV6 channel, we investigated how the TRPV6 channel contributes to SOCE. The hypothesis consisted of its possible translocation to the plasma membrane. The treatment of LNCaP cells with TG revealed the gradual translocation of the TRPV6 channel to the plasma membrane (Fig. 3 A and B). These data were confirmed using confocal microscopy for both endogene (Fig. 3C) and overexpressed TRPV6 in LNCaP cells (Fig. 3D).

Further, we studied the possible role of other known SOC players such as STIM1, Orai1, and TRPC1 in TRPV6 translocation to the plasma membrane (Fig. 3 E and F). To determine whether TRPV6 translocation is triggered by store depletion itself or by SOCE, we performed the same experiment in a  $Ca^{2+}$ -free medium or in a medium where  $Ca^{2+}$  was replaced by the same amount of  $Ba^{2+}$  (1.7 mM). In both conditions, we observed a dramatic decrease of TRPV6 expression on the plasma membrane, suggesting that its stability at the cell surface is dependent on extracellular  $Ca^{2+}$  concentration (Fig. 3 E and F). Interestingly, all SOC players (STIM1, Orai1, and TRPC1) seemed to be crucial for TRPV6 translocation. To know whether the functional coupling of STIM1 to Orai1 or SOCE is necessary to induce this translocation, both (L273S and E106Q) Orai1 chimeras were used. We demonstrated that the functional coupling of STIM1 to Orai1 is a prerequisite for TRPV6 trafficking to the plasma membrane (Fig. 3 G and H). Thus, TRPV6 is translocated to the plasma membrane following ER store depletion, functional coupling of STIM1 to Orai1, and activation of the Orai1 channel.

Finally, to find a calcium-dependent protein involved in the above translocation, we investigated the expression of different Annexins and S100 proteins in our model and found that both Annexin I (ANX I) and its partner S100A11 are expressed in LNCaP cells (Fig. 3 I and J). The siRNA against ANX I successfully inhibited the TG-induced trafficking of TRPV6 to the plasma membrane (Fig. 3J). Another protein known to participate in channel trafficking (Rac1) was also used and had no effect on TRPV6 channel translocation (Fig. S2M). A patch-clamp experiment was also used to confirm the role of ANX I in



**Fig. 1.** The expression of TRPV6, Orai1, STIM1, and TRPC1 proteins in healthy, benign hyperplasia and adenocarcinomas of the prostate. The expression of TRPV6, Orai1, STIM1, and TRPC1 proteins revealed by immunohistochemistry in the normal prostate, the benign hyperplasia of the prostate (BHP) and in the adenocarcinomas with a Gleason score of 7 (ADC 7). All of the antigens were studied on the same tumor from the same patient. (Magnification: 200 $\times$ .)



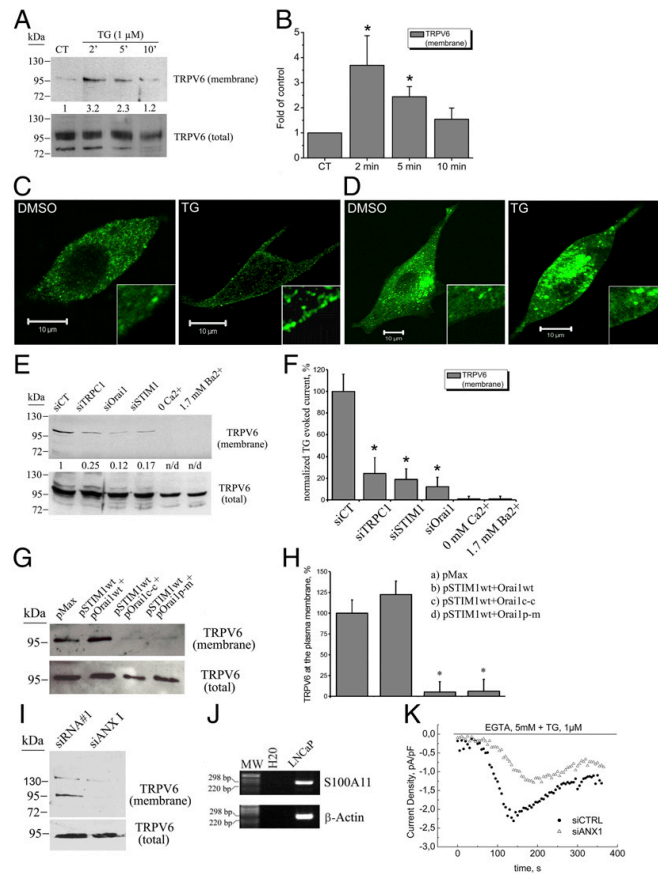
**Fig. 2.** TRPV6 takes part in calcium entry mediated by endoplasmic reticulum store depletion. (A) Time courses of  $I_{SOC}$  development in response to dialysis using EGTA 5 mM and thapsigargin (TG) 1  $\mu$ M in control LNCaP cells (black circles) and in LNCaP pretreated with siRNA against either Orai1 (white triangles), STIM1 (white squares), TRPC1 (gray circles), or TRPV6 (white triangles). (B) Histograms summarizing EGTA/TG activated  $I_{SOC}$  normalized density in control LNCaP cells pretreated with siRNA against either Orai1, STIM1, TRPC1, or TRPV6. (C) ER  $Ca^{2+}$  store depletion and capacitative calcium entry in LNCaP cells pretreated with siRNA against STIM1. (D) ER  $Ca^{2+}$  store depletion and capacitative calcium entry in LNCaP cells pretreated with siRNA against TRPV6 channel. (E) Coimmunoprecipitation of TRPV6 using anti-STIM1 antibody. (F) Coimmunoprecipitation of Orai1 using anti-STIM1 antibody. (G) Coimmunoprecipitation of STIM1 using anti-Orai1 antibody. (H) Coimmunoprecipitation of STIM1 using anti-Orai1 antibody. (I) Time courses of  $I_{SOC}$  in response to dialysis of 100  $\mu$ M  $InsP_3$  in LNCaP cells transfected with pMAX plasmids (gray circles), pSTIM1wt et pOrai1c-c mutant (open circles), and pSTIM1wt et pOrai1p-m mutant (black circles).

this ER depletion-induced trafficking of TRPV6, because ANX I pretreatment inhibited SOCE (Fig. 3K). The same data were obtained using  $InsP_3$ -evoked  $I_{SOC}$  (Fig. S2 N and O). Thus, we can conclude that TRPV6 is regulated by  $Ca^{2+}$ /Annexin I/S100A11 signaling via a STIM1 direct activation-independent mechanism that may potentially be involved in acquiring the aggressive phenotype.

**TRPV6 Overexpression Induces the Transformation of Pca Cells, Leading to an Aggressive Prosurvival Phenotype.** We investigated why the expression of the TRPV6 channel is increased in PCA. Because it is extremely difficult to estimate the real quantity of the TRPV6 channel in vivo in each particular stage of PCA, we created stable clones of the TRPV6 channel overexpressed in the androgen-dependent LNCaP cell line, hormone-refractory cell lines PC3 and DU145, and the noncancerous human HEK293 and nonhuman CHO cell line (Fig. S3 A–J). In the LNCaP cell line, the overexpression of the TRPV6 channel led to the increased resistance to apoptosis induced either by 1  $\mu$ M TG or 20  $\mu$ M cisplatin (Fig. 4A). Hormone-refractory PC3-TRPV6 cells were more resistant to cisplatin treatment, whereas DU145-TRPV6 cells were more resistant to TG treatment (Fig. 4B and C). Conversely, in noncancerous HEK293 and CHO cell lines, the increased expression of the TRPV6 channel potentiated apoptosis induced by TG, cisplatin, or both (Fig. 4D and E). The knockdown of the TRPV6 channel in LNCaP cells increased the apoptosis rate provoked by both TG and cisplatin, shown using the DNA ladder method (Fig. 4F). Because we showed that ANX I is a protein involved in TRPV6 translocation to the plasma membrane, we used a selective knockdown of ANX I to

demonstrate the same apoptosis-potentiated effects in LNCaP cells (Fig. 4G). Further, using our stably overexpressing LNCaP clones, we verified that the observed effects were due to the TRPV6 channel and its translocation partner ANX I using specific siRNAs (Fig. 4G and H). We found that, in LNCaP cells expressing the TRPV6 channel at the basal level, the selective knockdown of TRPV6 and ANX I potentiated the apoptosis induced by both TG and cisplatin in the case of ANX I (Fig. 4G). However, in the case of TRPV6 overexpression, the death rate was already significant during 36 h of TG treatment, and we could not see any changes or they were even reversed in the case of 20  $\mu$ M cisplatin (Fig. 4H). To correlate the observed effects with the level of TRPV6 expression on the plasma membrane, we studied the kinetics of TRPV6 translocation in both LNCaP clones (Fig. 4I). Fig. 4I shows that the basal level of TRPV6 expression is higher in LNCaP-pIRES-TRPV6 clones than in LNCaP-pIRES, and TG was not able to further increase the expression of the TRPV6 channel on the plasma membrane in TRPV6-overexpressing cells. We also studied the role of TRPV6 and its SOCE partners in the apoptosis induced by TG treatment in native LNCaP cells (Fig. S4A). Only the Orai1 channel seemed to be involved in TG-induced apoptosis in LNCaP cells, unlike TRPC1 and TRPV6 proteins, which were involved in apoptosis resistance.

Finally, we demonstrated that TRPV6 overexpression in LNCaP cells induces strong calcium entry, which confirms that TRPV6 is functional in these cells (Fig. S3 K and L). This functionality of the TRPV6 channel is responsible for the enhanced capacitative calcium entry in LNCaP cells transiently expressing the TRPV6 channel (Fig. S4B) and in LNCaP cells stably expressing it (Fig. S4C). Moreover, increasing  $[Ca^{2+}]_0$  in the bathing



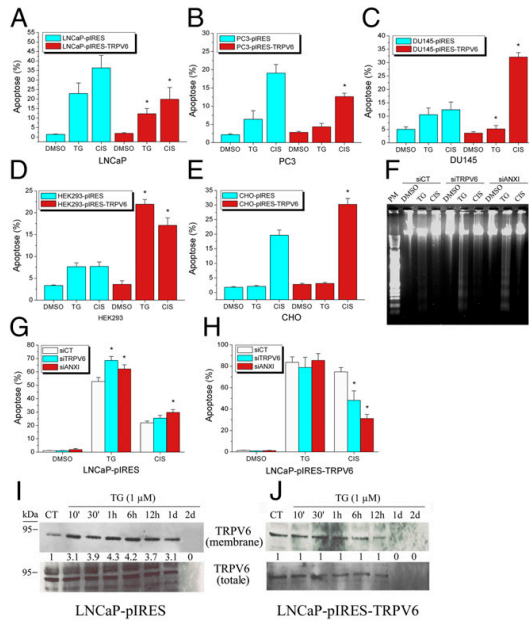
**Fig. 3.** TRPV6 channel is translocated to the plasma membrane following store depletion. (A) Translocation of TRPV6 channel to the plasma membrane following ER store depletion using 1  $\mu$ M TG. (B) Histogram summarizing the variation of TRPV6 expression on the plasma membrane. (C) Immunofluorescence experiment representing TRPV6 expression (green) on the plasma membrane in LNCaP cells on 1  $\mu$ M TG treatment for 2 min. (D) Immunofluorescence experiment representing TRPV6 expression (green) on the plasma membrane in LNCaP cells transfected with TRPV6-YFP plasmid and treated with 1  $\mu$ M TG for 2 min. (E) Western blot experiment for TRPV6 expression in LNCaP membranes (membrane) and in total LNCaP lysate (total) treated with siRNA against TRPC1 (siTRPC1), Orai1 (siOrai1), or Stim1 (siStim1), as well as in a  $\text{Ca}^{2+}$ -free medium (0  $\text{Ca}^{2+}$ ) or in a medium where  $\text{Ca}^{2+}$  had been replaced by the same amount of barium (1.7 mM  $\text{Ba}^{2+}$ ). (F) Histogram summarizing the variation of TRPV6 expression in plasma membrane. (G) TRPV6 protein expression in LNCaP membranes and in total LNCaP total lysates under the following conditions: empty vector (pMax), Stim1wt/Orai1wt, plasmid coding for Orai1c-c, and plasmid coding for Orai1p-m. (H) Histogram summarizing the variation of TRPV6 expression in plasma membrane measured in G. (I) Western blot experiment showing the TG-stimulated translocation of TRPV6 to the plasma membrane in control conditions (siRNA#1) and after pretreatment with siRNA against ANX I (siANX I). (J) Semiquantitative PCR experiment showing the expression of S100A11 in LNCaP cells. (K) Time course of InsP3 (100  $\mu$ M) evoked current in LNCaP under control conditions (siCTRL, black circles) and after treatment with siRNA against ANX I (siANX I, gray triangles) using patch clamp recording.

solution from 0 to 2 mM produced a significant elevation in the basal  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in TRPV6-overexpressing LNCaP cells. 2-aminoethoxydiphenylborane (2-APB) (100  $\mu$ M), a known inhibitor of the TRPV6 channel (23), was used to block its constitutive activity (Fig. S4D). It is noteworthy that the overexpression of the TRPV6 channel in LNCaP cells resulted in higher resting  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  levels than those in control LNCaP cells (Fig. S4 B and C).

We also studied the role of TRPV6 on cell survival and proliferation (Fig. 5). In all of the stable clones studied, the overexpression of TRPV6 led to an increase in cell survival in cancerous (LNCaP, PC3, and DU145) and noncancerous (HEK293 and TRPV6) overexpressing cell lines. Both cell survival 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay (Fig. 5 A, C, E, and G) and cell counting

(Fig. 5 B, D, F, and H) were used. At the same time, in the control experiment, we studied the role of TRPV6 SOCE partners in proliferation (Fig. S4E). All except TRPC1 diminished cell proliferation, which was revealed by the MTS assay. Thus, the increased expression of TRPV6 on the plasma membrane contributes to cell survival by increasing apoptosis resistance and proliferation of prostate cancer cells.

**TRPV6 Channel Potentiates Tumorigenesis in Vivo.** The final step in our investigations was to see whether the presence and/or overexpression of the TRPV6 channel may potentiate tumorigenesis in vivo. An in vivo tumor xenograft model using immunodeficient Swiss nude mice was used. The stable clones of PC3 and DU145 cells known to easily form tumors in these mice were injected under the skin and monitored for 2–8 wk. The example of PC3-pIRES

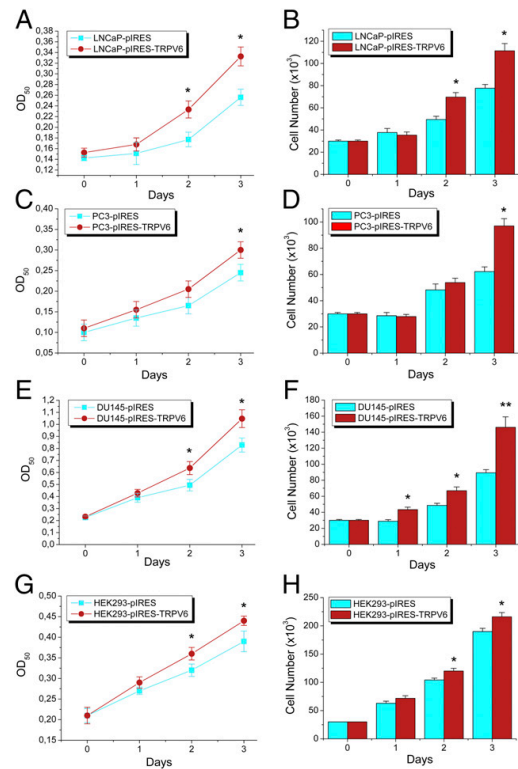


**Fig. 4.** TRPV6 is involved in apoptosis resistance of prostate cancer cells. (A) Apoptosis rate in control LNCaP clones (LNCaP-pIRES) and LNCaP cells stably expressing TRPV6 channel (LNCaP-pIRES-TRPV6). Cells were treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h, and the number of apoptotic cells was calculated using Hoechst staining. (B) Apoptosis rate in control PC3 clones (PC3-pIRES) and PC3 cells stably expressing TRPV6 channel (PC3-pIRES-TRPV6). Cells were treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h, and the number of apoptotic cells was calculated using Hoechst staining. (C) Apoptosis rate in control DU145 clones (DU145-pIRES) and DU145 cells stably expressing TRPV6 channel (DU145-pIRES-TRPV6). Cells were treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h, and the number of apoptotic cells was calculated using Hoechst staining. (D) Apoptosis rate in control HEK293 clones (HEK293-pIRES) and HEK293 cells stably expressing TRPV6 channel (HEK293-pIRES-TRPV6). Cells were treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h, and the number of apoptotic cells was calculated using Hoechst staining. (E) Apoptosis rate in control CHO clones (CHO-pIRES) and CHO cells stably expressing TRPV6 channel (CHO-pIRES-TRPV6). Cells were treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h, and the number of apoptotic cells was calculated using Hoechst staining. (F) DNA ladder experiment in LNCaP cells treated with 50 nM of siRNAs for 48 h. (G) Apoptosis rate in control LNCaP clones (LNCaP-pIRES) pretreated with 50 nM of siRNAs for 12 h and treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h. (H) Apoptosis rate in LNCaP cells stably expressing TRPV6 channel (LNCaP-pIRES-TRPV6) pretreated with 50 nM of siRNAs for 12 h and treated with DMSO, 1  $\mu$ M TG, or 20  $\mu$ M Cisplatin (CIS) for 36 h. (I) TRPV6 translocation to the plasma membrane on 1  $\mu$ M TG stimulation in LNCaP-pIRES clones and (J) in LNCaP cells stably expressing TRPV6 channel, LNCaP-pIRES-TRPV6.

and PC3-pIRES-TRPV6 mice bearing respective tumors is demonstrated in Fig. 6A. After each experiment, the tumors were excised, photographed, and weighted, and the volume was measured for both PC3 and DU145 stable clones of TRPV6 (Fig. 6B–E). In our siRNA series of experiments, the mice were treated either with siCT against luciferase mRNA, as control, or siTRPV6 as soon as the tumors appeared and entered in the exponential growth phase. An example of dissected tumors from animals treated with either siCT or siTRPV6 is shown in Fig. 6F. Tumor mass (Fig. 6G) and tumor volume (Fig. 6H) were measured and a quantitative PCR control of TRPV6 knockdown was performed (Fig. 6I). The decrease in tumor mass, tumor volume, and TRPV6 content was significant. To see

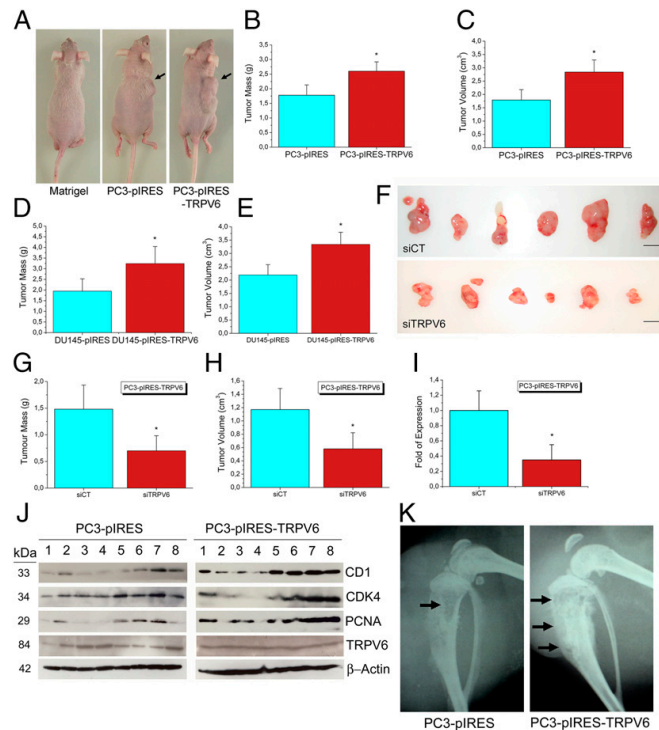
how TRPV6 overexpression influences PCa cell proliferation potential and tumor growth, protein lysates were extracted from the tumors excised in our *in vivo* studies and cell cycle markers as cyclin D1, CDK4, and PCNA were detected in tumors induced either by control or TRPV6-overexpressing PC3 cells (Fig. 6J). It seems to be evident that the overexpression of TRPV6 channel renders the prostate cancer cells more aggressive and subject to aberrant proliferation and tumor growth. Finally, we established double stable clones of PC3 cells expressing TRPV6 and firefly luciferase to perform imaging *in vivo*. PC3 clones were directly inoculated into the bone marrow cavity of tibias from immunodeficient mice. PC3-pIRES-TRPV6 clones generated numerous osteoblastic lesions compared with control PC3-pIRES cells, which generated an osteolytic lesion (Fig. 6K).

The tumors formed *in vivo* were analyzed by immunohistochemistry. The conventional hematoxylin-eosin-safran staining (HES) was performed, showing undifferentiated tumors (Fig. 7A). The expression of the TRPV6 channel and its overexpression in the case of PC3-pIRES-TRPV6 stable clones were also monitored at different magnifications of 100 $\times$ , 200 $\times$ , and 400 $\times$ . The same



**Fig. 5.** TRPV6 contributes to cancer cell survival. (A) Cell survival assay (MTS) in control LNCaP clones (LNCaP-pIRES) and LNCaP cells stably expressing TRPV6 channel (LNCaP-pIRES-TRPV6). (B) Cell counting for the same LNCaP clones. (C) Cell survival assay (MTS) in control PC3 clones (PC3-pIRES) and PC3 cells stably expressing TRPV6 channel (PC3-pIRES-TRPV6). (D) Cell counting for the same LNCaP clones. (E) Cell survival assay (MTS) in control DU145 clones (DU145-pIRES) and DU145 cells stably expressing TRPV6 channel (DU145-pIRES-TRPV6). (F) Cell counting for the same DU145 clones. (G) Cell survival assay (MTS) in control HEK293 clones (HEK293-pIRES) and HEK293 cells stably expressing TRPV6 channel (HEK293-pIRES-TRPV6). (H) Cell counting for the same HEK293 clones.





**Fig. 6.** Overexpression of TRPV6 channel potentiates tumorigenesis in vivo. (A) Example of three Swiss nude mice used in the xenograft experiment in vivo representing the control Matrigel-injected group, PC3-pIRES injected group, and PC3-pIRES-TRPV6 injected group. (B) Mean tumor mass of PC3-pIRES- and PC3-pIRES-TRPV6-generated tumors,  $n = 12$ . (C) Mean tumor volume of PC3-pIRES- and PC3-pIRES-TRPV6-generated tumors,  $n = 12$ . (D) Mean tumor mass of DU145-pIRES- and DU145-pIRES-TRPV6-generated tumors,  $n = 6$ . (E) Mean tumor volume of DU145-pIRES- and DU145-pIRES-TRPV6-generated tumors,  $n = 6$ . (F) Tumors obtained from nude mice bearing PC3-pIRES-TRPV6 tumors treated with either siCT or siTRPV6. (\* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ ). (Scale bar, 1 cm.) (G) Mean tumor mass of PC3-pIRES-TRPV6-generated tumors treated either with siCT or siTRPV6, \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ . (Scale bar, 1 cm.) (H) Mean tumor volume of PC3-pIRES-TRPV6-generated tumors treated either with siCT or siTRPV6, \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ . (I) The expression of TRPV6 transcripts in tumors of mice treated either with siCT or siTRPV6 normalized to HPRT, \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ . (J) Protein expression of certain cell cycle regulators (cyclin D1, CDK4, and PCNA) in eight random tumors induced either by control or TRPV6-overexpressing PC3 cells. (K) Bone metastasis induced by PC3-pIRES or PC3-pIRES-TRPV6 cells. Arrows indicate osteolytic lesions for PC3-pIRES and osteoblastic lesions for PC3-pIRES-TRPV6.

tumors were subjected to immunostaining using different antibodies such as against Ki-67, a proliferation marker; caspase-3-cleaved fragment, an apoptosis marker; PSA, a PCa diagnostic marker; synaptophysin, a marker of neuroendocrine tumors (as well as chromogranin A and CD56; Fig. S4D); and CD31, a marker of endothelial cells and vascularization (Fig. 7B). The images were taken both on the border of the tumors and in their centers. Ki-67 staining was much more abundant in the case of TRPV6 overexpression as were such markers as PSA, synaptophysin (CD56 as well, but not chromogranin A, which was negative in both cases), and CD31 (Fig. S5). The staining with anti-human CD31 antibody was negative in mouse endothelial cells, but we found CD31 expression in some of the TRPV6-overexpressing tumors cells. Intriguing, the caspase-3-cleaved fragment was also increased in the case of PC3-pIRES-TRPV6-derived tumors. The other observation was that the PC3-pIRES-TRPV6 tumors had less defined and less solid borders than the PC3-pIRES-derived tumors. All of the tumors were stained with the keratin A1/A3 antibody to prove epithelial origin (Fig. S4D).

Thus, TRPV6 potentiates tumorigenesis in vivo by increasing tumor growth via enhanced PCa cell proliferation.

## Discussion

The current studies highlight several major findings, such as (i) the transactivation of Orai1 channel by STIM1 induces  $Ca^{2+}$  entry into the cell, triggering the activation of the Annexin I/S100A11 complex targeting the TRPV6 calcium channel to the plasma membrane; (ii) the expression of TRPV6 protein in prostate cancer cells in vivo renders the cancer cells more viable and resistant to the environment; and (iii) TRPV6 potentiates tumorigenesis in vivo.

The TRPV6 channel appearing in some cancers including PCa emerged in the beginning of the 2000s. The expression of the TRPV6 channel was mostly studied by two teams: the team of Hediger and colleagues (24) and Flockerzi and colleagues (6). Both of them used Northern blot as a technique of TRPV6 detection in tumors. Although the first team detected TRPV6 (previously called CAT1) in BHP (7), the second one claimed that TRPV6 was not detectable in small-sized and confined prostate tumors (grade T1), whereas TRPV6 transcripts were detected in 20% of tumors graded pT2a and pT2b, 79% of pT3a, and in >90% of pT3b tumors (8). Thus, TRPV6 transcripts are not detectable in the normal prostate, in benign, or in high-grade prostate intraepithelial neoplasia (25). We showed that TRPV6 expression may also occur in BHP at a relatively weak level, and



appears to function as inducers of cellular proliferation (41). This evidence supports the hypothesis that NFAT transcription factors control the expression of cell cycle-related genes and are central regulators of cell cycle progression.

The involvement of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanisms in the induction and regulation of apoptosis is now well established. A number of studies have shown that a large, sustained influx of  $\text{Ca}^{2+}$  triggering apoptosis in cancer cells is provided by SOCE, mediated by SOC<sub>s</sub> (13, 14).  $\text{Ca}^{2+}$  entry via SOC<sub>s</sub> induces a sustained increase in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, thus helping to replenish the ER. Moreover, we previously showed that apoptosis inhibition in androgen-independent PCa cells was associated with the down-regulation of SOC<sub>s</sub>, due to a decrease in the number of functional channels (13, 20). We previously found that the susceptibility of the cells to the induction of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis was always in direct correlation with Orai1 expression and  $I_{\text{SOC}}$  density: the lower the expression and current density, the lower the rate of apoptosis and higher the rate of apoptosis resistance (20). Consistent with this, hormone-refractory apoptosis-resistant phenotypes of hormone-refractory cancer cells are characterized by markedly reduced levels of store-operated calcium entry (13, 16), which prevents  $\text{Ca}^{2+}$  overload in response to proapoptotic stimuli, thereby reducing the effectiveness of mitochondrial and cytoplasmic apoptotic pathways. However, the TRPV6 channel is not a SOC, although Orai1 or TRPC1 or any other SOC is needed for its translocation to the plasma membrane. Calcium entering through the TRPV6 channel rapidly inactivates it via a negative feedback loop (42, 43) that creates  $\text{Ca}^{2+}$  transients engaged in cancer cell survival (9, 44). Another member of the vanilloid family (TRPV2) has also been suggested to contribute to apoptosis resistance of androgen-independent prostate cancer cell lines, likely by augmenting  $\text{Ca}^{2+}$  influx via SOCE-independent mechanisms into these cells (45).

One of the main characteristics of cancer cells is to evade apoptosis. We used two apoptosis inducers, TG, which inhibits the sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) pump of the ER and triggers two  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proapoptotic mechanisms (ER  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion and SOC-mediated  $\text{Ca}^{2+}$  entry) (46), and cisplatin, an alkylating agent that reacts in vivo by binding to and causing cross-linking of DNA, which ultimately triggers apoptosis (47). Apart from DNA damage, the inhibition by cisplatin of the proteasome induces ER stress and also activates the unfolded protein response launching apoptotic program (48). Cisplatin has also been shown to stimulate ER stress and to increase ER dilation, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels, and cell death (49). This eventually links cisplatin with ER stress and increased intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels that may be successfully inhibited by Orai1 knockdown, as published before, with the consecutive down-regulation of  $I_{\text{SOC}}$  and apoptosis in general (20). Our data show that overexpression of the TRPV6 channel is crucial to withstand proapoptotic stimuli in the androgen-dependent LNCaP cell line, whereas the PC3-pIRES-TRPV6 stable clone was more resistant to cisplatin treatment compared with DU145-pIRES-TRPV6, which was more resistant to TG treatment. These differences may be explained by the intrinsic nature and peculiarities of these two hormone-refractory cell lines.

As to the possible mechanisms of TRPV6 conferring apoptosis resistance, NF- $\kappa$ B plays an important role in tumorigenesis by affecting processes such as tumor initiation, promotion, growth, and metastasis (50). NF- $\kappa$ B induces the expression of genes that are known to confer resistance to apoptosis and is indirectly regulated by calcium homeostasis (51). The oscillation of calcium is known to play a key role in the oscillatory regulations of NF- $\kappa$ B, p53, and Wnt signaling (52). A tissue-type transglutaminase (TG2), the most diverse and ubiquitous member of the calcium-dependent transglutaminase family of enzymes, which can activate NF- $\kappa$ B, is also aberrantly overexpressed in many human cancer types, blocks apoptosis, and promotes drug resistance and metastatic phenotypes (53).

Finally, we verified our hypothesis on the role of TRPV6 channel as a proto-oncogene in PCa cells in a series of experiments using the tumor xenograft model in vivo. In the hormone-refractory model of PCa, the overexpression of the TRPV6 channel enhanced the oncogenic potential of these PCa cells. The histological analysis of these undifferentiated tumors showed the increased expression of Ki-67, a marker of proliferating cells; synaptophysin and CD56, markers of neuroendocrine cells; and CD31, a marker of tumor vascularization, in PC3 cells overexpressing TRPV6. All these histological data suggest the tumors overexpressing TRPV6 are rapidly growing and more aggressive tumors than the control PC3-pIRES tumors. The increased expression of PSA confirms the role of the marker in the diagnosis of PCa. However, the concomitant increase in caspase-3-cleaved fragment staining is probably due to the apoptosis of adjacent cells because not all of them overexpress the TRPV6 channel. Finally, TRPV6-overexpressing PC3 cells promote bone metastasis via numerous osteoblastic lesions characteristic to PCa compared with control PC3-pIRES cells.

In conclusion, our data suggest the TRPV6 channel as a tumor promoter in the prostate; being expressed de novo, it significantly contributes to PCa cell survival through proliferation and apoptosis resistance, promotes the formation of bone metastasis, and potentiates tumorigenesis in vivo.

#### Materials and Methods

**Cell Culture.** Human LNCaP, PC3, DU145, HEK293, and CHO-K1 cell lines were from American Type Culture Collection (ATCC) and were cultured in RPMI (LNCaP, PC3, and DU145), DMEM (HEK293), or F12 (CHO) media (Gibco-BRL) supplemented with 10% FCS and containing kanamycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and L-glutamine (2 mM) where necessary. All of the cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% (vol/vol)  $\text{CO}_2$  in air. The medium was changed three times a week, and cultures were split by treating the cells with 0.25% trypsin (in PBS) for 5 min at 37 °C before reaching confluence. For the experiments, cells were seeded in six-well plates for PCR and Western blotting and in 35-mm dishes for calcium and confocal (with glass coverslips) imaging and patch-clamp recordings. For the stable clones generated with pIRES plasmid, the antibiotic of selection G418 was used at the concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{L}$  for the primary selection and 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  for the maintenance in culture. The stable clones of PC3-pIRES/PC3-pIRES-TRPV6 were stably transfected with pQCXIB CMV/TO LUC and selected using blasticidine at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Electrophysiology and Solutions.** Macroscopic currents were recorded from LNCaP cells in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using a computer controlled EPC-9 amplifier (HEKA Electronic), as previously described (54). The composition of the extracellular solution for patch-clamp recording was (in mM) 120 NaCl, 5 KCl, 10  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{MgCl}_2$ , 5 glucose, and 10 Hepes, pH 7.4 adjusted with tetraethylammonium hydroxide, and osmolarity 310 mOsm/kg adjusted with D-mannitol. The patch pipettes were filled with the basic intracellular pipette solution (in mM): 120 Cs-methane sulfonate, 10 CsCl, 10 Hepes, 10 BAPTA, and 6  $\text{MgCl}_2$  (pH adjusted to 7.4 with CsOH and osmolarity was 295 mOsm/kg adjusted with D-mannitol). The necessary supplements in the desired concentrations were added to the experimental solutions directly from appropriate stock solutions and dissolved in water, ethanol, or dimethyl sulfoxide. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich. In the course of patch-clamp recording, drugs and solutions were applied to the cells via multi-line microperfusion system with common outflow (Cell MicroControls) placed in close proximity ( $\sim 200 \mu\text{m}$ ) to the studied cell. Experiments were carried out at room temperature.

**SDS/PAGE and Western Blotting.** Semiconfluent LNCaP cells were treated with an ice-cold lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM PMSF, 1% Nonidet P-40, and a protease inhibitor mixture from Sigma. The lysates were centrifuged at 15,000  $\times g$  at 4 °C for 20 min, mixed with a sample buffer containing 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue, and boiled for 5 min at 95 °C. Total protein samples were subjected to 8%, 10%, and 15% SDS/PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semidry Western blotting (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked in 5% milk containing TNT buffer (Tris-HCl, pH 7.5, 140 mM NaCl, and 0.05% Tween 20) overnight and then probed using specific rabbit polyclonal anti-TRPV6, anti-TRPC1 (Alomone Labs; 1/200), anti-STIM1 (BD Biosciences

Thermingen; 1/200), anti-TRPC1 (Novus Biologicals; 1/200) anti-Orai1 (Proscience; 1/200), and mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Lab Vision Co.; 1/1,000) antibodies. In the case of the TRPV6 antibody, the different batches were tested using the lysates of HEK cells transfected with TRPV6-YFP fusion protein (Fig. S14). Only that batch that matched the band corresponding to the TRPV6-YFP fusion protein codetected with anti-GFP antibody (Abcam; 1/1,000) was used in the study (AN-04). The bands on the membrane were visualized using the enhanced chemiluminescence method (Pierce Biotechnologies). Densitometric analysis was performed using a Bio-Rad image acquisition system (Bio-Rad Laboratories).

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

**RT-PCR.** RT-PCR experiments were performed as previously described (36). DNA amplification conditions included the initial denaturation step of 7 min at 95 °C and 36 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C, and finally 7 min at 72 °C. Primers used are listed in Table S1.

**Quantitative Real-Time PCR.** Quantitative real-time PCR of TRPV6 and hypoxanthine-phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA transcripts was done using MESA GREEN qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) on the Biorad CFX96 Real-Time PCR Detection System. The sequences of primers are indicated in Table S1. The HPRT gene was used as an endogenous control to normalize variations in the RNA extractions, the degree of RNA degradation, and the variability in retrotranscription efficiency. To quantify the results, the comparative threshold cycle method  $\Delta\Delta C_t$  and CFX Manager Software v2.0 were used.

**siRNA Transfection.** LNCaP cells were transfected with 50 nM of small interfering RNA (siRNA) against all the mRNA sequences studied and siRNA against firefly luciferase as a control (Dharmacon and Eurogentec) using 6  $\mu$ L Hyperfect transfection reagent (Qiagen) following the manufacturer's instructions (see Table S1 for the siRNA sequences). The efficiency of cell transfections with the siRNAs for each particular target was validated using either real-time quantitative PCR or Western blotting.

**Nucleofection.** Transfection of LNCaP with different plasmids was carried out using Nucleofector (Amaxa) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 2  $\mu$ g of the plasmid was transfected into two million trypsinized cells, which then were plated onto six-well dishes, 35-mm dishes, or glass coverslips for 48 h.

**Cell Survival Assays.** Cells were harvested and plated at an initial density of 3,000 cells per well in 96-well plates (Poly-Labo). Cell were transfected, and the number of viable cells was determined every 24 h using the CellTiter 96 Aqueous non-radioactive cell proliferation assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) compound (Promega). Cell count was also used to determine the quantity of cells after transfection with siRNA using a Malassez counting chamber. Cells were trypsinized from six-well plates, and cells from each well were counted eight times.

**Immunocytochemistry.** LNCaP cells grown on the glass coverslips were treated with 1  $\mu$ M TG for 2 min and immediately fixed in 4% paraformaldehyde in PBS. PBS-glycine (30 mM) was used to quench the reaction, with a subsequent permeabilization with 0.1% Triton X-100. The cells were washed again in PBS and subjected to a conventional immunostaining procedure. Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes; 1/4,000) was used as a secondary antibody for TRPV6 staining. Fluorescence analysis was carried out using the Carl Zeiss Laser Scanning Systems LSM 510 connected to a Zeiss Axiovert 200 M with a 63  $\times$  1.4 numerical aperture oil immersion lens at room temperature. Both channels were excited, collected separately, and then merged using the Carl Zeiss LSM Image Examiner software.

**Immunohistochemistry.** Paraffinized human prostate anonymous tissue sections from 15 prostatectomies were obtained from the Department of Cell Pathology,

Hôpital St Vincent de Lille. Paraffin-embedded prostate sections were subjected to conventional deparaffinization followed by antigen retrieval using citrate buffer at 95 °C in a water bath. After saturation in a solution containing 1% BSA and 0.05% Triton X100 in PBS-gelatin, the prostate sections were incubated with the specific antibodies, such as rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody (Alomone Labs; 1/200), overnight at 4 °C. Goat polyclonal anti-rabbit and anti-mouse peroxidase-conjugated secondary antibodies (Chemicon International; 1/200) were used. After revelation with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich), images were analyzed using a Zeiss Axioskope microscope (Carl Zeiss) and Leica Image Manager software (Leica Geosystems). Details on antibodies, dilutions, and staining characteristics carried out in the Department of Cell Pathology are given in Table S2. Immunohistochemistry was performed automatically using a Benchmark XT automated slides stainer (Ventana Medical Systems) following established protocols, and detection was performed using an IVEW-DAB detection system (N760-500; Ventana Medical Systems).

**Animals, siRNA Injection, and Tumorigenicity Assays.** Studies involving animals, including housing and care, method of euthanasia, and experimental protocols, were conducted in accordance with the animal ethical committee in the animal house (C59-00913) of the University of Sciences and Technologies of Lille, under the supervision of V.L. (59-009270). Tumor cells ( $2 \times 10^6$  cells per mouse) were injected s.c. in 50% (vol:vol) matrigel (BD Biosciences) into 6- to 8-wk-old male Swiss nude mice (Charles Rivers). In the siRNAs studies, once the tumors were exponentially growing, mice were randomized for treatment (at least 10 animals per group) and received daily i.p. siCTL or siTRPV6, 120  $\mu$ g/kg diluted in PBS. Mice were killed after 17 d of treatment; tumors were dissected, photographed, and weighed; and volume was measured.

**Bone Metastasis in Vivo.** Bone metastasis experiments were carried out as previously described (55). TRPV6-overexpressing Pca cells were first cotransfected to stably express luciferase. Luciferase-expressing transfectants were then directly inoculated into the bone marrow cavity of tibias from immunodeficient mice. Radiographs were taken at scheduled intervals using a cabinet X-ray system (Faxitron X-ray). Tumor-bearing mice analyzed by radiography were also examined by noninvasive, whole-body bioluminescence imaging (Berthold) 15 min after the i.p. injection of luciferine. The osteolytic area (or osteoblastic lesions) and the extent of tumor burden (as judged by bioluminescence photon emission) were measured using computerized image analysis systems.

**Plasmids.** pcCFP-C1-hSTIM1 WT, designed as STIM1wt; pcYFP-C1-hOrai1 WT, designed as Orai1wt; pcYFP-C1-hOrai1(L273S) designed as Orai1c-c; and pcYFP-C1-hOrai1(E106Q) designed as Orai1p-m were generated as previously described (56). Human TRPV6 (accession no. NM\_018646) was cloned into pGEM-T-Easy vector (Promega), using the human kidney total mRNA library (Clontech). The cloned TRPV6 was sequenced (Genoscreen), and EcoRI sites were used to subclone TRPV6 into multiple cloning site 1 of the pRES vector (Clontech). The specific primers containing the F1-EcoRI recognition site and the backward primer containing the mutated stop codon [TGA $\rightarrow$ TTA(Leu)] and the Sall recognition site were designed.

The whole TRPV6 molecule containing EcoRI and Sall ends was amplified, digested with the corresponding restrictases (NEB), and subcloned in frame into the pEYFP-N1 vector (BD Biosciences Clontech), resulting in a TRPV6-eYFP fusion protein. The final pTRPV6-eYFP vector was sequenced (Genoscreen) and nucleofected into both LNCaP and HEK-293 cells, and the functionality of the TRPV6-eYFP fusion protein was tested using patch-clamp experiments. This fusion protein was also used to screen for different batches of the anti-TRPV6 antibody.

**Reagents.** All reagents were purchased from Sigma unless otherwise specified.

**Data Analysis.** For each type of experiment, the data were accumulated from at least three measurements. Electrophysiological data were analyzed offline using HEKA (HEKA Electronic) and Origin 7.0 (Microcal Software) software. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM where appropriate. *N* equals the number of series of experiments, and *n* equals the number of cell used in the study. ANOVA was used for statistical comparison of the differences, and *P* < 0.05 was considered significant.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Charlotte Dubois for helpful advice during revision and manuscript preparation. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and Ligue Nationale Contre le Cancer.

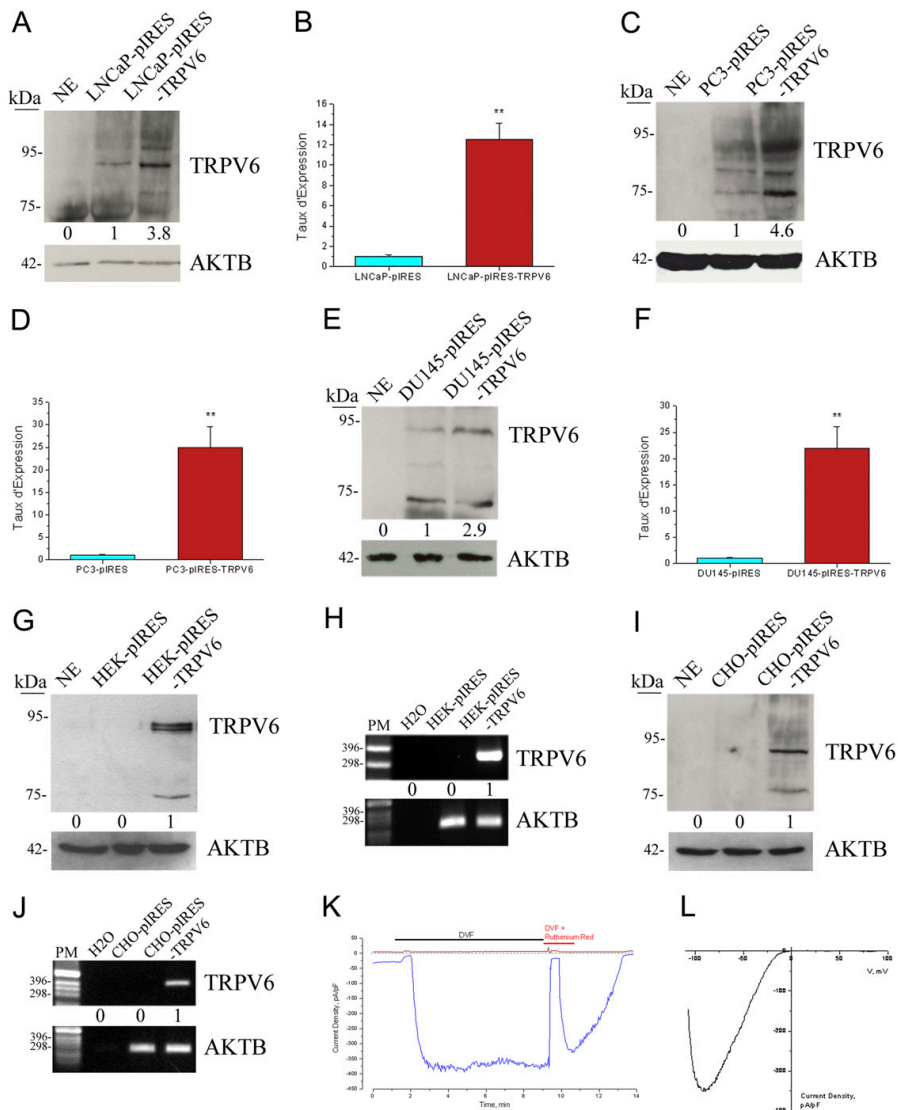
1. Cooperberg MR, Moul JW, Carroll PR (2005) The changing face of prostate cancer. *J Clin Oncol* 23(32):8146–8151.
2. Schröder FH (2010) Prostate cancer around the world. An overview. *Urol Oncol* 28(6):663–667.
3. Fixemer T, Remberger K, Bonkhoff H (2002) Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *Prostate* 53(2):118–123.
4. Raffo AJ, et al. (1995) Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo. *Cancer Res* 55(19):4438–4445.
5. Clapham DE, Runnels LW, Strübing C (2001) The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2(6):387–396.
6. Wissenbach U, et al. (2001) Expression of CaT-like, a novel calcium-selective channel, correlates with the malignancy of prostate cancer. *J Biol Chem* 276(22):19461–19468.
7. Peng JB, et al. (2001) CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 282(3):729–734.
8. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H (2003) Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: A novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22(49):7858–7861.
9. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2010) Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16(3):107–121.
10. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: New roles for known actors. *Nat Rev Cancer* 11(8):609–618.
11. Legrand G, et al. (2001) Ca<sup>2+</sup> pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca<sup>2+</sup>-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control. *J Biol Chem* 276(50):47608–47614.
12. Thebaut S, et al. (2006) Differential role of transient receptor potential channels in Ca<sup>2+</sup> entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 66(4):2038–2047.
13. Vanoverbergh K, et al. (2004) Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ* 11(3):321–330.
14. Skryma R, et al. (2000) Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: Involvement in apoptosis. *J Physiol* 527(Pt 1):71–83.
15. Vanden Abeele F, Roudbaraki M, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N (2003) Store-operated Ca<sup>2+</sup> current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca<sup>2+</sup> transporter type 1. *J Biol Chem* 278(17):15381–15389.
16. Vanden Abeele F, et al. (2002) Bcl-2-dependent modulation of Ca(2+) homeostasis and store-operated channels in prostate cancer cells. *Cancer Cell* 1(2):169–179.
17. Tazuin S, et al. (2011) The naturally processed CD95L elicits a c-yes/calcium/P13K-driven cell migration pathway. *PLoS Biol* 9(6):e1001090.
18. Khadra N, et al. (2011) CD95 triggers Orai1-mediated localized Ca<sup>2+</sup> entry, regulates recruitment of protein kinase C (PKC)  $\beta$ 2, and prevents death-inducing signaling complex formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(47):19072–19077.
19. Zhuang L, et al. (2002) Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 82(12):1755–1764.
20. Flourakis M, et al. (2010) Orai1 contributes to the establishment of an apoptotic-resistant phenotype in prostate cancer cells. *Cell Death Dis* 1:e75.
21. Vanden Abeele F, et al. (2004) Two types of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with different activation modes and molecular origin in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 279(29):30326–30337.
22. Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S (2007) STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 9(6):636–645.
23. Kovacs G, et al. (2012) Inhibition of the human epithelial calcium channel TRPV6 by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB). *Cell Calcium* 52(6):468–480.
24. Peng JB, et al. (2000) Human calcium transport protein CaT1. *Biochem Biophys Res Commun* 278(2):326–332.
25. Wissenbach U, et al. (2004) TRPV6 and prostate cancer: Cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca<sup>2+</sup> channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* 322(4):1359–1363.
26. Lehen'kyi V, Raphaël M, Prevarskaya N (2012) The role of the TRPV6 channel in cancer. *J Physiol* 590(Pt 6):1369–1376.
27. Bödding M, Flockerzi V (2004) Ca<sup>2+</sup> dependence of the Ca<sup>2+</sup>-selective TRPV6 channel. *J Biol Chem* 279(35):36546–36552.
28. Schindl R, Kahr H, Graz I, Groschner K, Romanin C (2002) Store depletion-activated CaT1 currents in rat basophilic leukemia mast cells are inhibited by 2-aminoethoxydiphenyl borate. Evidence for a regulatory component that controls activation of both CaT1 and CRAC (Ca<sup>2+</sup>) release-activated Ca(2+) channel channels. *J Biol Chem* 277(30):26950–26958.
29. Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ (2005) TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: Regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflügers Arch* 451(1):181–192.
30. Schindl R, et al. (2012) Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. *J Biol Chem* 287(42):35612–35620.
31. Cheng KT, Liu X, Ong HL, Swaim W, Ambudkar IS (2011) Local Ca<sup>2+</sup> entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals required for specific cell functions. *PLoS Biol* 9(3):e1001025.
32. van de Graaf SF, Chang Q, Mensenkamp AR, Hoenderop JG, Bindels RJ (2006) Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 26(1):303–312.
33. van de Graaf SF, et al. (2003) Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J* 22(7):1478–1487.
34. Lu P, Boros S, Chang Q, Bindels RJ, Hoenderop JG (2008) The beta-glucuronidase klotho exclusively activates the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6. *Nephrol Dial Transplant* 23(11):3397–3402.
35. Bezzerides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE (2004) Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6(8):709–720.
36. Lehen'kyi V, Flourakis M, Skryma R, Prevarskaya N (2007) TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* 26(52):7380–7385.
37. Lipskaia L, Lompré AM (2004) Alteration in temporal kinetics of Ca<sup>2+</sup> signaling and control of growth and proliferation. *Biol Cell* 96(1):55–68.
38. Loh C, et al. (1996) Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J Biol Chem* 271(18):10884–10891.
39. Baksh S, et al. (2002) NFATC2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* 10(5):1071–1081.
40. Caetano MS, et al. (2002) NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: Evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J* 16(14):1940–1942.
41. Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK (2005) NFAT transcription factors: From cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res* 38(3):335–344.
42. Nilius B, et al. (2002) Fast and slow inactivation kinetics of the Ca<sup>2+</sup> channels ECaC1 and ECaC2 (TRPV5 and TRPV6). Role of the intracellular loop located between transmembrane segments 2 and 3. *J Biol Chem* 277(34):30852–30858.
43. Nilius B, et al. (2003) The carboxyl terminus of the epithelial Ca(2+) channel ECaC1 is involved in Ca(2+)-dependent inactivation. *Pflügers Arch* 445(5):584–588.
44. Lehen'kyi V, Shapovalov G, Skryma R, Prevarskaya N (2011) Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol* 301(6):C1281–C1289.
45. Monet M, et al. (2010) Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 70(3):1225–1235.
46. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2004) Ca<sup>2+</sup> homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 322(4):1326–1335.
47. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM (2001) Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 59(4):657–663.
48. Di Sano F, et al. (2006) Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosis-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem* 281(5):2693–2700.
49. Nawrocki ST, et al. (2005) Bortezomib sensitizes pancreatic cancer cells to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Cancer Res* 65(24):11658–11666.
50. Baldwin AS (2012) Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- $\kappa$ B: Critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol Rev* 246(1):327–345.
51. Yates LL, Görecki DC (2006) The nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): From a versatile transcription factor to a ubiquitous therapeutic target. *Acta Biochim Pol* 53(4):651–662.
52. Mengel B, et al. (2010) Modeling oscillatory control in NF- $\kappa$ B, p53 and Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 20(6):656–664.
53. Verma A, Mehta K (2007) Transglutaminase-mediated activation of nuclear transcription factor-kappaB in cancer cells: A new therapeutic opportunity. *Curr Cancer Drug Targets* 7(6):559–565.
54. Flourakis M, et al. (2006) Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J* 20(8):1215–1217.
55. Zhao Y, et al. (2007) Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res* 67(12):5821–5830.
56. Muik M, et al. (2008) Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *J Biol Chem* 283(12):8014–8022.



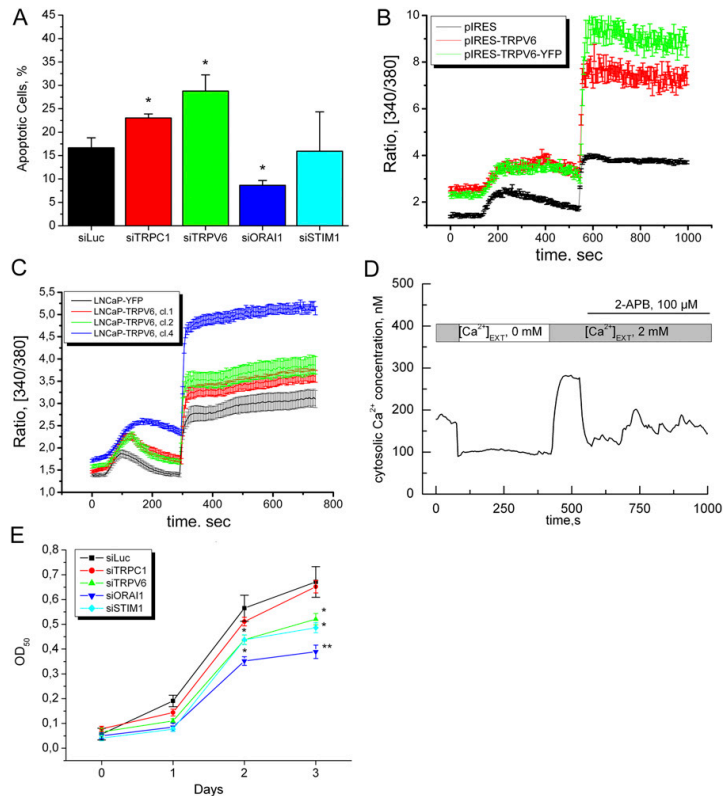


TRPC1 (gray circles), or TRPV6 (white triangles). (H) Histograms summarizing InsP3 activated  $I_{SOc}$  normalized densities in the control LNCaP or LNCaP cells pretreated with siRNA against Orai1, STIM1, TRPC1, or TRPV6. (I) Coimmunoprecipitation of TRPC1 using anti-STIM1 antibody under 2 min of 1  $\mu$ M TG treatment. (J) Coimmunoprecipitation of STIM1 using anti-TRPC1 antibody under 2 min of 1  $\mu$ M TG treatment. (K) Coimmunoprecipitation of TRPC1 channel using anti-TRPV6 antibody. (L) Coimmunoprecipitation of TRPV6 channel using anti-TRPC1 antibody. (M) TRPV6 translocation to the plasma membrane following 2 min of 1  $\mu$ M TG treatment in LNCaP cells pretreated with siRac1. (N) Time courses of  $I_{SOc}$  development measured at  $-100$ -mV holding potential in response to dialysis using 100  $\mu$ M InsP3 to deplete ER  $Ca^{2+}$  stores and activate  $I_{SOc}$  in control LNCaP cells (black circles) and in LNCaP cells pretreated with the 50 nM of siRNA against ANXI. (O) Histograms summarizing InsP3 activated  $I_{SOc}$  normalized densities in control LNCaP (siCTRL) or LNCaP cells pretreated with siRNA against ANXI; \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ . (P) Fluorescence images of chimeras-transfected cells and control pMax plasmid (a), plasmids coding for Stim1wt and Orai1wt (b), plasmids coding for Stim1wt and Orai1c-c (c), and plasmid coding for Stim1wt and Orai1p-m (d).

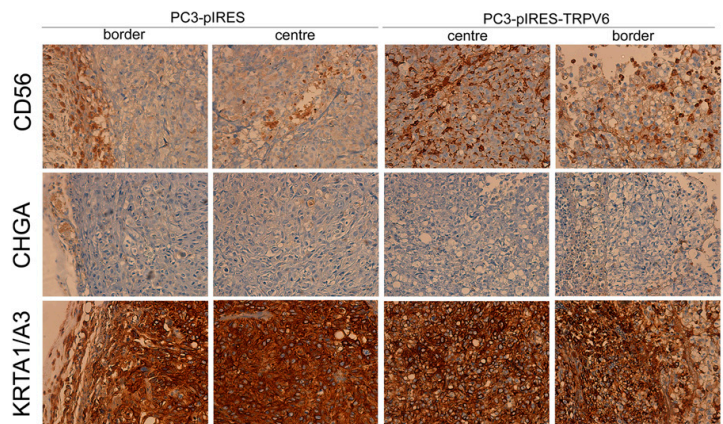




**Fig. 53.** (A) Immunoblotting showing the expression of TRPV6 channel in control LNCaP-pIRES and LNCaP-pIRES-TRPV6 overexpressing stable clones using rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody (Alomone; 1/200, batch AN-04) and using  $\beta$ -actin antibody (AKTB) as loading control (Sigma, 1/10,000). NE are TRPV6 nonexpressing cells (CHO). (B) Quantitative real-time PCR of TRPV6 mRNA in LNCaP clones.  $**P < 0.01$ ,  $n = 3$ . (C) Immunoblotting showing the expression of TRPV6 channel in control PC3-pIRES and PC3-pIRES-TRPV6 overexpressing stable clones using rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody. (D) Quantitative real-time PCR of TRPV6 mRNA in PC3 clones.  $**P < 0.01$ ,  $n = 3$ . (E) Immunoblotting showing the expression of TRPV6 channel in control DU145-pIRES and DU145-pIRES-TRPV6 overexpressing stable clones using rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody. (F) Quantitative real-time PCR of TRPV6 mRNA in DU145 clones.  $**P < 0.01$ ,  $n = 3$ . (G) Immunoblotting showing the expression of TRPV6 channel in control HEK293-pIRES and HEK293-pIRES-TRPV6 overexpressing stable clones using rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody. (H) Semi-quantitative PCR of TRPV6 mRNA in HEK293 clones. (I) Immunoblotting showing the expression of TRPV6 channel in control CHO-pIRES and CHO-pIRES-TRPV6 overexpressing stable clones using rabbit polyclonal anti-TRPV6 antibody. (J) Semi-quantitative PCR of TRPV6 mRNA in CHO clones. (K) Original electrophysiological recordings of TRPV6 channel using divalent-free medium to detect its activity and ruthenium red as a nonselective inhibitor of TRPV6. (L) An  $I/V$  curve of TRPV6 ion channel activity using RAMP protocol from +100 to  $-100$  mV.



**Fig. 54.** (A) Apoptosis rate in control LNCaP cells treated with 1  $\mu$ M TG for 36 h and pretreated with the siRNAs against TRPC1, TRPV6, Ora1, and STIM1, and the number of apoptotic cells was calculated using Hoechst staining;  $**P < 0.05$ ,  $n = 3$ . (B) ER  $Ca^{2+}$  store depletion and capacitative calcium entry in LNCaP cells transfected with the control (pIRES) plasmid and pIRES-TRPV6 and pIRES-TRPV6-YFP plasmids for 24 h before the experiment was conducted. (C) Endoplasmic reticulum (ER)  $Ca^{2+}$  store depletion and capacitative calcium entry in stable LNCaP clones expressing either YFP or TRPV6-YFP chimeras (different clones). (D) Constitutive calcium entry in LNCaP cells transiently overexpressing TRPV6 channel; 2-aminoethoxydiphenylborane (2-APB, 100  $\mu$ M) was added as a potent inhibitor of TRPV6. (E) Cell survival MTS assay [using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) compound] in control LNCaP cells pretreated with the siRNAs against TRPC1, TRPV6, Ora1, and STIM1;  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ,  $n = 3$ .



**Fig. 55.** The expression of clinical markers [CD56 and chromogranin A (CHGA), markers of neuroendocrine tumors; cytokeratin A1/A3 (KRTA1/A3), marker of epithelial cells] in PC3-pIRES(-TRPV6) tumors (x200) either in the center or on the border of the tumors.

**Table S1. Primers and siRNAs used in the study**

No.	Name, accession no.	Forward (5' to 3')	Backward (5' to 3')	Expected size (bp)
1	ORAI1, NM_032790	CTTCAGTGCCATGCACACAG	CCTGGAAGTGTGCGTCAGTC	448
2	RAC1, NM_006908	GCTTATGGGATACAGCTGGAC	CTCTTCCTCTTCTCACGGG	399
3	ANX I, NM_000700	CTGTGAAGTCATCCAAAGGTG	CTTCAGTTCCTCTGTAGACC	412
4	TRPV6, NM_001007000	<i>GCCTTCTATATCATCTTCC</i>	<i>GGTATGCTGTACATGAAGG</i>	155
5	S100A11, NM_005620	CAGCCCTACAGAGACTGAGC	CCTTGAGGAAGGAGTCATGG	277
6	β-Actin, NM_001101	CAGAGCAAGAGAGGCATCCT	GTTGAAGGTCTCAAACATGATC	209
7	HPRT (NM_000194)	<i>GGCGTCGTGATTAGTGATGAT</i>	<i>CGAGCAAGACGTTTCAGTCTC</i>	134
8	siTRPV6	5'-CCUGCUGCAGCAGAAGAGG(dTdT)-3' (position 111–129 from ATG)		
9	siRac1	5'-GAUAAAGACACGAUCGAGA(dTdT)-3' (position 364–383 from ATG)		
10	siANX I	5'-ACUCCAGCGCAUUUGAUG(dTdT)-3' (position 414–432 from ATG)		
11	siTRPC1	5'-GGGUGACUAUUUAUUGGUU(dTdT)-3' (position 170–188 from ATG)		
12	siSTIM1	5'-GGCUCUGGAUACAGUGCUC(dTdT)-3' (position 578–596 from ATG)		
13	siOrai1	5'-UGAGCAACGUGCACAUCU(dTdT)-3' (position 451–469 from ATG)		
14	siCT (Luciferase, AB_490793)	5'-CUUACGCCUGAGUACUUCCGA(dTdT)-3'		

Sequences for the qPCR are indicated in italic script.

**Table S2. Dilutions and staining characteristics of some antibodies used for the tissue staining at the Department of Cell Pathology, Catholic Institute of Lille, University of Lille Nord de France, St Vincent Hospital, Lille, France**

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	Pretreatment	Incubation (min)
PSA	Dako	Polyclonal Code A0562	1/500	CC2 STD	32
CD31	DAKO	Mono JC70 A	1/25	CC2 COURT	32
Ki-67	Dako	Mono MIB-1	1/100	CC2 STD	32
Capase 3 cleaved	Cell Signaling Technology ( <a href="http://www.cellsignal.com">www.cellsignal.com</a> )		1/250	CC1 STD + AMPLI	32
Synaptosin	Abcam	Mono SP11	Previously diluted	CC1 COURT	24
CD56	Leica	Mono 1B6	1/10	CC2 STD	32

## 2. Discussion

L'étude décrite précédemment met en évidence plusieurs résultats importants: (i) la transactivation du canal Orai1 par STIM1 induit l'entrée capacitive de  $Ca^{2+}$  dans la cellule, ce qui déclenche l'activation du complexe annexine I / S100A11 assurant la translocation des vésicules contenant TRPV6 vers la membrane plasmique; (ii) l'expression de TRPV6 dans les cellules PCa rend les cellules cancéreuses plus viables et résistantes à l'environnement *in vivo* et donc (iii) potentialise la tumorigenèse *in vivo*.

Ce n'est qu'au début des années 2000 que le canal calcique TRPV6 a été détecté dans certains cancers, notamment dans le cancer de la prostate, cela grâce à deux équipes en particulier, celles de Hediger (Peng et al., 2000) et Flockerzi (Fixemer et al., 2003) qui ont utilisé la technique du Northern Blot. Grâce à un anticorps spécifique de TRPV6 humain, nous avons montré que ce canal est faiblement exprimé dans quelques hyperplasies bénignes de la prostate, en accord avec les résultats de la première équipe (Peng et al., 2001), puis que son expression protéique augmente dans les adénocarcinomes prostatiques ayant un score de Gleason de 7 à 9.

Nous avons montré que TRPV6 joue un rôle dans l'entrée SOCE induite par la Thapsigargine (Tg) dans les cellules PCa LNCaP (Vanden Abeele et al., 2003). Cependant ce n'est pas un canal SOC car il n'est pas directement transactivé par Stim1 contrairement à Orai1 ou TRPC1 (Yuan et al., 2007). En revanche, TRPV6 est envoyé à la membrane plasmique suite au courant SOCE et grâce à l'activation du complexe S100A11/annexine I. Ensuite, nous avons constaté une interaction entre TRPC1 et TRPV6 dans les LNCaP qui forment un hétérotétramère diminuant la présence de TRPV6 à la membrane plasmique et/ou l'activation de TRPV6 comme dans les HEK (Schindl et al., 2012). Il semblerait donc que les canaux SOC Orai1 et TRPC1 jouent un rôle crucial dans la régulation de la translocation du canal TRPV6. Ce type de régulation est également mis en jeu dans la translocation de TRPV5 mais en faisant intervenir soit le complexe S100A10/annexine II dans la lignée cellulaire HEK (van de Graaf et al., 2003b), soit la petite GTPase Rab11a dans les HEK et les cellules épithéliales rénales de lapin (van de Graaf et al., 2006). Il en est de même pour le canal TRPC5, impliqué dans la croissance axonale, via la voie PI3K, Rac1, PIP5K (Bezzarides et al., 2004) ainsi que pour la translocation de TRPC1 suite à l'activation de Orai1 (Cheng et al., 2011). Nous avons vu que Rac1 est exprimé dans les LNCaP mais son extinction n'influence pas la translocation de TRPV6 induite par la vidange calcique du RE par la Tg.

Puis, nous avons constaté que la surexpression du canal fonctionnel TRPV6 dans les cellules PCa favorise la croissance cellulaire *in vitro* et la résistance des cellules à l'apoptose. Cela avait déjà été montré au laboratoire dans le cas d'une extinction du canal TRPV6 dans les LNCaP (Lehen'kyi et al., 2007c). L'effet pro-prolifératif de TRPV6 passait alors par l'entrée de  $Ca^{2+}$  activant la calcineurine puis la voie du NFAT dont les membres numéros 2, 3 et 4 sont impliqués dans la progression du cycle cellulaire (pour revue voir Viola et al., 2005). Cette propriété de TRPV6 est maintenant vérifiée par des surexpressions stables de ce canal dans les différentes lignées de PCa quelque soit leur sensibilité aux androgènes. Quant à l'effet de TRPV6 sur la résistance à l'apoptose induite ici encore par un

stress réticulaire induit par la Tg ou le cisplatine, il est possible que celui-ci passe par l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. En effet, l'influx transitoire de  $\text{Ca}^{2+}$  dû au rétrocontrôle négatif qu'il exerce sur TRPV6 est typique du signal calcique pro-survie dans les cellules cancéreuses (pour revue voir Prevarskaya et al., 2010; Lehen'kyi et al., 2011e). NF- $\kappa$ B joue un rôle dans l'initiation tumorale, la promotion, la croissance, et l'invasion en induisant notamment l'expression de gènes impliqués dans la résistance à l'apoptose (pour revue voir Baldwin, 2012; Yates and Górecki, 2006). Or, les oscillations calciques sont connues pour jouer un rôle dans la régulation de NF- $\kappa$ B, de p53 et de la voie Wnt (Mengel et al., 2010). La TGM2, membre ubiquitaire des transglutaminases dépendantes du  $\text{Ca}^{2+}$  pouvant activer NF- $\kappa$ B, est également exprimée de manière aberrante dans de nombreux cancers humains et impliquée dans la résistance à l'apoptose induite par les drogues tout en promouvant la progression vers le phénotype métastatique (pour revue voir Verma and Mehta, 2007).

Finalement, les expériences de xénogreffes *in vivo*, les analyses immunohistologiques des tumeurs ainsi que l'observation des lésions osseuses ont confirmé l'effet proto-oncogène de TRPV6 dans les cellules PCa androgéno-indépendantes PC3. Ces résultats sont parfaitement en adéquation avec ceux observés quant à l'expression et au rôle de TRPV6 dans l'autre adénocarcinome hormonosensible, le cancer du sein (Bolanz et al., 2008; Bolanz et al., 2009; Peters et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats fait de TRPV6 un canal calcique crucial dans le développement et la progression des cancers hormono-dépendants, comme le cancer de la prostate et, par conséquent, une protéine à prendre particulièrement en compte dans le développement de nouvelles thérapies.

## Annexe II

Protocole de xénogreffes *in vivo* dans un modèle de souris swiss nude

# TUMOUR XENOGRAFT MODELS TO STUDY THE ROLE OF TRP CHANNELS IN TUMOURIGENESIS

V'yacheslav Lehen'kyi<sup>1</sup>, Sergii Khalimonchuk<sup>1</sup>, Albin Pourtier<sup>2</sup>, Maylis Raphaël<sup>1</sup>, Natalia Prevarskaya<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U-1003, Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, Villeneuve d'Ascq, France; Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL), Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup>UMR-8161, CNRS / Universités de Lille1 et Lille2/ Institut Pasteur de Lille; Institut de Biologie, 59021 Lille cedex, France

\*-Corresponding author: Prof. Natalia Prevarskaya, Head of Laboratory of Cell Physiology, INSERM U1003

Bât. SN3, 2<sup>ème</sup> étage, p. 232, Cité Scientifique, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

Tel.: +33 3 20 33 60 18

e-mail: [Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr](mailto:Natacha.Prevarskaya@univ-lille1.fr)

## Abstract

This chapter is devoted to the study of the role of TRP-channels in tumourigenesis *in vivo* using a tumour xenograft model in immunodeficient mice. Either cancerous cells naturally expressing TRP channels, or TRP channel stably-expressing cancerous or normal cells, could be injected into immunodeficient mice. After grafting cells may grow in mice and form the solid tumours which can be measured and photographed. On reaching the critical allowed size the tumours are excised and consequently mice have to be sacrificed. Once excised, the tumours are photographed, weighted, and volume is measured. In addition, tumours may be subjected to further analysis as immunocytochemistry, western-blotting, PCR, etc. To confirm the role of a particular channel on tumourigenesis *in vivo*, some tumours could alternatively be treated *in vivo* with TRP-channel specific siRNA. Hence, tumour xenograft model using immunodeficient mice represents a valuable tool for the study of the role of TRP-channels in carcinogenesis *in vivo*.

**Key words:** TRP-channels, cancer, protocol, xenograft, swiss nude mice

## 1. Introduction

The ability of cells to initiate and promote the development of a tumour is called tumourigenesis leading to a more general processes called carcinogenesis (1). Tumourigenesis in humans is thought to be a multistep process where certain mutations confer a selective advantage, allowing lineages derived from the mutated cell to outcompete other cells. Although molecular cell biology has substantially advanced cancer research, our understanding of the evolutionary dynamics that govern tumourigenesis is still limited (2). The study of TRP-channel patho/physiology at a molecular level could contribute to highlight their role in early cancer.

We and others, established the the role of some TRP-channels in epithelial cell cancerigenesis and notably tumourigenesis (3-5). For instance, a role of TRPC6 channel has been demonstrated in the development of human glioma (6) and human oesophageal cancer (7), a role of TRPC1 channel has been confirmed in human glioma tumourigenesis (8), as for TRPC3 in human ovarian cancer (9), TRPV2 in prostate cancer (10), and others. In all the above studies the role of TRP-channels in tumourigenesis *in vivo* has been studied using a tumour xenograft model in immunodeficient mice. This approach allows to study the role of a particular TRP-channel on the ability of tumour cells or stable

clones overexpressing this channel to induce tumour formation *in vivo*.

Animal models are critical for the study of cancer molecular mechanisms and for the development of new antitumor agents. Immunodeficient mouse models are very useful models for immunology, infectious disease, stem cell biology, cancer and other research (11). Nude mice is among the most commonly used animal models of immunodeficient mice. The discovery of nude athymic (nu/nu) mice that were T-cell deficient (12), and later B-cell-deficient and T-cell-deficient severe combined immunodeficient (scid/scid) mice (13), allowed the routine and efficient transplantation and propagation of human tumor tissues (xenografts) in mice.

Although viability and fertility of nude mice are severely reduced, they can be improved under specific pathogen-free conditions. Homozygotes are naturally thymectomized animals, are hairless from birth and completely lack a thymus due to a failure of development of the thymic anlage. The thymic rudiment of homozygous nude mice fails to attract lymphoid cells but their lymphocytes are normal in their ability to populate implanted normal thymuses. The lack of the thymus leads to many defects of the immune system, including depletion of lymphocytes in thymus-dependent regions of lymph nodes and spleen, a greatly reduced population of lymphocytes composed almost entirely of B-cells, very poor response to thymus-dependent antigens. Nude mice were proved useful tools for investigations of the role of the thymus in immune reactions (14), can easily accept xenografts and be used in tumorigenicity.

The relevance of each particular animal model depends on how close it replicates the histology, physiological effects, biochemical pathways and metastatic pattern observed in the same human tumour type. Metastases are especially important because they are the main determinants of the clinical course of the disease and patient survival, and are the target of systemic therapy. Among existing models, orthotopic xenografts of human tumours, or

tumour cell lines, in nude mice reproduce the histology and metastatic pattern of most human tumours especially at advanced stage. Despite the fact that orthotopic xenografts models are more promising than the most commonly used subcutaneous xenografts in preclinical drug development, their capacity to predict clinical response to antitumor agents remains to be studied (15).

The studies of the role of TRP-channels in tumourigenesis *in vivo* have been performed using a tumour xenograft model in immunodeficient mice as a mean for the study of the role of a particular TRP-channel on the ability of tumour cells or stable clones overexpressing this channel to induce tumour formation *in vivo*.

In this chapter we describe how the role of a specific TRP channel can be monitored *in vivo*, and how its expression can be manipulated by siRNA injections along tumour development.

## **2. Materials**

### **2.1 Equipment**

The equipment needed for tumour xenograft models is precise and need a proper animal facility as close as possible to your laboratory, and where immunodeficient animals can be specifically housed (usually under superpression of air). Animals are maintained in cages covered with air filters at appropriate temperature, humidity, and a day/night cycle, and manipulated under sterile hood. The housing is highly restricted and subject to numerous policies and regulations, such as those from ethical and veterinary committees. The director of the study as each researcher should have specific skills/education and the legal authorisation to work with immunodeficient/transgenic animals.

1) Immunodeficient mice 5-6 weeks old, males, of strains such as: swiss nude mice, RjOrl:SWISS (souris CD-1); mice NMRI, RjHan:NMRI; or Rj:NMRI-nu (nu/nu).

2) Sterile syringes 1 ml.



- 3) Needles of 20-23 G and 26 G in size.
- 4) Surgical instruments to excise tumours following euthanasia.

## 2.2. Reagents and solutions

- 1) BD Matrigel™ Matrix Growth Factor Complete medium.
- 2) Standard sterile PBS solution.
- 3) Solutions for anaesthesia: Kétamine (Verbac, France) 50 mg/ml, and Domitor (Janssen Cilag) 0.85 mg/ml. For 1 ml of sterile solution (filtered via 0.22 µm filter) take 0.2 ml of Ketamine solution, add Domitor 0.12 ml and 0.68 ml of saline solution (NaCl 0.9%).
- 4) Solution for anti-anaesthesia: Antisedan (Atipamézole) 5 mg/ml. For 1 ml of sterile solution (filtered via 0.22 µm filter) take 0.1 ml of Antisedan and add 0.9 ml of saline solution (NaCl 0.9%).
- 5) Pentobarbital (stock solution 200 mg/ml kept at +4°C).

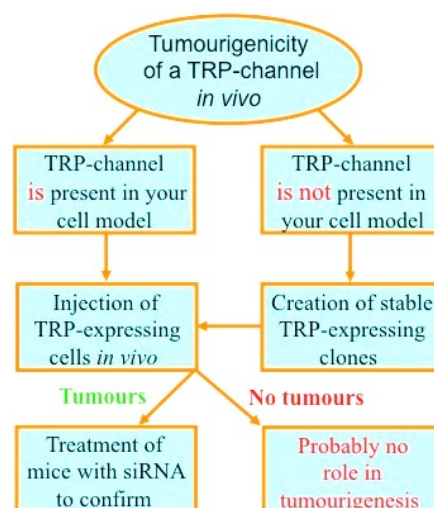
## 3. Methods

### 3.1. Preparation of cells for injection and grafting cells to immunodeficient mice

Before starting your experiments it is strongly recommended to design a proper strategy to study a role of a particular TRP-channel on tumourigenesis *in vivo*. In fact, you have to perform all necessary experiments *in vitro* prior to experiments *in vivo*. As an example, if your data *in vitro* show that your TRP-channel is involved either in proliferation or apoptosis resistance, or in migration or invasion, then you can design your studies *in vivo*. As a general concept, the initial point is whether your channel of interest is expressed in your cell model or not (Scheme 1). If your channel is present in your cell model you can use them directly, and if they are able to create tumours you can use siRNA strategy to prove its role in tumourigenesis.

Though you have to think over the appropriate controls before! If your channel is not present it is worth to create stable clones of this channel in your cell line, especially if your channel is known to be present *in vivo* and disappears during cell culture *in vitro*. In this case you have to be cautious while interpreting data with stable clones by using multiple clones with different levels of expression. Finally, if your clones give tumours *in vivo*, the use of a siRNA strategy could confirm the data you have obtained.

Once your cell model is ready together with the respective control (e.g. control clones for stable clones or the cell line which does not express your TRP-channel), you can start grafting as below:



**Scheme 1** The general concept of experiments *in vivo* to study the role of TRP channels in tumourigenesis.

- 1) Culture cell as usual taking into consideration that you will need  $2 \times 10^6$  cells per mouse on the day of injections (**Note 1**).
- 2) Detach cells very gently using either with Trypsin-EDTA or PBS-EDTA solution. You will need to count the cells and to pellet them again to assure the required quantity of cells ( $2 \times 10^6$ ) per mouse in each tube.
- 3) Re-suspend the cells in 100 µl of PBS and transfer the suspension to 0.5 ml tubes containing one volume of Matrigel™ solution (**Note 2**), so

that the total volume is 200 µl per mouse consisting of 1 to 1 v/v of PBS and Matrigel™ (Note 3). Mix thoroughly and leave on ice.

4) Perform anaesthesia of mice intraperitoneally with e.g. mix of Ketamine and Domitor at the dose of 10 ml/kg (cf. preparation above) using 1 ml syringes and 26 G needles.

5) Do subcutaneous injections of cells preferably to the back right behind the neck (Note 4) using 1 ml syringes and e.g. 21 G needles (Note 4 and 5). Use at least 6-10 animals per experimental condition to assure significant statistical data and mark each animal in the cage to easily recognize them (Note 6). Reserve animals for the PBS/Matrigel™ only injections to provide an additional control.



**Fig. 1** A photo depicting the standard daily procedure of tumour size measurements. You can see a cage placed in a hood where nude mice bearing tumours are measured. Black arrow points out a tumour situated at the back of the mouse.

6) Inject Antisedan (Atipamézole) at the dose of 10 ml/kg (cf. preparation above) subcutaneously using 1 ml syringes and 26 G needles to wake up the animal to avoid morbidity due to hypothermia.

### **3.2. Measuring and sacrificing animals**

Following injections, daily and careful examination of each animal should be performed. Depending on the cell type, and for the most

aggressive cancer cells as PC3 or DU145 (for the prostate cancer) 2-3 weeks is enough to start seeing tumours on their back.

1) Measure tumours as soon as they are visible every 2-3 days using a ruler and avoiding stressing much the animals (Note 7).

2) Weight animals regularly and take pictures, an example is shown in Fig. 2 (Note 8).

3) As soon as one of the tumours within the experimental group reaches its maximal allowed size you have to sacrifice all animals in this group by administering 150 mg/kg of pentobarbital intraperitoneally using 1 ml syringes and 26 G needles.

4) Excise the tumours, document all data from each individually marked mouse. Photograph tumours, weight on the balances, and measure volume (Note 9).

5) Cut the tumours into pieces and freeze them for the further mRNA extraction, protein extraction, and/or put to formaline (3.75%) to further paraffinize them to be analysed by immunohistochemistry.

### **3.3. siRNA treatment of tumours**

It is preferable to know the dynamics of the tumour growth before starting experiments with siRNA treatment against TRP-channel of interest. It is needed to assure that you begin the treatment when tumour is in the exponential growth phase (to be defined experimentally).

1) Normalize your quantity of siRNA since the total volume injected will be up to 200 µl of siRNA diluted in a sterile PBS (Note 3). For the control group, as *in vitro*, use a non-coding siRNA, such as siRNA against firefly luciferase.

2) Start daily injections of siRNA intraperitoneally for the period which lasts usually from 2 to 3 weeks. The quantity of siRNA

injection is around 120 µg of siRNA per 1 kg intraperitoneally.

3) Continue measuring tumours every 2-3 days using a ruler and avoiding stressing much the animals (**Note 7**).

4) Weight animals regularly and take pictures, an example is shown in Fig. 2 (**Note 8**).

5) Sacrifice all your animals at the end of the treatment from both experimental and control group using 150 mg/kg of pentobarbital intraperitoneally using 1 ml syringe and 26 G needles.

6) Excise the tumours, document all data from each individually marked mouse. Photograph tumours, weight on the balances, and measure volume (**Note 9**).

7) Cut the tumours into pieces and freeze for the further mRNA extraction, protein extraction, and/or put to formaline (3.75%) to further paraffinize them to be analysed by immunohistochemistry (**Note 10**)

#### 4. Notes

There are some important details to follow to assure that you will succeed:

1) Prepare your cells for injections so that they are in the exponential growth phase, i.e. for the majority of cell types around 50-70% of confluence. It will assure their increased vitality during first days of grafting.

2) One day before your experiment get out of the freezer your Matrigel™ solution and to put it into the fridge at +4°C for 24 hours. The day of grafting put all syringes, needles, PBS solution, and Matrigel™ on ice before and during experiment. Transfer the cells in PBS to Matrigel™ as fast as possible, do not more than one experimental group at a time since the viability of even cancer cells is rather diminished at +4°C.

3) Be aware of the dead space in the needle while injecting. You can increase the volume up to 30% to assure the desired dose of cells or siRNA.

4) The size/internal diameter of the needle is crucial. The size 21 to 23G is optimal. The reticulation of the Matrigel™ components could lead to accumulate fibres and create a filter in case of a too small needle diameter. In addition, cells are damaged while passing through the small needles and therefore not viable.

5) Following injections transfer the resting liquid containing cells from each syringe to one well of a, e.g. 6-well plate. You will see tomorrow if you have injected viable cells and at what rate.

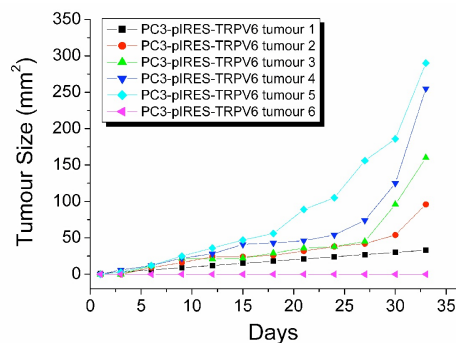
6) Mark your mice properly since you will associate each mice to the result obtained. Even water-resistible marker is erasing from the skin of mice in 2-3 days. Preferably use ear tags and try not to mix the mice from different groups in the same cage.

7) While doing measurements multiply length by width (it is not really possible to measure the depth), even if these are approximate measurements they reflect the relative tumour growth. An example graph you can build from these data is shown in Fig. 1.

8) You can keep the tumours growing till they approach certain limits, and depending on the country, the tumour size generally should not exceed 1000 mm<sup>3</sup> in volume and 10% of the mouse mass.

9) Keep tumours on ice while measuring them. The volume is usually measured by placing the tumour in the graduated cylinder of the appropriate diameter filled with PBS solution till one of the ticks. The tumour will replace PBS and this change you can measure visually or by pipetting the PBS off till the initial tick. In the case of the small tumours you can use 1 ml syringe and a pipette to take off water till the initial tick. Alternatively volume (mm<sup>3</sup>) can be

estimated according to the formula  $(L \times W^2)^{1/2}$  (16).



**Fig. 2** An example graph of daily measurements of the size of the tumours (length x width) derived from the stable clones overexpressing TRPV6 channels injected into swiss nude mice.

9) If your siRNA seems to have no effect it does not imply your channel has nothing to do with the tumorigenesis. Extract mRNA or protein first to prove a selective knockdown in tumours formed prior to making any conclusions.

## 5. References

1. Frank SA (2007) (Translated from eng) (in eng).
2. Spencer SL, Gerety RA, Pienta KJ, & Forrest S (2006) Modeling somatic evolution in tumorigenesis. (Translated from eng) *PLoS Comput Biol* 2(8):e108 (in eng).
3. Lehen'kyi V & Prevarskaya N (2011) Oncogenic TRP channels. (Translated from eng) *Adv Exp Med Biol* 704:929-945 (in eng).
4. Prevarskaya N, Zhang L, & Barritt G (2007) TRP channels in cancer. (Translated from eng) *Biochim Biophys Acta* 1772(8):937-946 (in eng).
5. Shapovalov G, Lehen'kyi V, Skryma R, & Prevarskaya N (2011) TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. (Translated from Eng) *Cell Calcium* (in Eng).
6. Ding X, *et al.* (2010) Essential role of TRPC6 channels in G2/M phase transition and development of human glioma. (Translated from eng) *J Natl Cancer Inst* 102(14):1052-1068 (in eng).

7. Shi Y, *et al.* (2009) Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer. (Translated from eng) *Gut* 58(11):1443-1450 (in eng).
8. Bomben VC & Sontheimer H (2010) Disruption of transient receptor potential canonical channel 1 causes incomplete cytokinesis and slows the growth of human malignant gliomas. (Translated from eng) *Glia* 58(10):1145-1156 (in eng).
9. Yang SL, Cao Q, Zhou KC, Feng YJ, & Wang YZ (2009) Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer. (Translated from eng) *Oncogene* 28(10):1320-1328 (in eng).
10. Monet M, *et al.* (2010) Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. (Translated from eng) *Cancer Res* 70(3):1225-1235 (in eng).
11. Sharkey FE & Fogh J (1984) Considerations in the use of nude mice for cancer research. (Translated from eng) *Cancer Metastasis Rev* 3(4):341-360 (in eng).
12. Flanagan SP (1966) 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. (Translated from eng) *Genet Res* 8(3):295-309 (in eng).
13. Bosma MJ & Carroll AM (1991) The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. (Translated from eng) *Annu Rev Immunol* 9:323-350 (in eng).
14. Fidler IJ (1986) Rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. (Translated from eng) *Cancer Metastasis Rev* 5(1):29-49 (in eng).
15. Cespedes MV, Casanova I, Parreno M, & Mangués R (2006) Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. (Translated from eng) *Clin Transl Oncol* 8(5):318-329 (in eng).
16. Wang X, Ponzio NM, & Studzinski GP (1997) Long-term exposure of HL60 cells to 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduces their tumorigenicity: a model for cancer chemoprevention. (Translated from eng) *Proc Soc Exp Biol Med* 215(4):399-404 (in eng).

# BIBLIOGRAPHIE

- Abdullaev, F.K., Bludov, Y.V., Dmitriev, S.V., Kevrekidis, P.G., and Konotop, V.V. (2008). Generalized neighbor-interaction models induced by nonlinear lattices. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 77, 016604.
- Van Abel, M., Huybers, S., Hoenderop, J.G.J., van der Kemp, A.W.C.M., van Leeuwen, J.P.T.M., and Bindels, R.J.M. (2006). Age-dependent alterations in Ca<sup>2+</sup> homeostasis: role of TRPV5 and TRPV6. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F1177–F1183.
- D'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.
- Adler, A.S., Sinha, S., Kawahara, T.L.A., Zhang, J.Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2007). Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity. *Genes Dev.* 21, 3244–3257.
- Von Ahsen, O., Waterhouse, N.J., Kuwana, T., Newmeyer, D.D., and Green, D.R. (2000). The “harmless” release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 7, 1192–1199.
- Akazawa, Y., Yuki, T., Yoshida, H., Sugiyama, Y., and Inoue, S. (2013). Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes. *Skin Pharmacol. Physiol.* 26, 15–21.
- Allen, D., Winters, E., Kenna, P.F., Humphries, P., and Farrar, G.J. (2008). Reference gene selection for real-time rtPCR in human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 49, 217–225.
- Ameur, A., Stewart, J.B., Freyer, C., Hagström, E., Ingman, M., Larsson, N.-G., and Gyllenstein, U. (2011). Ultra-deep sequencing of mouse mitochondrial DNA: mutational patterns and their origins. *PLoS Genet.* 7, e1002028.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., Semenchenko, A.V., Tyndyk, M.L., Yurova, M.N., Kovalenko, I.G., et al. (2011). If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging* 3, 148–157.
- Arrhenius, G., Sales, B., Mojzsis, S., and Lee, T. (1997). Entropy and charge in molecular evolution--the case of phosphate. *J. Theor. Biol.* 187, 503–522.
- Asakawa, M., Yoshioka, T., Matsutani, T., Hikita, I., Suzuki, M., Oshima, I., Tsukahara, K., Arimura, A., Horikawa, T., Hirasawa, T., et al. (2006). Association of a mutation in TRPV3 with defective hair growth in rodents. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2664–2672.
- Ashkenazi, A., and Dixit, V.M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.

Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012a). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31, 1949–1962.

Astle, M.V., Hannan, K.M., Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2012b). AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* 31, 1949–1962.

Aymard, E., Barruche, V., Naves, T., Bordes, S., Closs, B., Verdier, M., and Ratinaud, M.-H. (2011). Autophagy in human keratinocytes: an early step of the differentiation? *Exp. Dermatol.* 20, 263–268.

Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2013). Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunol. Rev.* 256, 80–94.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonia, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236.

Baker, D.J., Dawlaty, M.M., Wijshake, T., Jeganathan, K.B., Malureanu, L., van Ree, J.H., Crespo-Diaz, R., Reyes, S., Seaburg, L., Shapiro, V., et al. (2013). Increased expression of BubR1 protects against aneuploidy and cancer and extends healthy lifespan. *Nat. Cell Biol.* 15, 96–102.

Baldwin, A.S. (2012). Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF- $\kappa$ B: critical mechanisms in immune function and cancer. *Immunol. Rev.* 246, 327–345.

Banerjee, P., and Chatterjee, M. (2003). Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 247–254.

Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., et al. (2004). The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83, 706–716.

Barritt, G.J. (1998). Does a decrease in subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> explain how store-operated Ca<sup>2+</sup> channels are opened? *Cell Calcium* 23, 65–75.

Becchetti, A., and Arcangeli, A. (2010). Integrins and ion channels in cell migration: implications for neuronal development, wound healing and metastatic spread. *Adv. Exp. Med. Biol.* 674, 107–123.

Beck, B., Zholos, A., Sydorenko, V., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Bordat, P., Prevarskaya, N., and Skryma, R. (2006a). TRPC7 Is a Receptor-Operated DAG-Activated Channel in Human Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1982–1993.

- Beck, B., Zholos, A., Sydorenko, V., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Bordat, P., Prevarskaya, N., and Skryma, R. (2006b). TRPC7 is a receptor-operated DAG-activated channel in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *126*, 1982–1993.
- Beck, B., Lehen'kyi, V., Roudbaraki, M., Flourakis, M., Charveron, M., Bordat, P., Polakowska, R., Prevarskaya, N., and Skryma, R. (2008). TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma. *Cell Calcium* *43*, 492–505.
- Bellei, B., Mastrofrancesco, A., Briganti, S., Aspite, N., Ale-Agha, N., Sies, H., and Picardo, M. (2008). Ultraviolet A induced modulation of gap junctional intercellular communication by P38 MAPK activation in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* *17*, 115–124.
- Bernaldo de Quirós, S., Merlo, A., Secades, P., Zambrano, I., de Santa María, I.S., Ugidos, N., Jantus-Lewintre, E., Sirera, R., Suarez, C., and Chiara, M.-D. (2013). Identification of TRPC6 as a possible candidate target gene within an amplicon at 11q21-q22.2 for migratory capacity in head and neck squamous cell carcinomas. *BMC Cancer* *13*, 116.
- Bernardes de Jesus, B., Schneeberger, K., Vera, E., Tejera, A., Harley, C.B., and Blasco, M.A. (2011). The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell* *10*, 604–621.
- Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A.M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M.A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol. Med.* *4*, 691–704.
- Berridge, M.J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *17*, 491–500.
- Berridge, M.J. (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* *21*, 13–26.
- Berridge, M.J. (2009). Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 933–940.
- Berridge, M.J. (2013). Dysregulation of neural calcium signaling in Alzheimer disease, bipolar disorder and schizophrenia. *Prion* *7*, 2–13.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 517–529.
- Bezzerrides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., Greka, A., and Clapham, D.E. (2004). Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat. Cell Biol.* *6*, 709–720.
- Bianco, S.D.C., Peng, J.-B., Takanaga, H., Suzuki, Y., Crescenzi, A., Kos, C.H., Zhuang, L., Freeman, M.R., Gouveia, C.H.A., Wu, J., et al. (2007). Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the *Trpv6* calcium channel gene. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *22*, 274–285.



- Bickenbach, J.R., Vormwald-Dogan, V., Bachor, C., Bleuel, K., Schnapp, G., and Boukamp, P. (1998). Telomerase is not an epidermal stem cell marker and is downregulated by calcium. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1045–1052.
- Bikle, D.D. (2012). Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *13*, 3–19.
- Bikle, D.D., Nemanic, M.K., Gee, E., and Elias, P. (1986a). 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> production by human keratinocytes. Kinetics and regulation. *J. Clin. Invest.* *78*, 557–566.
- Bikle, D.D., Nemanic, M.K., Whitney, J.O., and Elias, P.W. (1986b). Neonatal human foreskin keratinocytes produce 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Biochemistry (Mosc.)* *25*, 1545–1548.
- Bikle, D.D., Ratnam, A., Mauro, T., Harris, J., and Pillai, S. (1996). Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J. Clin. Invest.* *97*, 1085–1093.
- Bíró, T., Tóth, B.I., Marincsák, R., Dobrosi, N., Géczy, T., and Paus, R. (2007). TRP channels as novel players in the pathogenesis and therapy of itch. *Biochim. Biophys. Acta* *1772*, 1004–1021.
- Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A., and Partridge, L. (2010). Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* *11*, 35–46.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W., and Szostak, J.W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* *12*, 1133–1138.
- Blanpain, C. (2007). [Impact of beta-catenin signaling pathway on stem cell differentiation in the skin]. *Médecine Sci.* *MS* *23*, 34–36.
- Blasco, M.A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 640–649.
- Blatti, S.P., and Scott, R.E. (1992). Stable induction of c-jun mRNA expression in normal human keratinocytes by agents that induce predifferentiation growth arrest. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *3*, 429–434.
- Bobbe, R., Hadri, L., Lopez, J.J., Sassi, Y., Atassi, F., Karakikes, I., Liang, L., Limon, I., Lompré, A.-M., Hatem, S.N., et al. (2011). SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *50*, 621–633.
- Bödding, M., Fecher-Trost, C., and Flockerzi, V. (2003). Store-operated Ca<sup>2+</sup> current and TRPV6 channels in lymph node prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 50872–50879.

- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.
- Bogeski, I., Kilch, T., and Niemeyer, B.A. (2012). ROS and SOCE: recent advances and controversies in the regulation of STIM and Orai. *J. Physiol.* 590, 4193–4200.
- Boitano, S., Dirksen, E.R., and Sanderson, M.J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 258, 292–295.
- Bolanz, K.A., Hediger, M.A., and Landowski, C.P. (2008). The role of TRPV6 in breast carcinogenesis. *Mol. Cancer Ther.* 7, 271–279.
- Bolanz, K.A., Kovacs, G.G., Landowski, C.P., and Hediger, M.A. (2009). Tamoxifen inhibits TRPV6 activity via estrogen receptor-independent pathways in TRPV6-expressing MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 2000–2010.
- Bon, R.S., and Beech, D.J. (2013). In pursuit of small molecule chemistry for calcium-permeable non-selective TRPC channels -- mirage or pot of gold? *Br. J. Pharmacol.* 170, 459–474.
- Bonkhoff, H. (2001). Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO 12 Suppl 2*, S141–S144.
- Boonekamp, J.J., Simons, M.J.P., Hemerik, L., and Verhulst, S. (2013). Telomere length behaves as biomarker of somatic redundancy rather than biological age. *Aging Cell* 12, 330–332.
- Bosman, F.T. (1993). Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem. J.* 25, 469–477.
- Boss, G.R., and Seegmiller, J.E. (1981). Age-related physiological changes and their clinical significance. *West. J. Med.* 135, 434–440.
- Boué-Grabot, É., Archambault, V., and Séguéla, P. (2000). A Protein Kinase C Site Highly Conserved in P2X Subunits Controls the Desensitization Kinetics of P2X2 ATP-gated Channels. *J. Biol. Chem.* 275, 10190–10195.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771.
- Boulais, N., and Misery, L. (2008). The epidermis: a sensory tissue. *Eur. J. Dermatol. EJD* 18, 119–127.

- Bradley, P.J., and Hoskin, D. (2006). Hypercalcaemia in head and neck squamous cell carcinoma. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 14, 51–54.
- Branchet, M.C., Boisnic, S., Frances, C., and Robert, A.M. (1990). Skin thickness changes in normal aging skin. *Gerontology* 36, 28–35.
- Bressler, R.S., and Bressler, C.H. (1989). Functional anatomy of the skin. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 6, 229–246.
- Broadus, A.E., Mangin, M., Ikeda, K., Insogna, K.L., Weir, E.C., Burtis, W.J., and Stewart, A.F. (1988). Humoral Hypercalcemia of Cancer. *N. Engl. J. Med.* 319, 556–563.
- Brysk, M.M., Miller, J., and Walker, G.K. (1984). Characteristics of a human epidermal squamous carcinoma cell line at different extracellular calcium concentrations. *Exp. Cell Res.* 150, 329–337.
- Buitrago, C.G., Pardo, V.G., de Boland, A.R., and Boland, R. (2003). Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase Calpha mediates 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *J. Biol. Chem.* 278, 2199–2205.
- Bulliard, J.-L., Panizzon, R.G., and Levi, F. (2009). [Epidemiology of epithelial skin cancers]. *Rev. Médicale Suisse* 5, 882, 884–888.
- Burge, S.M., and Wilkinson, J.D. (1992). Darier-White disease: A review of the clinical features in 163 patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 27, 40–50.
- Cai, S., Fatherazi, S., Presland, R.B., Belton, C.M., and Izutsu, K.T. (2005). TRPC channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 40, 21–28.
- Calabrese, V., Cornelius, C., Cuzzocrea, S., Iavicoli, I., Rizzarelli, E., and Calabrese, E.J. (2011). Hormesis, cellular stress response and vitagenes as critical determinants in aging and longevity. *Mol. Aspects Med.* 32, 279–304.
- Caldeira da Silva, C.C., Cerqueira, F.M., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H.G., and Kowaltowski, A.J. (2008). Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. *Aging Cell* 7, 552–560.
- Calderwood, S.K., Murshid, A., and Prince, T. (2009a). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* 55, 550–558.
- Calderwood, S.K., Murshid, A., and Prince, T. (2009b). The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review. *Gerontology* 55, 550–558.

- Cals-Grierson, M.-M., and Ormerod, A.D. (2004). Nitric oxide function in the skin. *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.* *10*, 179–193.
- Campbell, P.M. (2014). Oncogenic Ras pushes (and pulls) cell cycle progression through ERK activation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1170*, 155–163.
- Campisi, J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* *120*, 513–522.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 729–740.
- Cao, L., Li, W., Kim, S., Brodie, S.G., and Deng, C.-X. (2003). Senescence, aging, and malignant transformation mediated by p53 in mice lacking the Brca1 full-length isoform. *Genes Dev.* *17*, 201–213.
- Carter, W.G., Wayner, E.A., Bouchard, T.S., and Kaur, P. (1990). The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrate adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* *110*, 1387–1404.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *21*, 2933–2942.
- Celetti, S.J., Cowan, K.N., Penuela, S., Shao, Q., Churko, J., and Laird, D.W. (2010). Implications of pannexin 1 and pannexin 3 for keratinocyte differentiation. *J. Cell Sci.* *123*, 1363–1372.
- Celli, A., Sanchez, S., Behne, M., Hazlett, T., Gratton, E., and Mauro, T. (2010). The Epidermal Ca<sup>2+</sup> Gradient: Measurement Using the Phasor Representation of Fluorescent Lifetime Imaging. *Biophys. J.* *98*, 911–921.
- Chan, K.T., Bennin, D.A., and Huttenlocher, A. (2010). Regulation of adhesion dynamics by calpain-mediated proteolysis of focal adhesion kinase (FAK). *J. Biol. Chem.* *285*, 11418–11426.
- Chang, A.L.S., Fu, T., Amir, O., and Tang, J.Y. (2010). Association of facial skin aging and vitamin D levels in middle-aged white women. *Cancer Causes Control CCC* *21*, 2315–2316.
- Chang, Q., Hoefs, S., Kemp, A.W. van der, Topala, C.N., Bindels, R.J., and Hoenderop, J.G. (2005). The  $\beta$ -Glucuronidase Klotho Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel. *Science* *310*, 490–493.
- Chang, W.-C., Lee, C.-H., Hirota, T., Wang, L.-F., Doi, S., Miyatake, A., Enomoto, T., Tomita, K., Sakashita, M., Yamada, T., et al. (2012). ORAI1 genetic polymorphisms associated with

the susceptibility of atopic dermatitis in Japanese and Taiwanese populations. *PLoS One* 7, e29387.

Charruyer, A., Barland, C.O., Yue, L., Wessendorf, H.B., Lu, Y., Lawrence, H.J., Mancianti, M.L., and Ghadially, R. (2009). Transit-Amplifying Cell Frequency and Cell Cycle Kinetics Are Altered in Aged Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2574–2583.

Chattopadhyay, N., Mithal, A., and Brown, E.M. (1996). The calcium-sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. *Endocr. Rev.* 17, 289–307.

Chel, V.G., Ooms, M.E., Popp-Snijders, C., Pavel, S., Schothorst, A.A., Meulemans, C.C., and Lips, P. (1998). Ultraviolet irradiation corrects vitamin D deficiency and suppresses secondary hyperparathyroidism in the elderly. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 13, 1238–1242.

Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4130–4134.

Chen, Y., and Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. *J. Cell Sci.* 124, 161–170.

Chen, Q., Olashaw, N., and Wu, J. (1995). Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase kinase activation pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 28499–28502.

Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., and Ames, B.N. (1998). Molecular analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem. J.* 332 ( Pt 1), 43–50.

Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Swaim, W., and Ambudkar, I.S. (2011). Local Ca<sup>2+</sup> entry via Orai1 regulates plasma membrane recruitment of TRPC1 and controls cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals required for specific cell functions. *PLoS Biol.* 9, e1001025.

Cheng, K.T., Ong, H.L., Liu, X., and Ambudkar, I.S. (2013). Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca<sup>2+</sup> Entry. *Curr. Top. Membr.* 71.

Cheng, X., Jin, J., Hu, L., Shen, D., Dong, X.-P., Samie, M.A., Knoff, J., Eisinger, B., Liu, M.-L., Huang, S.M., et al. (2010). TRP channel regulates EGFR signaling in hair morphogenesis and skin barrier formation. *Cell* 141, 331–343.

Chiarugi, P., and Giannoni, E. (2008). Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1352–1364.

- Cioffi, D.L., Wu, S., Chen, H., Alexeyev, M., St Croix, C.M., Pitt, B.R., Uhlig, S., and Stevens, T. (2012). Orai1 determines calcium selectivity of an endogenous TRPC heterotetramer channel. *Circ. Res.* *110*, 1435–1444.
- Clapham, D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell* *80*, 259–268.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* *426*, 517–524.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium signaling. *Cell* *131*, 1047–1058.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* *130*, 223–233.
- Colman, R.J., Anderson, R.M., Johnson, S.C., Kastman, E.K., Kosmatka, K.J., Beasley, T.M., Allison, D.B., Cruzen, C., Simmons, H.A., Kemnitz, J.W., et al. (2009). Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. *Science* *325*, 201–204.
- Conboy, I.M., and Rando, T.A. (2012). Heterochronic parabiosis for the study of the effects of aging on stem cells and their niches. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 2260–2267.
- Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L., and Rando, T.A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* *433*, 760–764.
- Contet-Audonneau, J.L., Jeanmaire, C., and Pauly, G. (1999). A histological study of human wrinkle structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *Br. J. Dermatol.* *140*, 1038–1047.
- Conti, B. (2008). Considerations on temperature, longevity and aging. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 1626–1630.
- Cook, S.J., and Lockyer, P.J. (2006). Recent advances in Ca(2+)-dependent Ras regulation and cell proliferation. *Cell Calcium* *39*, 101–112.
- Coppé, J.-P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.-Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* *6*, 2853–2868.
- Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. (2003). [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Médecine Sci. MS* *19*, 743–752.
- Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M., and Vaughan, D.M. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* *266*, C1485–C1504.
- Cory, S., and Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 647–656.

- deHart, G.W., Healy, K.E., and Jones, J.C.R. (2003). The role of alpha3beta1 integrin in determining the supramolecular organization of laminin-5 in the extracellular matrix of keratinocytes. *Exp. Cell Res.* *283*, 67–79.
- Den Dekker, E., Hoenderop, J.G.J., Nilius, B., and Bindels, R.J.M. (2003). The epithelial calcium channels, TRPV5 & TRPV6: from identification towards regulation. *Cell Calcium* *33*, 497–507.
- Denda, M., and Denda, S. (2007). Air-exposed keratinocytes exhibited intracellular calcium oscillation. *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI* *13*, 195–201.
- Denda, M., and Tsutsumi, M. (2011). Roles of transient receptor potential proteins (TRPs) in epidermal keratinocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* *704*, 847–860.
- Denda, M., Fuziwara, S., Inoue, K., Denda, S., Akamatsu, H., Tomitaka, A., and Matsunaga, K. (2001). Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *285*, 1250–1252.
- Denda, M., Nakatani, M., Ikeyama, K., Tsutsumi, M., and Denda, S. (2007a). Epidermal keratinocytes as the forefront of the sensory system. *Exp. Dermatol.* *16*, 157–161.
- Denda, M., Sokabe, T., Fukumi-Tominaga, T., and Tominaga, M. (2007b). Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 654–659.
- Denda, M., Tsutsumi, M., and Denda, S. (2010). Topical application of TRPM8 agonists accelerates skin permeability barrier recovery and reduces epidermal proliferation induced by barrier insult: role of cold-sensitive TRP receptors in epidermal permeability barrier homeostasis. *Exp. Dermatol.* *19*, 791–795.
- Denda, S., Kumamoto, J., Takei, K., Tsutsumi, M., Aoki, H., and Denda, M. (2012). Ryanodine receptors are expressed in epidermal keratinocytes and associated with keratinocyte differentiation and epidermal permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* *132*, 69–75.
- Denmeade, S.R., and Isaacs, J.T. (2005). The SERCA pump as a therapeutic target: making a “smart bomb” for prostate cancer. *Cancer Biol. Ther.* *4*, 14–22.
- Denmeade, S.R., Lin, X.S., and Isaacs, J.T. (1996). Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The Prostate* *28*, 251–265.
- Deruy, E., Gosselin, K., Vercamer, C., Martien, S., Bouali, F., Slomianny, C., Bertout, J., Bernard, D., Pourtier, A., and Abbadie, C. (2010). MnSOD upregulation induces autophagic programmed cell death in senescent keratinocytes. *PLoS One* *5*, e12712.

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9363–9367.
- Ding, S., and Sachs, F. (1999). Single Channel Properties of P2X2 Purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* *113*, 695–720.
- Ding, X., He, Z., Shi, Y., Wang, Q., and Wang, Y. (2010). Targeting TRPC6 channels in oesophageal carcinoma growth. *Expert Opin. Ther. Targets* *14*, 513–527.
- DiPersio, C.M., Hodivala-Dilke, K.M., Jaenisch, R., Kreidberg, J.A., and Hynes, R.O. (1997). alpha3beta1 Integrin is required for normal development of the epidermal basement membrane. *J. Cell Biol.* *137*, 729–742.
- Doles, J., Storer, M., Cozzuto, L., Roma, G., and Keyes, W.M. (2012). Age-associated inflammation inhibits epidermal stem cell function. *Genes Dev.* *26*, 2144–2153.
- Dolmetsch, R. (2003). Excitation-transcription coupling: signaling by ion channels to the nucleus. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2003*, PE4.
- Dolmetsch, R.E., Xu, K., and Lewis, R.S. (1998). Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* *392*, 933–936.
- Von Domarus, H., and Stevens, P.J. (1984). Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases and review of 170 cases in the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* *10*, 1043–1060.
- Donald, C.D., Cooper, C.R., Harris-Hooker, S., Emmett, N., Scanlon, M., and Cooke, D.B. (2001). Cytoskeletal organization and cell motility correlates with metastatic potential and state of differentiation in prostate cancer. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* *47*, 1033–1038.
- Dong, X.-P., Cheng, X., Mills, E., Delling, M., Wang, F., Kurz, T., and Xu, H. (2008). The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature* *455*, 992–996.
- Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T., and Kenyon, C. (1995). The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *141*, 1399–1406.
- Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H.M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* *501*, 421–425.
- Dowling, J., Yu, Q.C., and Fuchs, E. (1996). Beta4 integrin is required for hemidesmosome formation, cell adhesion and cell survival. *J. Cell Biol.* *134*, 559–572.



Dulić, V., Drullinger, L.F., Lees, E., Reed, S.I., and Stein, G.H. (1993). Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 11034–11038.

Eckhart, L., Lippens, S., Tschachler, E., and Declercq, W. (2013). Cell death by cornification. *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 3471–3480.

Edgar, D., Shabalina, I., Camara, Y., Wredenberg, A., Calvaruso, M.A., Nijtmans, L., Nedergaard, J., Cannon, B., Larsson, N.-G., and Trifunovic, A. (2009). Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab.* *10*, 131–138.

Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., et al. (2009). Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1305–1314.

Elias, P.M., Nau, P., Hanley, K., Cullander, C., Crumrine, D., Bench, G., Sideras-Haddad, E., Mauro, T., Williams, M.L., and Feingold, K.R. (1998). Formation of the epidermal calcium gradient coincides with key milestones of barrier ontogenesis in the rodent. *J. Invest. Dermatol.* *110*, 399–404.

Elkeles, A. (1957). A comparative radiological study of calcified atheroma in males and females over 50 years of age. *Lancet* *273*, 714–715.

Erler, I., Hirnet, D., Wissenbach, U., Flockerzi, V., and Niemeyer, B.A. (2004). Ca<sup>2+</sup>-selective transient receptor potential V channel architecture and function require a specific ankyrin repeat. *J. Biol. Chem.* *279*, 34456–34463.

Escoffier, C., de Rigal, J., Rochefort, A., Vasselet, R., Lévêque, J.L., and Agache, P.G. (1989). Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J. Invest. Dermatol.* *93*, 353–357.

Evans, R.J. (2009). Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors. *Eur. Biophys. J.* *38*, 319–327.

Fabbrocini, G., Kisslinger, A., Iannelli, P., Vitale, N., Procaccini, C., Sparaneo, G., Chieffi, P., Ayala, F., Mancini, F.P., and Tramontano, D. (2010). Resveratrol regulates p66Shc activation in HaCaT cells. *Exp. Dermatol.* *19*, 895–903.

Farhan, H., Wähälä, K., and Cross, H.S. (2003). Genistein inhibits vitamin D hydroxylases CYP24 and CYP27B1 expression in prostate cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *84*, 423–429.

Farwick, M., Köhler, T., Schild, J., Mentel, M., Maczkiewitz, U., Pagani, V., Bonfigli, A., Rigano, L., Bureik, D., and Gauglitz, G.G. (2014). Pentacyclic triterpenes from *Terminalia arjuna* show multiple benefits on aged and dry skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* *27*, 71–81.

- Fatherazi, S., Belton, C.M., Cai, S., Zarif, S., Goodwin, P.C., Lamont, R.J., and Izutsu, K.T. (2004). Calcium receptor message, expression and function decrease in differentiating keratinocytes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 448, 93–104.
- Fatherazi, S., Presland, R.B., Belton, C.M., Goodwin, P., Al-Qutub, M., Trbic, Z., Macdonald, G., Schubert, M.M., and Izutsu, K.T. (2007). Evidence that TRPC4 supports the calcium selective I(CRAC)-like current in human gingival keratinocytes. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 879–889.
- Fecher-Trost, C., Weissgerber, P., and Wissenbach, U. (2014). TRPV6 channels. *Handb. Exp. Pharmacol.* 222, 359–384.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* 24, 24–41.
- Filvaroff, E., Calautti, E., McCormick, F., and Dotto, G.P. (1992). Specific changes of Ras GTPase-activating protein (GAP) and a GAP-associated p62 protein during calcium-induced keratinocyte differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5319–5328.
- Filvaroff, E., Calautti, E., Reiss, M., and Dotto, G.P. (1994). Functional evidence for an extracellular calcium receptor mechanism triggering tyrosine kinase activation associated with mouse keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 269, 21735–21740.
- Fixemer, T., Remberger, K., and Bonkhoff, H. (2002). Apoptosis resistance of neuroendocrine phenotypes in prostatic adenocarcinoma. *The Prostate* 53, 118–123.
- Fixemer, T., Wissenbach, U., Flockerzi, V., and Bonkhoff, H. (2003). Expression of the Ca<sup>2+</sup>-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 22, 7858–7861.
- Flores, I., and Blasco, M.A. (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett.* 584, 3826–3830.
- Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006). Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1215–1217.
- Flourakis, M., Lehen'kyi, V., Beck, B., Raphaël, 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.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V.D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328, 321–326.

- Forslind, B., Werner-Linde, Y., Lindberg, M., and Pallon, J. (1999). Elemental analysis mirrors epidermal differentiation. *Acta Derm. Venereol.* 79, 12–17.
- Fraga, M.F., and Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* TIG 23, 413–418.
- Franza, B.R., Maruyama, K., Garrels, J.I., and Ruley, H.E. (1986). In vitro establishment is not a sufficient prerequisite for transformation by activated ras oncogenes. *Cell* 44, 409–418.
- Fridell, Y.-W.C., Hoh, M., Kréneisz, O., Hosier, S., Chang, C., Scantling, D., Mulkey, D.K., and Helfand, S.L. (2009). Increased uncoupling protein (UCP) activity in *Drosophila* insulin-producing neurons attenuates insulin signaling and extends lifespan. *Aging* 1, 699–713.
- Friedman, P.A., and Gesek, F.A. (1993). Calcium transport in renal epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 264, F181–F198.
- Frischauf, I., Schindl, R., Derler, I., Bergsmann, J., Fahrner, M., and Romanin, C. (2008). The STIM/Orai coupling machinery. *Channels Austin Tex* 2, 261–268.
- Fuchs, E. (1994). Epidermal differentiation and keratin gene expression. *Princess Takamatsu Symp.* 24, 290–302.
- Fuchs, E. (2007). Scratching the surface of skin development. *Nature* 445, 834–842.
- Fuchs, E., and Green, H. (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19, 1033–1042.
- Fuchs, E., and Green, H. (1981). Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25, 617–625.
- Funayama, R., and Ishikawa, F. (2007). Cellular senescence and chromatin structure. *Chromosoma* 116, 431–440.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156, 1099–1111.
- Fusi, C., Materazzi, S., Minocci, D., Maio, V., Oranges, T., Massi, D., and Nassini, R. (2014). Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer. *J. Invest. Dermatol.* 134, 2408–2417.
- Gache, C., Berthois, Y., Cvitkovic, E., Martin, P.M., and Saez, S. (1999). Differential regulation of normal and tumoral breast epithelial cell growth by fibroblasts and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Breast Cancer Res. Treat.* 55, 29–39.

- Gafter-Gvili, A., Sredni, B., Gal, R., Gafter, U., and Kalechman, Y. (2003). Cyclosporin A-induced hair growth in mice is associated with inhibition of calcineurin-dependent activation of NFAT in follicular keratinocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *284*, C1593–C1603.
- Galán, C., Dionisio, N., Smani, T., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2011). The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca<sup>2+</sup> channel subunits Orai1 and TRPC1. *Biochem. Pharmacol.* *82*, 400–410.
- Gallagher, J.C. (2013). Vitamin D and aging. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* *42*, 319–332.
- Gao, W., Ding, W.-X., Stolz, D.B., and Yin, X.-M. (2008). Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium. *Autophagy* *4*, 754–761.
- Gates, A.C., Bernal-Mizrachi, C., Chinault, S.L., Feng, C., Schneider, J.G., Coleman, T., Malone, J.P., Townsend, R.R., Chakravarthy, M.V., and Semenkovich, C.F. (2007). Respiratory uncoupling in skeletal muscle delays death and diminishes age-related disease. *Cell Metab.* *6*, 497–505.
- Gerasimenko, O., and Gerasimenko, J. (2004). New aspects of nuclear calcium signalling. *J. Cell Sci.* *117*, 3087–3094.
- Ghadially, R., Brown, B.E., Sequeira-Martin, S.M., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (1995a). The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest.* *95*, 2281–2290.
- Ghadially, R., Brown, B.E., Sequeira-Martin, S.M., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (1995b). The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest.* *95*, 2281–2290.
- Gonzalez, V.M., Fuertes, M.A., Alonso, C., and Perez, J.M. (2001). Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol. Pharmacol.* *59*, 657–663.
- Gordon, P.B., Holen, I., Fosse, M., Røtnes, J.S., and Seglen, P.O. (1993). Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium. *J. Biol. Chem.* *268*, 26107–26112.
- Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Oncogene-induced senescence: the bright and dark side of the response. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 816–827.
- Gosselin, K., Martien, S., Pourtier, A., Vercamer, C., Ostoich, P., Morat, L., Sabatier, L., Duprez, L., T'kint de Roodenbeke, C., Gilson, E., et al. (2009). Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res.* *69*, 7917–7925.

- Gough, A.H., and Taylor, D.L. (1993). Fluorescence anisotropy imaging microscopy maps calmodulin binding during cellular contraction and locomotion. *J. Cell Biol.* 121, 1095–1107.
- Goytain, A., Hines, R.M., and Quamme, G.A. (2008). Functional characterization of NIPA2, a selective Mg<sup>2+</sup> transporter. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 295, C944–C953.
- Van de Graaf, S.F.J., Hoenderop, J.G.J., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., and Bindels, R.J.M. (2003a). Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 22, 1478–1487.
- Van de Graaf, S.F.J., Hoenderop, J.G.J., Gkika, D., Lamers, D., Prenen, J., Rescher, U., Gerke, V., Staub, O., Nilius, B., and Bindels, R.J.M. (2003b). Functional expression of the epithelial Ca(2+) channels (TRPV5 and TRPV6) requires association of the S100A10-annexin 2 complex. *EMBO J.* 22, 1478–1487.
- Van de Graaf, S.F.J., Boullart, I., Hoenderop, J.G.J., and Bindels, R.J.M. (2004). Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> and dietary Ca<sup>2+</sup>. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90, 303–308.
- Van de Graaf, S.F.J., Chang, Q., Mensenkamp, A.R., Hoenderop, J.G.J., and Bindels, R.J.M. (2006). Direct interaction with Rab11a targets the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* 26, 303–312.
- Graham, D.M., Huang, L., Robinson, K.R., and Messerli, M.A. (2013). Epidermal keratinocyte polarity and motility require Ca<sup>2+</sup> influx through TRPV1. *J. Cell Sci.* 126, 4602–4613.
- Green, D.R., Galluzzi, L., and Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333, 1109–1112.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Grimaldi, M., Favit, A., and Alkon, D.L. (1999). cAMP-induced cytoskeleton rearrangement increases calcium transients through the enhancement of capacitative calcium entry. *J. Biol. Chem.* 274, 33557–33564.
- Grove, G.L. (1989). Physiologic changes in older skin. *Clin. Geriatr. Med.* 5, 115–125.
- Gruber, R., Koch, H., Doll, B.A., Tegtmeier, F., Einhorn, T.A., and Hollinger, J.O. (2006). Fracture healing in the elderly patient. *Exp. Gerontol.* 41, 1080–1093.
- Grubisha, O., Rafty, L.A., Takanishi, C.L., Xu, X., Tong, L., Perraud, A.-L., Scharenberg, A.M., and Denu, J.M. (2006). Metabolite of SIR2 reaction modulates TRPM2 ion channel. *J. Biol. Chem.* 281, 14057–14065.

- Guo, H., Carlson, J.A., and Slominski, A. (2012). Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp. Dermatol.* *21*, 650–654.
- Guttormsen, J., Koster, M.I., Stevens, J.R., Roop, D.R., Williams, T., and Winger, Q.A. (2008). Disruption of epidermal specific gene expression and delayed skin development in AP-2 gamma mutant mice. *Dev. Biol.* *317*, 187–195.
- Gwack, Y., Feske, S., Srikanth, S., Hogan, P.G., and Rao, A. (2007). Signalling to transcription: store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and NFAT activation in lymphocytes. *Cell Calcium* *42*, 145–156.
- Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P.G., Lamperti, E.D., Yamashita, M., Gelinas, C., Neems, D.S., Sasaki, Y., Feske, S., et al. (2008). Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5209–5222.
- Hahn, H., Wicking, C., Zaphiropoulous, P.G., Gailani, M.R., Shanley, S., Chidambaram, A., Vorechovsky, I., Holmberg, E., Uden, A.B., Gillies, S., et al. (1996). Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell* *85*, 841–851.
- Hahn, K., DeBiasio, R., and Taylor, D.L. (1992). Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature* *359*, 736–738.
- Hall, A. (2009). The cytoskeleton and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* *28*, 5–14.
- Hammarlund, K., and Sedin, G. (1979). Transepidermal water loss in newborn infants. III. Relation to gestational age. *Acta Paediatr. Scand.* *68*, 795–801.
- Hampton, R.Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 476–482.
- Han, S., and Brunet, A. (2012). Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol.* *22*, 42–49.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hannan, K.M., Sanij, E., Hein, N., Hannan, R.D., and Pearson, R.B. (2011). Signaling to the ribosome in cancer--It is more than just mTORC1. *IUBMB Life* *63*, 79–85.
- Hara-Chikuma, M., and Verkman, A.S. (2008). Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *128*, 2145–2151.
- Harpin, V.A., and Rutter, N. (1983). Barrier properties of the newborn infant's skin. *J. Pediatr.* *102*, 419–425.

- Hastings, R., Qureshi, M., Verma, R., Lacy, P.S., and Williams, B. (2004). Telomere attrition and accumulation of senescent cells in cultured human endothelial cells. *Cell Prolif.* **37**, 317–324.
- Hausmann, M.F., Winkler, D.W., O'Reilly, K.M., Huntington, C.E., Nisbet, I.C.T., and Vleck, C.M. (2003). Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proc. Biol. Sci.* **270**, 1387–1392.
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621.
- Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* **21**, 569–576.
- Helenius, A., and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364–2369.
- Hellwig, N., Albrecht, N., Harteneck, C., Schultz, G., and Schaefer, M. (2005). Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J. Cell Sci.* **118**, 917–928.
- Hennings, H., and Holbrook, K.A. (1983). Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp. Cell Res.* **143**, 127–142.
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., and Yuspa, S.H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245–254.
- Henry, J., Toulza, E., Hsu, C.-Y., Pellerin, L., Balica, S., Mazereeuw-Hautier, J., Paul, C., Serre, G., Jonca, N., and Simon, M. (2012). Update on the epidermal differentiation complex. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **17**, 1517–1532.
- Hill, J.M., De Stefani, D., Jones, A.W.E., Ruiz, A., Rizzuto, R., and Szabadkai, G. (2014). Measuring baseline Ca<sup>2+</sup> levels in subcellular compartments using genetically engineered fluorescent indicators. *Methods Enzymol.* **543**, 47–72.
- Hodivala-Dilke, K.M., DiPersio, C.M., Kreidberg, J.A., and Hynes, R.O. (1998). Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. *J. Cell Biol.* **142**, 1357–1369.
- Hoffman, A., Carpenter, H., Kahl, R., Watt, L.F., Dickson, P.W., Rostas, J.A.P., Verrills, N.M., and Skelding, K.A. (2014). Dephosphorylation of CaMKII at T253 controls the metaphase-anaphase transition. *Cell. Signal.* **26**, 748–756.

- Hofmann, T., Obukhov, A.G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397, 259–263.
- Hohl, D., Lichti, U., Breitreutz, D., Steinert, P.M., and Roop, D.R. (1991). Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *J. Invest. Dermatol.* 96, 414–418.
- Holda, J.R., and Blatter, L.A. (1997). Capacitative calcium entry is inhibited in vascular endothelial cells by disruption of cytoskeletal microfilaments. *FEBS Lett.* 403, 191–196.
- Hopkinson, S.B., Hamill, K.J., Wu, Y., Eisenberg, J.L., Hiroyasu, S., and Jones, J.C.R. (2014). Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair. *Adv. Wound Care* 3, 247–263.
- Horsley, V., Aliprantis, A.O., Polak, L., Glimcher, L.H., and Fuchs, E. (2008). NFATc1 balances quiescence and proliferation of skin stem cells. *Cell* 132, 299–310.
- Hoth, M., and Penner, R. (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353–356.
- Houtkooper, R.H., Pirinen, E., and Auwerx, J. (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 225–238.
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., et al. (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol. Cell* 25, 193–205.
- Hsieh, T., and Wu, J.M. (1997). Induction of apoptosis and altered nuclear/cytoplasmic distribution of the androgen receptor and prostate-specific antigen by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in androgen-responsive LNCaP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 539–544.
- Hsieh, T.Y., Ng, C.Y., Mallouh, C., Tazaki, H., and Wu, J.M. (1996). Regulation of growth, PSA/PAP and androgen receptor expression by 1  $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in the androgen-dependent LNCaP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 141–146.
- Huang, S.M., Lee, H., Chung, M.-K., Park, U., Yu, Y.Y., Bradshaw, H.B., Coulombe, P.A., Walker, J.M., and Caterina, M.J. (2008). Overexpressed transient receptor potential vanilloid 3 ion channels in skin keratinocytes modulate pain sensitivity via prostaglandin E2. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 13727–13737.
- Huggins, C., and Scott, W.W. (1945). Bilateral adrenalectomy in prostatic cancer. *Ann. Surg.* 122, 1031–1041.



- Hughes, J., Ward, C.J., Aspinwall, R., Butler, R., and Harris, P.C. (1999). Identification of a human homologue of the sea urchin receptor for egg jelly: a polycystic kidney disease-like protein. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 543–549.
- Huttenlocher, A., Palecek, S.P., Lu, Q., Zhang, W., Mellgren, R.L., Lauffenburger, D.A., Ginsberg, M.H., and Horwitz, A.F. (1997). Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J. Biol. Chem.* **272**, 32719–32722.
- Inagaki, M., Gonda, Y., Ando, S., Kitamura, S., Nishi, Y., and Sato, C. (1989). Regulation of assembly-disassembly of intermediate filaments in vitro. *Cell Struct. Funct.* **14**, 279–286.
- Ishida-Yamamoto, A., and Iizuka, H. (1998). Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp. Dermatol.* **7**, 1–10.
- Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.-L., Beausejour, C., Jacobs, J.J.L., Van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 389–401.
- Ito, N., Ruegg, U.T., Kudo, A., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2013). Activation of calcium signaling through Trpv1 by nNOS and peroxynitrite as a key trigger of skeletal muscle hypertrophy. *Nat. Med.* **19**, 101–106.
- Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **8**, 131–144.
- Jagadeesh, S., Kyo, S., and Banerjee, P.P. (2006). Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 2107–2115.
- Jamora, C., and Fuchs, E. (2002). Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* **4**, E101–E108.
- Jans, R., Mottram, L., Johnson, D.L., Brown, A.M., Sikkink, S., Ross, K., and Reynolds, N.J. (2013). Lysophosphatidic acid promotes cell migration through STIM1- and Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup>(i) mobilization and NFAT2 activation. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 793–802.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E., and Scadden, D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* **443**, 421–426.
- Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.-H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., et al. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* **469**, 102–106.

- Jensen, J.M., and Proksch, E. (2009). The skin's barrier. *G. Ital. Dermatol. E Venereol. Organo Uff. Soc. Ital. Dermatol. E Sifilogr.* 144, 689–700.
- Jiang, S., Chow, S.C., Nicotera, P., and Orrenius, S. (1994). Intracellular Ca<sup>2+</sup> signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp. Cell Res.* 212, 84–92.
- Johnson, R.L., Rothman, A.L., Xie, J., Goodrich, L.V., Bare, J.W., Bonifas, J.M., Quinn, A.G., Myers, R.M., Cox, D.R., Epstein, E.H., et al. (1996). Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 272, 1668–1671.
- Johnson, S.C., Rabinovitch, P.S., and Kaeberlein, M. (2013). mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature* 493, 338–345.
- Kaeberlein, M., McVey, M., and Guarente, L. (1999). The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev.* 13, 2570–2580.
- Kang, M.K., Bibb, C., Baluda, M.A., Rey, O., and Park, N.H. (2000a). In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 258, 288–297.
- Kang, M.K., Bibb, C., Baluda, M.A., Rey, O., and Park, N.H. (2000b). In vitro replication and differentiation of normal human oral keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 258, 288–297.
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol. EJD* 12, 390–399; quiz 400–401.
- Karia, P.S., Han, J., and Schmults, C.D. (2013). Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J. Am. Acad. Dermatol.* 68, 957–966.
- Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* 13, 1211–1233.
- Kawahara, T.L.A., Michishita, E., Adler, A.S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R.A., Ongaigui, K.C.L., Boxer, L.D., Chang, H.Y., et al. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell* 136, 62–74.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366, 461–464.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239–257.

- Khakh, B.S., and Alan North, R. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527–532.
- Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., and Herzog, V. (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *Eur. J. Cell Biol.* 83, 717–724.
- Kirschner, N., and Brandner, J.M. (2012). Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 158–166.
- Kirschner, N., Rosenthal, R., Furuse, M., Moll, I., Fromm, M., and Brandner, J.M. (2013). Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1161–1169.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.
- Kishibe, M., Bando, Y., Terayama, R., Namikawa, K., Takahashi, H., Hashimoto, Y., Ishida-Yamamoto, A., Jiang, Y.-P., Mitrovic, B., Perez, D., et al. (2007). Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *J. Biol. Chem.* 282, 5834–5841.
- Klass, M.R. (1983). A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. *Mech. Ageing Dev.* 22, 279–286.
- Klass, M., Nguyen, P.N., and Dechavigny, A. (1983). Age-correlated changes in the DNA template in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 22, 253–263.
- Klionsky, D.J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118, 7–18.
- Kobayashi, Y., Sanno, Y., Sakai, A., Sawabu, Y., Tsutsumi, M., Goto, M., Kitahata, H., Nakata, S., Kumamoto, J., Denda, M., et al. (2014). Mathematical modeling of calcium waves induced by mechanical stimulation in keratinocytes. *PLoS One* 9, e92650.
- Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2011). Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res. Rev.* 10, 205–215.
- Koh, E., Morimoto, S., Fukuo, K., Itoh, K., Hironaka, T., Shiraishi, T., Onishi, T., and Kumahara, Y. (1988). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation in vitro. *Life Sci.* 42, 215–223.
- Kömüves, L., Oda, Y., Tu, C.-L., Chang, W.H., Ho-Pao, C.L., Mauro, T., and Bikle, D.D. (2002). Epidermal expression of the full-length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation. *J. Cell. Physiol.* 192, 45–54.

- Kondratskyi, A., Yassine, M., Kondratska, K., Skryma, R., Slomianny, C., and Prevarskaya, N. (2013). Calcium-permeable ion channels in control of autophagy and cancer. *Front. Physiol.* *4*, 272.
- De Koninck, P., and Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca<sup>2+</sup> oscillations. *Science* *279*, 227–230.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* *114*, 1299–1307.
- Krishnan, A.V., Peehl, D.M., and Feldman, D. (2003). Inhibition of prostate cancer growth by vitamin D: Regulation of target gene expression. *J. Cell. Biochem.* *88*, 363–371.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* *87*, 99–163.
- Kroemer, G., Mariño, G., and Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol. Cell* *40*, 280–293.
- Krohn, K., Haffner, D., Hügel, U., Himmele, R., Klaus, G., Mehls, O., and Schaefer, F. (2003). 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and dihydrotestosterone interact to regulate proliferation and differentiation of epiphyseal chondrocytes. *Calcif. Tissue Int.* *73*, 400–410.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* *24*, 2463–2479.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., Hofer, T., Seo, A.Y., Sullivan, R., Jobling, W.A., et al. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* *309*, 481–484.
- Kurasawa, M., Maeda, T., Oba, A., Yamamoto, T., and Sasaki, H. (2011). Tight junction regulates epidermal calcium ion gradient and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *406*, 506–511.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohyama, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., et al. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* *390*, 45–51.
- Lam, M., Dubyak, G., Chen, L., Nuñez, G., Miesfeld, R.L., and Distelhorst, C.W. (1994). Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca<sup>2+</sup> fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 6569–6573.
- Lambert, P.A., Somers, K.D., Kohn, E.C., and Perry, R.R. (1997). Antiproliferative and antiinvasive effects of carboxyamido-triazole on breast cancer cell lines. *Surgery* *122*, 372–378; discussion 378–379.

- Lamming, D.W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M.D., Saitoh, M., Stevens, D.M., Davis, J.G., Salmon, A.B., Richardson, A., Ahima, R.S., et al. (2012). Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335, 1638–1643.
- Lang, F., Föller, 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.
- Lansdown, A.B.G. (2002). Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* 10, 271–285.
- Larsen, P.L., Albert, P.S., and Riddle, D.L. (1995). Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139, 1567–1583.
- Larson, K., Yan, S.-J., Tsurumi, A., Liu, J., Zhou, J., Gaur, K., Guo, D., Eickbush, T.H., and Li, W.X. (2012). Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet.* 8, e1002473.
- Lavker, R.M., Zheng, P.S., and Dong, G. (1986). Morphology of aged skin. *Dermatol. Clin.* 4, 379–389.
- Lebiedzinska, M., Duszynski, J., Rizzuto, R., Pinton, P., and Wieckowski, M.R. (2009). Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 486, 73–80.
- Lechler, T., and Fuchs, E. (2005). Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin. *Nature* 437, 275–280.
- Lee, J.I., Mukherjee, S., Yoon, K.-H., Dwivedi, M., and Bandyopadhyay, J. (2013). The multiple faces of calcineurin signaling in *Caenorhabditis elegans*: development, behaviour and aging. *J. Biosci.* 38, 417–431.
- Lee, J.S., Ward, W.O., Ren, H., Vallanat, B., Darlington, G.J., Han, E.-S., Laguna, J.C., DeFord, J.H., Papaconstantinou, J., Selman, C., et al. (2012). Meta-analysis of gene expression in the mouse liver reveals biomarkers associated with inflammation increased early during aging. *Mech. Ageing Dev.* 133, 467–478.
- Lee, W.K., Choi, S.W., Lee, H.R., Lee, E.J., Lee, K.H., and Kim, H.O. (2001). Purinoceptor-mediated calcium mobilization and proliferation in HaCaT keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 25, 97–105.
- Lee, Y.M., Kim, Y.K., and Chung, J.H. (2009). Increased expression of TRPV1 channel in intrinsically aged and photoaged human skin in vivo. *Exp. Dermatol.* 18, 431–436.

Lefèvre, C., Bouadjar, B., Karaduman, A., Jobard, F., Saker, S., Özguc, M., Lathrop, M., Prud'homme, J.-F., and Fischer, J. (2004). Mutations in *ichthyin* a new gene on chromosome 5q33 in a new form of autosomal recessive congenital ichthyosis. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 2473–2482.

Lehen'kyi, V., Beck, B., Polakowska, R., Charveron, M., Bordat, P., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007a). TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 22582–22591.

Lehen'kyi, V., Beck, B., Polakowska, R., Charveron, M., Bordat, P., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007b). TRPV6 is a Ca<sup>2+</sup> entry channel essential for Ca<sup>2+</sup>-induced differentiation of human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *282*, 22582–22591.

Lehen'kyi, V., Flourakis, M., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2007c). TRPV6 channel controls prostate cancer cell proliferation via Ca(2+)/NFAT-dependent pathways. *Oncogene* *26*, 7380–7385.

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

Lehen'kyi, V., Vandenberghe, M., Belaubre, F., Julié, S., Castex-Rizzi, N., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2011b). Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *25 Suppl 1*, 12–18.

Lehen'kyi, V., Vandenberghe, M., Belaubre, F., Julié, S., Castex-Rizzi, N., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2011c). Acceleration of keratinocyte differentiation by transient receptor potential vanilloid (TRPV6) channel activation. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *25 Suppl 1*, 12–18.

Lehen'kyi, V., Shapovalov, G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2011d). Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *301*, C1281–C1289.

Lehen'kyi, V., Shapovalov, G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2011e). Ion channels and transporters in cancer. 5. Ion channels in control of cancer and cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *301*, C1281–C1289.

Lehmann, B., Genehr, T., Knuschke, P., Pietzsch, J., and Meurer, M. (2001). UVB-induced conversion of 7-dehydrocholesterol to 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 in an in vitro human skin equivalent model. *J. Invest. Dermatol.* *117*, 1179–1185.

Leinonen, P.T., Hägg, P.M., Peltonen, S., Jouhilahti, E.-M., Melkko, J., Korkiamäki, T., Oikarinen, A., and Peltonen, J. (2009). Reevaluation of the normal epidermal calcium

gradient, and analysis of calcium levels and ATP receptors in Hailey-Hailey and Darier epidermis. *J. Invest. Dermatol.* *129*, 1379–1387.

Leuner, K., Kraus, M., Woelfle, U., Beschmann, H., Harteneck, C., Boehncke, W.-H., Schempp, C.M., and Müller, W.E. (2011). Reduced TRPC channel expression in psoriatic keratinocytes is associated with impaired differentiation and enhanced proliferation. *PLoS One* *6*, e14716.

Levakov, A., Vucković, N., Dolai, M., Kačanski, M.M., and Bozanić, S. (2012). Age-related skin changes. *Med. Pregl.* *65*, 191–195.

Leveque, J.L., Corcuff, P., de Rigal, J., and Agache, P. (1984). In vivo studies of the evolution of physical properties of the human skin with age. *Int. J. Dermatol.* *23*, 322–329.

Li, L., Tucker, R.W., Hennings, H., and Yuspa, S.H. (1995). Inhibitors of the intracellular Ca(2+)-ATPase in cultured mouse keratinocytes reveal components of terminal differentiation that are regulated by distinct intracellular Ca<sup>2+</sup> compartments. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *6*, 1171–1184.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.

Li, W.H., Lee, Y.M., Kim, J.Y., Kang, S., Kim, S., Kim, K.H., Park, C.-H., and Chung, J.H. (2007). Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heat-shock-induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *127*, 2328–2335.

Liao, C.-H., Hsiao, Y.-M., Sheu, G.-T., Chang, J.T., Wang, P.-H., Wu, M.-F., Shieh, G.-J., Hsu, C.-P., and Ko, J.-L. (2007). Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase and calcium signaling in repression of telomerase activity in human lung cancer cells by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Biochem. Pharmacol.* *74*, 1541–1554.

Liao, Y.-H., Chen, S.-Y., Chou, S.-Y., Wang, P.-H., Tsai, M.-R., and Sun, C.-K. (2013). Determination of chronological aging parameters in epidermal keratinocytes by in vivo harmonic generation microscopy. *Biomed. Opt. Express* *4*, 77–88.

Lin, Z., Chen, Q., Lee, M., Cao, X., Zhang, J., Ma, D., Chen, L., Hu, X., Wang, H., Wang, X., et al. (2012). Exome sequencing reveals mutations in TRPV3 as a cause of Olmsted syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 558–564.

Lipskaia, L., and Lompré, A.-M. (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca<sup>2+</sup> signaling and control of growth and proliferation. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *96*, 55–68.

- Liu, K.-C., Huang, Y.-T., Wu, P.-P., Ji, B.-C., Yang, J.-S., Yang, J.-L., Chiu, T.-H., Chueh, F.-S., and Chung, J.-G. (2011). The roles of AIF and Endo G in the apoptotic effects of benzyl isothiocyanate on DU 145 human prostate cancer cells via the mitochondrial signaling pathway. *Int. J. Oncol.* *38*, 787–796.
- Liu, L.H., Boivin, G.P., Prasad, V., Periasamy, M., and Shull, G.E. (2001). Squamous Cell Tumors in Mice Heterozygous for a Null Allele of *Atp2a2*, Encoding the Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoform 2 Ca<sup>2+</sup>Pump. *J. Biol. Chem.* *276*, 26737–26740.
- Lo, C.-Y., Tjong, Y.-W., Ho, J.C.-Y., Siu, C.-W., Cheung, S.-Y., Tang, N.L., Yu, S., Tse, H.-F., and Yao, X. (2014). An upregulation in the expression of vanilloid transient potential channels 2 enhances hypotonicity-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> rise in human induced pluripotent stem cell model of Hutchinson-Gillford Progeria. *PLoS One* *9*, e87273.
- Lo, J.S., Snow, S.N., Reizner, G.T., Mohs, F.E., Larson, P.O., and Hruza, G.J. (1991). Metastatic basal cell carcinoma: report of twelve cases with a review of the literature. *J. Am. Acad. Dermatol.* *24*, 715–719.
- Lonsdale-Eccles, J.D., Resing, K.A., Meek, R.L., and Dale, B.A. (1984). High-molecular-weight precursor of epidermal filaggrin and hypothesis for its tandem repeating structure. *Biochemistry (Mosc.)* *23*, 1239–1245.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* *153*, 1194–1217.
- Lorch, G., Viatchenko-Karpinski, S., Ho, H.-T., Dirksen, W.P., Toribio, R.E., Foley, J., Györke, S., and Rosol, T.J. (2011). The calcium-sensing receptor is necessary for the rapid development of hypercalcemia in human lung squamous cell carcinoma. *Neoplasia N. Y. N* *13*, 428–438.
- Lowry, D.T., Li, L., and Hennings, H. (1996). Thapsigargin, a weak skin tumor promoter, alters the growth and differentiation of mouse keratinocytes in culture. *Carcinogenesis* *17*, 699–706.
- Lu, T., and Finkel, T. (2008). Free radicals and senescence. *Exp. Cell Res.* *314*, 1918–1922.
- Lu, S., Slominski, A., Yang, S.-E., Sheehan, C., Ross, J., and Carlson, J.A. (2010). The correlation of TRPM1 (Melastatin) mRNA expression with microphthalmia-associated transcription factor (MITF) and other melanogenesis-related proteins in normal and pathological skin, hair follicles and melanocytic nevi. *J. Cutan. Pathol.* *37 Suppl 1*, 26–40.
- Lue, N.F. (1999). Sequence-specific and conformation-dependent binding of yeast telomerase RNA to single-stranded telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* *27*, 2560–2567.
- Lumpkin, E.A., and Caterina, M.J. (2007). Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* *445*, 858–865.



- Lundström, A., Serre, G., Haftek, M., and Egelrud, T. (1994). Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in stratum corneum cell cohesion and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 369–375.
- Luo, J., Stewart, R., Berdeaux, R., and Hu, H. (2012). Tonic inhibition of TRPV3 by Mg<sup>2+</sup> in mouse epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2158–2165.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481–490.
- Madison, K.C. (2003). Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231–241.
- Madison, K.C., Sando, G.N., Howard, E.J., True, C.A., Gilbert, D., Swartzendruber, D.C., and Wertz, P.W. (1998). Lamellar granule biogenesis: a role for ceramide glucosyltransferase, lysosomal enzyme transport, and the Golgi. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. Soc. Investig. Dermatol. Inc Eur. Soc. Dermatol. Res.* 3, 80–86.
- De Magalhães, J.P., Curado, J., and Church, G.M. (2009). Meta-analysis of age-related gene expression profiles identifies common signatures of aging. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 875–881.
- Mair, W., Morantte, I., Rodrigues, A.P.C., Manning, G., Montminy, M., Shaw, R.J., and Dillin, A. (2011). Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature* 470, 404–408.
- Mammone, T., Marenus, K., Maes, D., and Lockshin, R.A. (1998). The induction of terminal differentiation markers by the cAMP pathway in human HaCaT keratinocytes. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 11, 152–160.
- Mammucari, C., Tommasi di Vignano, A., Sharov, A.A., Neilson, J., Havrda, M.C., Roop, D.R., Botchkarev, V.A., Crabtree, G.R., and Dotto, G.P. (2005). Integration of Notch 1 and calcineurin/NFAT signaling pathways in keratinocyte growth and differentiation control. *Dev. Cell* 8, 665–676.
- Mandadi, S., Sokabe, T., Shibasaki, K., Katanosaka, K., Mizuno, A., Moqrich, A., Patapoutian, A., Fukumi-Tominaga, T., Mizumura, K., and Tominaga, M. (2009). TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 458, 1093–1102.
- Manya, H., Akasaka-Manya, K., and Endo, T. (2010). Klotho protein deficiency and aging. *Geriatr. Gerontol. Int.* 10 Suppl 1, S80–S87.

- Marcoux, D., Jafarian, F., Joncas, V., Buteau, C., Kokta, V., and Moghrabi, A. (2009). Deep cutaneous fungal infections in immunocompromised children. *J. Am. Acad. Dermatol.* *61*, 857–864.
- Margadant, C., Raymond, K., Kreft, M., Sachs, N., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2009). Integrin alpha3beta1 inhibits directional migration and wound re-epithelialization in the skin. *J. Cell Sci.* *122*, 278–288.
- Margadant, C., Charafeddine, R.A., and Sonnenberg, A. (2010). Unique and redundant functions of integrins in the epidermis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *24*, 4133–4152.
- Marionnet, A.V., Chardonnet, Y., Viac, J., and Schmitt, D. (1997). Differences in responses of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha production and secretion to cyclosporin-A and ultraviolet B-irradiation by normal and transformed keratinocyte cultures. *Exp. Dermatol.* *6*, 22–28.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* *276*, 75–81.
- Martin, J.L., and Pattison, S.L. (2000). Insulin-like growth factor binding protein-3 is regulated by dihydrotestosterone and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in LNCaP prostate carcinoma cells. *Endocrinology* *141*, 2401–2409.
- Martin, N., Salazar-Cardozo, C., Vercamer, C., Ott, L., Marot, G., Slijepcevic, P., Abbadie, C., and Pluquet, O. (2014). Identification of a gene signature of a pre-transformation process by senescence evasion in normal human epidermal keratinocytes. *Mol. Cancer* *13*, 151.
- Martin, R.C., Edwards, M.J., Cawte, T.G., Sewell, C.L., and McMasters, K.M. (2000). Basosquamous carcinoma: analysis of prognostic factors influencing recurrence. *Cancer* *88*, 1365–1369.
- Martini, A., Battaini, F., Govoni, S., and Volpe, P. (1994). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and ryanodine receptor in the aging brain of Wistar rats. *Neurobiol. Aging* *15*, 203–206.
- Maruyama, Y., Ogura, T., Mio, K., Kato, K., Kaneko, T., Kiyonaka, S., Mori, Y., and Sato, C. (2009). Tetrameric Orai1 is a teardrop-shaped molecule with a long, tapered cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 13676–13685.
- Matsudaira, P., Jakes, R., and Walker, J.E. (1985). A gelsolin-like Ca<sup>2+</sup>-dependent actin-binding domain in villin. *Nature* *315*, 248–250.
- Matsumoto, M., Kurihara, S., Kibe, R., Ashida, H., and Benno, Y. (2011). Longevity in mice is promoted by probiotic-induced suppression of colonic senescence dependent on upregulation of gut bacterial polyamine production. *PloS One* *6*, e23652.

- Mattison, J.A., Roth, G.S., Beasley, T.M., Tilmont, E.M., Handy, A.M., Herbert, R.L., Longo, D.L., Allison, D.B., Young, J.E., Bryant, M., et al. (2012). Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* **489**, 318–321.
- Matz, R.L., Sotomayor, M.A. de, Schott, C., and Andriantsitohaina, R. (2003). Preservation of vascular contraction during ageing: dual effect on calcium handling and sensitization. *Br. J. Pharmacol.* **138**, 745–750.
- Mauro, T., Bench, G., Sidderas-Haddad, E., Feingold, K., Elias, P., and Cullander, C. (1998). Acute barrier perturbation abolishes the Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> gradients in murine epidermis: quantitative measurement using PIXE. *J. Invest. Dermatol.* **111**, 1198–1201.
- Mauro, T.M., Pappone, P.A., and Isseroff, R.R. (1990). Extracellular calcium affects the membrane currents of cultured human keratinocytes. *J. Cell. Physiol.* **143**, 13–20.
- Mauro, T.M., Isseroff, R.R., Lasarow, R., and Pappone, P.A. (1993). Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *J. Membr. Biol.* **132**, 201–209.
- McGough, A., Chiu, W., and Way, M. (1998). Determination of the gelsolin binding site on F-actin: implications for severing and capping. *Biophys. J.* **74**, 764–772.
- Mélissopoulos, A., Levacher, C., and Ballotti, R. (2012). *La peau : Structure et physiologie* (Paris: Tec & Doc Lavoisier).
- Mengel, B., Hunziker, A., Pedersen, L., Trusina, A., Jensen, M.H., and Krishna, S. (2010). Modeling oscillatory control in NF- $\kappa$ B, p53 and Wnt signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 656–664.
- Menon, G.K., Grayson, S., and Elias, P.M. (1985). Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J. Invest. Dermatol.* **84**, 508–512.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642.
- Michelangeli, F., Ogunbayo, O.A., and Wootton, L.L. (2005). A plethora of interacting organellar Ca<sup>2+</sup> stores. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 135–140.
- Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P.G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* **402**, 309–313.
- Mikoshiba, K. (2007). The IP<sub>3</sub> receptor/Ca<sup>2+</sup> channel and its cellular function. *Biochem. Soc. Symp.* **9–22**.

- Min, J.-N., Whaley, R.A., Sharpless, N.E., Lockyer, P., Portbury, A.L., and Patterson, C. (2008). CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 4018–4025.
- Minisola, S. (2012). Primary hyperparathyroidism is one of the three most frequent endocrine disorders, typically diagnosed in the years following menopause and with advancing age. *J. Endocrinol. Invest.* *35*, 1.
- Mischke, D., Korge, B.P., Marenholz, I., Volz, A., and Ziegler, A. (1996). Genes Encoding Structural Proteins of Epidermal Cornification and S100 Calcium-Binding Proteins Form a Gene Complex (“Epidermal Differentiation Complex”) on Human Chromosome 1q21. *J. Invest. Dermatol.* *106*, 989–992.
- Missiaen, L., Robberecht, W., van den Bosch, L., Callewaert, G., Parys, J.B., Wuytack, F., Raeymaekers, L., Nilius, B., Eggermont, J., and De Smedt, H. (2000). Abnormal intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis and disease. *Cell Calcium* *28*, 1–21.
- Mitchell, K.J., Pinton, P., Varadi, A., Tacchetti, C., Ainscow, E.K., Pozzan, T., Rizzuto, R., and Rutter, G.A. (2001). Dense core secretory vesicles revealed as a dynamic  $Ca^{2+}$  store in neuroendocrine cells with a vesicle-associated membrane protein aequorin chimaera. *J. Cell Biol.* *155*, 41–51.
- Miyamoto, T., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2011). TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. *Nat. Commun.* *2*, 369.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- Molofsky, A.V., Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* *443*, 448–452.
- Montesanto, A., Crocco, P., Tallaro, F., Pisani, F., Mazzei, B., Mari, V., Corsonello, A., Lattanzio, F., Passarino, G., and Rose, G. (2013). Common polymorphisms in nitric oxide synthase (NOS) genes influence quality of aging and longevity in humans. *Biogerontology* *14*, 177–186.
- Mookerjee, S.A., Divakaruni, A.S., Jastroch, M., and Brand, M.D. (2010). Mitochondrial uncoupling and lifespan. *Mech. Ageing Dev.* *131*, 463–472.
- Moore, C., Cevikbas, F., Pasolli, H.A., Chen, Y., Kong, W., Kempkes, C., Parekh, P., Lee, S.H., Kontchou, N.-A., Yeh, I., et al. (2013). UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E3225–E3234.

- Moqrich, A., Hwang, S.W., Earley, T.J., Petrus, M.J., Murray, A.N., Spencer, K.S.R., Andahazy, M., Story, G.M., and Patapoutian, A. (2005). Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin. *Science* 307, 1468–1472.
- Morel-Huaux, V.M., Pypaert, M., Wouters, S., Tartakoff, A.M., Jurgan, U., Gevaert, K., and Courtoy, P.J. (2002). The calcium-binding protein p54/NEFA is a novel luminal resident of medial Golgi cisternae that traffics independently of mannosidase II. *Eur. J. Cell Biol.* 81, 87–100.
- Moreno, H., Burghardt, N.S., Vela-Duarte, D., Masciotti, J., Hua, F., Fenton, A.A., Schwaller, B., and Small, S.A. (2012). The absence of the calcium-buffering protein calbindin is associated with faster age-related decline in hippocampal metabolism. *Hippocampus* 22, 1107–1120.
- Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., and Tanguay, R.M. (2004). Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 18, 598–599.
- Moskalev, A.A., Shaposhnikov, M.V., Plyusnina, E.N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., and Fraifeld, V.E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res. Rev.* 12, 661–684.
- Moy, G.W., Mendoza, L.M., Schulz, J.R., Swanson, W.J., Glabe, C.G., and Vacquier, V.D. (1996). The sea urchin sperm receptor for egg jelly is a modular protein with extensive homology to the human polycystic kidney disease protein, PKD1. *J. Cell Biol.* 133, 809–817.
- Mukhopadhyay, S., Munshi, H.G., Kambhampati, S., Sassano, A., Platanias, L.C., and Stack, M.S. (2004). Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* 279, 33139–33146.
- Müller, M., Essin, K., Hill, K., Beschmann, H., Rubant, S., Schempp, C.M., Gollasch, M., Boehncke, W.H., Harteneck, C., Müller, W.E., et al. (2008). Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 283, 33942–33954.
- Murgia, M., Giorgi, C., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2009). Controlling metabolism and cell death: At the heart of mitochondrial calcium signalling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 781–788.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273, 2926–2930.
- Naidoo, N. (2009). ER and aging—Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res. Rev.* 8, 150–159.

- Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J. Cell Biol.* *150*, 887–894.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* *113*, 703–716.
- Nawrocki, S.T., Carew, J.S., Dunner, K., Boise, L.H., Chiao, P.J., Huang, P., Abbruzzese, J.L., and McConkey, D.J. (2005). Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* *65*, 11510–11519.
- Nemes, Z., and Steinert, P.M. (1999). Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* *31*, 5–19.
- Ng, S.W., di Capite, J., Singaravelu, K., and Parekh, A.B. (2008). Sustained activation of the tyrosine kinase Syk by antigen in mast cells requires local Ca<sup>2+</sup> influx through Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* *283*, 31348–31355.
- Nicke, A., Bäumer, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* *17*, 3016–3028.
- Nicolae, I., and Schipor, S. (2010). PTH-independent hypercalcaemia and non-melanoma skin cancer. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* *24*, 449–452.
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G.J., van der Kemp, A.W.C.M., and Bindels, R.J.M. (2003). Localization and regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel TRPV6 in the kidney. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *14*, 2731–2740.
- Nijenhuis, T., Hoenderop, J.G.J., and Bindels, R.J.M. (2005). TRPV5 and TRPV6 in Ca(2+) (re)absorption: regulating Ca(2+) entry at the gate. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *451*, 181–192.
- Nilius, B., and Bíró, T. (2013). TRPV3: a “more than skinny” channel. *Exp. Dermatol.* *22*, 447–452.
- Norberg, E., Gogvadze, V., Ott, M., Horn, M., Uhlén, P., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2008). An increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> is required for the activation of mitochondrial calpain to release AIF during cell death. *Cell Death Differ.* *15*, 1857–1864.
- Numaga-Tomita, T., and Putney, J.W. (2013). Role of STIM1- and Orai1-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in Ca<sup>2+</sup>-induced epidermal keratinocyte differentiation. *J. Cell Sci.* *126*, 605–612.
- Oda, Y., Tu, C.L., Pillai, S., and Bikle, D.D. (1998). The calcium sensing receptor and its alternatively spliced form in keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* *273*, 23344–23352.

Oehler, B., Scholze, A., Schaefer, M., and Hill, K. (2012). TRPA1 is functionally expressed in melanoma cells but is not critical for impaired proliferation caused by allyl isothiocyanate or cinnamaldehyde. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **385**, 555–563.

Oh, J.-E., Park, K.-H., Noh, H.K., Kim, J.-M., Chung, C.-P., and Min, B.-M. (2002). Decreased expression of alpha3 and beta1 integrin subunits is responsible for differentiation-associated changes in cells behavior in terminally differentiated human oral keratinocytes. *Cell Commun. Adhes.* **9**, 173–187.

Okunade, G.W., Miller, M.L., Azhar, M., Andringa, A., Sanford, L.P., Doetschman, T., Prasad, V., and Shull, G.E. (2007). Loss of the Atp2c1 secretory pathway Ca(2+)-ATPase (SPCA1) in mice causes Golgi stress, apoptosis, and midgestational death in homozygous embryos and squamous cell tumors in adult heterozygotes. *J. Biol. Chem.* **282**, 26517–26527.

Ong, D.S.T., Mu, T.-W., Palmer, A.E., and Kelly, J.W. (2010). Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> increases enhance mutant glucocerebrosidase proteostasis. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 424–432.

Onken, B., and Driscoll, M. (2010). Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* **5**, e8758.

Orloff, J.J., Ganz, M.B., Nathanson, M.H., Moyer, M.S., Kats, Y., Mitnick, M., Behal, A., Gasalla-Herraiz, J., and Isales, C.M. (1996). A midregion parathyroid hormone-related peptide mobilizes cytosolic calcium and stimulates formation of inositol trisphosphate in a squamous carcinoma cell line. *Endocrinology* **137**, 5376–5385.

Ormerod, A.D., Weller, R., Copeland, P., Benjamin, N., Ralston, S.H., Grabowksi, P., and Herriot, R. (1998). Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **290**, 3–8.

Oro, A.E. (2008). A new role for an old friend: NFAT and stem cell quiescence. *Cell Stem Cell* **2**, 104–106.

Ortonne, J.P. (1990). Pigmentary changes of the ageing skin. *Br. J. Dermatol.* **122 Suppl 35**, 21–28.

Van Otterloo, E., Li, W., Bonde, G., Day, K.M., Hsu, M.-Y., and Cornell, R.A. (2010). Differentiation of zebrafish melanophores depends on transcription factors AP2 alpha and AP2 epsilon. *PLoS Genet.* **6**, e1001122.

Ottolini, D., Cali, T., and Brini, M. (2014). Methods to measure intracellular Ca(2+) fluxes with organelle-targeted aequorin-based probes. *Methods Enzymol.* **543**, 21–45.

Ouchi, H., Ishiguro, H., Ikeda, N., Hori, M., Kubota, Y., and Uemura, H. (2005). Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* **12**, 73–80.

- Pande, G., Kumar, N.A., and Manogaran, P.S. (1996). Flow cytometric study of changes in the intracellular free calcium during the cell cycle. *Cytometry* 24, 55–63.
- Pani, B., Cornatzer, E., Cornatzer, W., Shin, D.-M., Pittelkow, M.R., Hovnanian, A., Ambudkar, I.S., and Singh, B.B. (2006a). Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. *Mol. Biol. Cell* 17, 4446–4458.
- Pani, B., Cornatzer, E., Cornatzer, W., Shin, D.-M., Pittelkow, M.R., Hovnanian, A., Ambudkar, I.S., and Singh, B.B. (2006b). Up-regulation of transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) following sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase 2 gene silencing promotes cell survival: a potential role for TRPC1 in Darier's disease. *Mol. Biol. Cell* 17, 4446–4458.
- Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 408–417.
- Parekh, A.B., and Putney, J.W. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810.
- Park, D.C., and Yeo, S.G. (2013). Aging. *Korean J. Audiol.* 17, 39–44.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5, 741–747.
- Parys, J.B., Decuypere, J.-P., and Bultynck, G. (2012). Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup>-release channel in autophagy. *Cell Commun. Signal. CCS* 10, 17.
- Passeron, T., and Ortonne, J.-P. (2003). [Skin ageing and its prevention]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 32, 1474–1482.
- Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* 6, 347.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., and Gill, D.L. (1999). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: evidence for a secretion-like coupling model. *Cell* 98, 487–499.
- Pauliny, A., Larsson, K., and Blomqvist, D. (2012). Telomere dynamics in a long-lived bird, the barnacle goose. *BMC Evol. Biol.* 12, 257.



- Payre, F., Vincent, A., and Carreno, S. (1999). *ovo/svb* integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation. *Nature* 400, 271–275.
- Peier, A.M., Moqrich, A., Hergarden, A.C., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Story, G.M., Earley, T.J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., et al. (2002a). A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell* 108, 705–715.
- Peier, A.M., Reeve, A.J., Andersson, D.A., Moqrich, A., Earley, T.J., Hergarden, A.C., Story, G.M., Colley, S., Hogenesch, J.B., McIntyre, P., et al. (2002b). A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science* 296, 2046–2049.
- Peinelt, C., Vig, M., Koomoa, D.L., Beck, A., Nadler, M.J.S., Koblan-Huberson, M., Lis, A., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J.-P. (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat. Cell Biol.* 8, 771–773.
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Vassilev, P.M., Tsukaguchi, H., Brown, E.M., and Hediger, M.A. (1999). Molecular cloning and characterization of a channel-like transporter mediating intestinal calcium absorption. *J. Biol. Chem.* 274, 22739–22746.
- Peng, J.B., Chen, X.Z., Berger, U.V., Weremowicz, S., Morton, C.C., Vassilev, P.M., Brown, E.M., and Hediger, M.A. (2000). Human calcium transport protein CaT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 326–332.
- Peng, J.B., Zhuang, L., Berger, U.V., Adam, R.M., Williams, B.J., Brown, E.M., Hediger, M.A., and Freeman, M.R. (2001). CaT1 expression correlates with tumor grade in prostate cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 729–734.
- Penuela, S., Bhalla, R., Gong, X.-Q., Cowan, K.N., Celetti, S.J., Cowan, B.J., Bai, D., Shao, Q., and Laird, D.W. (2007). Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J. Cell Sci.* 120, 3772–3783.
- Peters, A.A., Simpson, P.T., Bassett, J.J., Lee, J.M., Da Silva, L., Reid, L.E., Song, S., Parat, M.-O., Lakhani, S.R., Kenny, P.A., et al. (2012). Calcium channel TRPV6 as a potential therapeutic target in estrogen receptor-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 11, 2158–2168.
- Piccinni, E., Di Zenzo, G., Maurelli, R., Dellambra, E., Teson, M., Has, C., Zambruno, G., and Castiglia, D. (2013). Induction of senescence pathways in Kindler syndrome primary keratinocytes. *Br. J. Dermatol.* 168, 1019–1026.
- Pillai, S., Bikle, D.D., Mancianti, M.L., and Hincenbergs, M. (1991). Uncoupling of the calcium-sensing mechanism and differentiation in squamous carcinoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 192, 567–573.

- Pinton, P., and Rizzuto, R. (2006). Bcl-2 and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* *13*, 1409–1418.
- Pinton, P., Pozzan, T., and Rizzuto, R. (1998). The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca<sup>2+</sup> store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* *17*, 5298–5308.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., and Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca<sup>2+</sup> transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* *27*, 6407–6418.
- Piper, M.D.W., Partridge, L., Raubenheimer, D., and Simpson, S.J. (2011). Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab.* *14*, 154–160.
- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., and Pozzan, T. (2011). Ca(2+) signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* *50*, 184–192.
- Pont, A.R., Sadri, N., Hsiao, S.J., Smith, S., and Schneider, R.J. (2012). mRNA decay factor AUF1 maintains normal aging, telomere maintenance, and suppression of senescence by activation of telomerase transcription. *Mol. Cell* *47*, 5–15.
- Popa, C., Dahler, A.L., Serewko-Auret, M.M., Wong, C.F., Smith, L., Barnes, L.M., Strutton, G.M., and Saunders, N.A. (2004). AP-2 transcription factor family member expression, activity, and regulation in human epidermal keratinocytes in vitro. *Differ. Res. Biol. Divers.* *72*, 185–197.
- Popp, T., Steinritz, D., Breit, A., Deppe, J., Egea, V., Schmidt, A., Gudermann, T., Weber, C., and Ries, C. (2014). Wnt5a/β-Catenin Signaling Drives Calcium-Induced Differentiation of Human Primary Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 2183–2191.
- Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Singer, H.A., and Trebak, M. (2009). Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 2425–2437.
- Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W., and Balch, W.E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu. Rev. Biochem.* *78*, 959–991.
- Praitis, V., Simske, J., Kniss, S., Mandt, R., Imlay, L., Feddersen, C., Miller, M.B., Mushi, J., Liszewski, W., Weinstein, R., et al. (2013). The secretory pathway calcium ATPase PMR-1/SPCA1 has essential roles in cell migration during *Caenorhabditis elegans* embryonic development. *PLoS Genet.* *9*, e1003506.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* *443*, 230–233.

- Prasad, V., Okunade, G.W., Miller, M.L., and Shull, G.E. (2004). Phenotypes of SERCA and PMCA knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1192–1203.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2004). Ca<sup>2+</sup> homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1326–1335.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol. Med.* 16, 107–121.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. (2011). Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nat. Rev. Cancer* 11, 609–618.
- Prostko, C.R., Brostrom, M.A., and Brostrom, C.O. (1993). Reversible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 alpha in response to endoplasmic reticular signaling. *Mol. Cell. Biochem.* 127-128, 255–265.
- Putney, J.W. (2011). Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 3, 980–984.
- Putney, J.W. (2012). Calcium signaling: deciphering the calcium-NFAT pathway. *Curr. Biol. CB* 22, R87–R89.
- Quamme, G.A. (2010). Molecular identification of ancient and modern mammalian magnesium transporters. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 298, C407–C429.
- Van Raamsdonk, J.M., and Hekimi, S. (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5, e1000361.
- Radtko, C., Sinis, N., Sauter, M., Jahn, S., Kraushaar, U., Guenther, E., Rodemann, H.P., and Rennekampff, H.-O. (2011). TRPV channel expression in human skin and possible role in thermally induced cell death. *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.* 32, 150–159.
- Raffaello, A., and Rizzuto, R. (2011). Mitochondrial longevity pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 260–268.
- Raiko, L., Siljamäki, E., Mahoney, M.G., Putaala, H., Suominen, E., Peltonen, J., and Peltonen, S. (2012). Hailey-Hailey disease and tight junctions: Claudins 1 and 4 are regulated by ATP2C1 gene encoding Ca(2+) /Mn(2+) ATPase SPCA1 in cultured keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 21, 586–591.
- Ramsey, J.J., Tran, D., Giorgio, M., Griffey, S.M., Koehne, A., Laing, S.T., Taylor, S.L., Kim, K., Cortopassi, G.A., Lloyd, K.C.K., et al. (2014). The influence of Shc proteins on life span in mice. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 69, 1177–1185.
- Rando, T.A., and Chang, H.Y. (2012). Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* 148, 46–57.

- Rao, Y.K., Kao, T.-Y., Wu, M.-F., Ko, J.-L., and Tzeng, Y.-M. (2010). Identification of small molecule inhibitors of telomerase activity through transcriptional regulation of hTERT and calcium induction pathway in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Bioorg. Med. Chem.* *18*, 6987–6994.
- Rashid, S.F., Mountford, J.C., Gombart, A.F., and Campbell, M.J. (2001). 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3) displays divergent growth effects in both normal and malignant cells. *Steroids* *66*, 433–440.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., et al. (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* *90*, 1383–1435.
- Rera, M., Bahadorani, S., Cho, J., Koehler, C.L., Ulgherait, M., Hur, J.H., Ansari, W.S., Lo, T., Jones, D.L., and Walker, D.W. (2011). Modulation of longevity and tissue homeostasis by the *Drosophila* PGC-1 homolog. *Cell Metab.* *14*, 623–634.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Dürr, P., and Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* *5*, 379–389.
- Rice, R.H., and Green, H. (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell* *11*, 417–422.
- Rice, R.H., and Green, H. (1978). Relation of protein synthesis and transglutaminase activity to formation of the cross-linked envelope during terminal differentiation of the cultured human epidermal keratinocyte. *J. Cell Biol.* *76*, 705–711.
- Rice, R.H., and Green, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* *18*, 681–694.
- Rivier, M., Safonova, I., Lebrun, P., Griffiths, C.E., Ailhaud, G., and Michel, S. (1998). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes during the differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 1116–1121.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* *86*, 369–408.
- Rizzuto, R., Bastianutto, C., Brini, M., Murgia, M., and Pozzan, T. (1994). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in intact cells. *J. Cell Biol.* *126*, 1183–1194.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Ferrari, D., Chami, M., Szabadkai, G., Magalhães, P.J., Di Virgilio, F., and Pozzan, T. (2003). Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. *Oncogene* *22*, 8619–8627.

- Robert, L., Labat-Robert, J., and Robert, A.-M. (2009). Physiology of skin aging. *Pathol. Biol. (Paris)* *57*, 336–341.
- Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* *26*, 3291–3310.
- Roderick, H.L., and Cook, S.J. (2008). Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 361–375.
- Rodier, F., and Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* *192*, 547–556.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 973–979.
- Rogina, B., and Helfand, S.L. (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15998–16003.
- Rosado, J.A., Graves, D., and Sage, S.O. (2000). Tyrosine kinases activate store-mediated Ca<sup>2+</sup> entry in human platelets through the reorganization of the actin cytoskeleton. *Biochem. J.* *351 Pt 2*, 429–437.
- Rosado, J.A., López, J.J., Harper, A.G.S., Harper, M.T., Redondo, P.C., Pariente, J.A., Sage, S.O., and Salido, G.M. (2004). Two pathways for store-mediated calcium entry differentially dependent on the actin cytoskeleton in human platelets. *J. Biol. Chem.* *279*, 29231–29235.
- Rosenberger, S., Thorey, I.S., Werner, S., and Boukamp, P. (2007). A novel regulator of telomerase. S100A8 mediates differentiation-dependent and calcium-induced inhibition of telomerase activity in the human epidermal keratinocyte line HaCaT. *J. Biol. Chem.* *282*, 6126–6135.
- Rosenfield, R.L., Deplewski, D., and Greene, M.E. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors and skin development. *Horm. Res.* *54*, 269–274.
- Ross, S.E., Hachisuka, J., and Todd, A.J. (2014). Spinal Microcircuits and the Regulation of Itch. In *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens, and T. Akiyama, eds. (Boca Raton (FL): CRC Press),.
- Rossi, D.J., Seita, J., Czechowicz, A., Bhattacharya, D., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2007). Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle Georget. Tex* *6*, 2371–2376.
- Rothgiesser, K.M., Erener, S., Waibel, S., Lüscher, B., and Hottiger, M.O. (2010). SIRT2 regulates NF-κB dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J. Cell Sci.* *123*, 4251–4258.

Rothwell, P.M., Fowkes, F.G.R., Belch, J.F.F., Ogawa, H., Warlow, C.P., and Meade, T.W. (2011). Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 377, 31–41.

Rubinsztein, D.C., Mariño, G., and Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell* 146, 682–695.

Rutberg, S.E., Saez, E., Lo, S., Jang, S.I., Markova, N., Spiegelman, B.M., and Yuspa, S.H. (1997). Opposing activities of c-Fos and Fra-2 on AP-1 regulated transcriptional activity in mouse keratinocytes induced to differentiate by calcium and phorbol esters. *Oncogene* 15, 1337–1346.

Rutter, G.A., Burnett, P., Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M., Pozzan, T., Tavares, J.M., and Denton, R.M. (1996). Subcellular imaging of intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> with recombinant targeted aequorin: significance for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5489–5494.

Saha, K., Adhikary, G., Kanade, S.R., Rorke, E.A., and Eckert, R.L. (2014). p38 $\delta$  regulates p53 to control p21<sup>Cip1</sup> expression in human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 289, 11443–11453.

Sakaki, K., Wu, J., and Kaufman, R.J. (2008). Protein kinase C $\theta$  is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 283, 15370–15380.

Sakuntabhai, A., Ruiz-Perez, V., Carter, S., Jacobsen, N., Burge, S., Monk, S., Smith, M., Munro, C.S., O'Donovan, M., Craddock, N., et al. (1999). Mutations in ATP2A2, encoding a Ca<sup>2+</sup> pump, cause Darier disease. *Nat. Genet.* 21, 271–277.

Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* 4, 166–175.

Salway, K.D., Gallagher, E.J., Page, M.M., and Stuart, J.A. (2011). Higher levels of heat shock proteins in longer-lived mammals and birds. *Mech. Ageing Dev.* 132, 287–297.

Samie, M., Wang, X., Zhang, X., Goschka, A., Li, X., Cheng, X., Gregg, E., Azar, M., Zhuo, Y., Garrity, A.G., et al. (2013). A TRP channel in the lysosome regulates large particle phagocytosis via focal exocytosis. *Dev. Cell* 26, 511–524.

Di Sano, F., Ferraro, E., Tufi, R., Achsel, T., Piacentini, M., and Cecconi, F. (2006). Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281, 2693–2700.

Santini, M.P., Talora, C., Seki, T., Bolgan, L., and Dotto, G.P. (2001). Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9575–9580.

- Satish, L., Blair, H.C., Glading, A., and Wells, A. (2005). Interferon-inducible protein 9 (CXCL11)-induced cell motility in keratinocytes requires calcium flux-dependent activation of mu-calpain. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1922–1941.
- Sauermann, K., Clemann, S., Jaspers, S., Gambichler, T., Altmeyer, P., Hoffmann, K., and Ennen, J. (2002). Age related changes of human skin investigated with histometric measurements by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI* 8, 52–56.
- Saul, S., Stanisiz, H., Backes, C.S., Schwarz, E.C., and Hoth, M. (2014). How ORAI and TRP channels interfere with each other: Interaction models and examples from the immune system and the skin. *Eur. J. Pharmacol.* 739, 49–59.
- Savignac, M., Simon, M., Edir, A., Guibbal, L., and Hovnanian, A. (2014). SERCA2 dysfunction in Darier disease causes endoplasmic reticulum stress and impaired cell-to-cell adhesion strength: rescue by Miglustat. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1961–1970.
- Scemes, E., Spray, D.C., and Meda, P. (2009). Connexins, pannexins, innexins: novel roles of “hemi-channels.” *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 457, 1207–1226.
- Schäfer, C., Rymarczyk, G., Ding, L., Kirber, M.T., and Bolotina, V.M. (2012). Role of molecular determinants of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (Orai1, phospholipase A2 group 6, and STIM1) in focal adhesion formation and cell migration. *J. Biol. Chem.* 287, 40745–40757.
- Schäffer, M., and Barbul, A. (1998). Lymphocyte function in wound healing and following injury. *Br. J. Surg.* 85, 444–460.
- Scherer, P.E., Lederkremer, G.Z., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H.F. (1996). Cab45, a novel (Ca<sup>2+</sup>)-binding protein localized to the Golgi lumen. *J. Cell Biol.* 133, 257–268.
- Schilling, W.P., and Goel, M. (2004). Mammalian TRPC channel subunit assembly. *Novartis Found. Symp.* 258, 18–30; discussion 30–43, 98–102, 263–266.
- Schindl, R., Fritsch, R., Jardin, I., Frischauf, I., Kahr, H., Muik, M., Riedl, M.C., Groschner, K., and Romanin, C. (2012). Canonical transient receptor potential (TRPC) 1 acts as a negative regulator for vanilloid TRPV6-mediated Ca<sup>2+</sup> influx. *J. Biol. Chem.* 287, 35612–35620.
- Schmuth, M., Elias, P.M., Hanley, K., Lau, P., Moser, A., Willson, T.M., Bikle, D.D., and Feingold, K.R. (2004). The effect of LXR activators on AP-1 proteins in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 123, 41–48.
- Schröder, J.-M., and Harder, J. (2006). Peptides antimicrobiens naturels cutanés. *MS Médecine Sci.* 22, 153–157.

- Schroeder, W.T., Thacher, S.M., Stewart-Galetka, S., Annarella, M., Chema, D., Siciliano, M.J., Davies, P.J., Tang, H.Y., Sowa, B.A., and Duvic, M. (1992). Type I keratinocyte transglutaminase: expression in human skin and psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *99*, 27–34.
- Schwarz, E.C., Wissenbach, U., Niemeyer, B.A., Strauss, B., Philipp, S.E., Flockerzi, V., and Hoth, M. (2006). TRPV6 potentiates calcium-dependent cell proliferation. *Cell Calcium* *39*, 163–173.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* *300*, 135–139.
- Sebastián, C., Satterstrom, F.K., Haigis, M.C., and Mostoslavsky, R. (2012). From sirtuin biology to human diseases: an update. *J. Biol. Chem.* *287*, 42444–42452.
- Seery, J.P., and Watt, F.M. (2000). Asymmetric stem-cell divisions define the architecture of human oesophageal epithelium. *Curr. Biol. CB* *10*, 1447–1450.
- Semsei, I. (2000). On the nature of aging. *Mech. Ageing Dev.* *117*, 93–108.
- Sena, L.A., and Chandel, N.S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* *48*, 158–167.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Severino, J., Allen, R.G., Balin, S., Balin, A., and Cristofalo, V.J. (2000). Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? *Exp. Cell Res.* *257*, 162–171.
- Sevini, F., Giuliani, C., Vianello, D., Giampieri, E., Santoro, A., Biondi, F., Garagnani, P., Passarino, G., Luiselli, D., Capri, M., et al. (2014). mtDNA mutations in human aging and longevity: controversies and new perspectives opened by high-throughput technologies. *Exp. Gerontol.* *56*, 234–244.
- Shapovalov, G., Lehen'kyi, V., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2011). TRP channels in cell survival and cell death in normal and transformed cells. *Cell Calcium* *50*, 295–302.
- Sharpless, N.E., and Depinho, R.A. (2007). How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 703–713.
- Shaw, B.E., Arguello, R., Garcia-Sepulveda, C.A., and Madrigal, J.A. (2010). The impact of HLA genotyping on survival following unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. *Br. J. Haematol.* *150*, 251–258.



- Sheikh, M.S., Ramirez, A., Emmett, M., Santa Ana, C., Schiller, L.R., and Fordtran, J.S. (1988). Role of vitamin D-dependent and vitamin D-independent mechanisms in absorption of food calcium. *J. Clin. Invest.* *81*, 126–132.
- Shen, B., Zhu, J., Zhang, J., Jiang, F., Wang, Z., Zhang, Y., Li, J., Huang, D., Ke, D., Ma, R., et al. (2013). Attenuated mesangial cell proliferation related to store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in aged rat: the role of STIM 1 and Orai 1. *Age Dordr. Neth.* *35*, 2193–2202.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* *102*, 407–410.
- Shi, Y., Ding, X., He, Z.-H., Zhou, K.-C., Wang, Q., and Wang, Y.-Z. (2009). Critical role of TRPC6 channels in G2 phase transition and the development of human oesophageal cancer. *Gut* *58*, 1443–1450.
- Shirakata, Y. (2010). Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J. Dermatol. Sci.* *59*, 73–80.
- Shull, G.E., Miller, M.L., and Prasad, V. (2011). Secretory pathway stress responses as possible mechanisms of disease involving Golgi Ca<sup>2+</sup> pump dysfunction. *BioFactors Oxf. Engl.* *37*, 150–158.
- Sieg, D.J., Hauck, C.R., and Schlaepfer, D.D. (1999). Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *J. Cell Sci.* *112* ( Pt 16), 2677–2691.
- Skerrow, C.J., Clelland, D.G., and Skerrow, D. (1989). Changes to desmosomal antigens and lectin-binding sites during differentiation in normal human epidermis: a quantitative ultrastructural study. *J. Cell Sci.* *92* ( Pt 4), 667–677.
- Skryma, R., Mariot, P., Bourhis, X.L., Coppenolle, F.V., Shuba, Y., Vanden Abeele, F., Legrand, G., Humez, S., Boilly, B., and Prevarskaya, N. (2000). Store depletion and store-operated Ca<sup>2+</sup> current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis. *J. Physiol.* *527 Pt 1*, 71–83.
- Slack, C., Giannakou, M.E., Foley, A., Goss, M., and Partridge, L. (2011). dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in *Drosophila*. *Aging Cell* *10*, 735–748.
- Smani, T., Dionisio, N., López, J.J., Berna-Erro, A., and Rosado, J.A. (2014). Cytoskeletal and scaffolding proteins as structural and functional determinants of TRP channels. *Biochim. Biophys. Acta* *1838*, 658–664.
- Smeets, S.J., van der Plas, M., Schaaij-Visser, T.B.M., van Veen, E.A.M., van Meerloo, J., Braakhuis, B.J.M., Steenbergen, R.D.M., and Brakenhoff, R.H. (2011). Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *128*, 1596–1605.

- Snow, S.N., Sahl, W., Lo, J.S., Mohs, F.E., Warner, T., Dekkinga, J.A., and Feyzi, J. (1994). Metastatic basal cell carcinoma. Report of five cases. *Cancer* 73, 328–335.
- Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., and Konishi, F. (2009). Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Exp. Gerontol.* 44, 727–732.
- Sopjani, M., Kunert, A., Czarkowski, K., Klaus, F., Laufer, J., Föller, M., and Lang, F. (2010). Regulation of the Ca(2+) channel TRPV6 by the kinases SGK1, PKB/Akt, and PIKfyve. *J. Membr. Biol.* 233, 35–41.
- Spandau, D.F. (1994). Distinct conformations of p53 are observed at different stages of keratinocyte differentiation. *Oncogene* 9, 1861–1868.
- Spates, S.T., Mellette, J.R., and Fitzpatrick, J. (2003). Metastatic basal cell carcinoma. *Dermatol. Surg. Off. Publ. Am. Soc. Dermatol. Surg. Al* 29, 650–652.
- Srikanth, S., Kim, K.-D., and Gwack, Y. (2014). Methods to measure cytoplasmic and mitochondrial Ca(2+) concentration using Ca(2+)-sensitive dyes. *Methods Enzymol.* 543, 1–20.
- Stanisz, H., Stark, A., Kilch, T., Schwarz, E.C., Müller, C.S.L., Peinelt, C., Hoth, M., Niemeyer, B.A., Vogt, T., and Bogeski, I. (2012). ORAI1 Ca(2+) channels control endothelin-1-induced mitogenesis and melanogenesis in primary human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1443–1451.
- Stanley, J.R. (2012). Synergy of understanding dermatologic disease and epidermal biology. *J. Clin. Invest.* 122, 436–439.
- Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2109–2117.
- Steinberg, S.F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.* 88, 1341–1378.
- Steinhardt, M. (1985). Effect of donor age on clonal differentiation of human skin fibroblasts in vitro. *Gerontology* 31, 27–38.
- Steinhoff, M., and Bíró, T. (2009). A TR(I)P to pruritus research: role of TRPV3 in inflammation and itch. *J. Invest. Dermatol.* 129, 531–535.
- Stiber, J., Hawkins, A., Zhang, Z.-S., Wang, S., Burch, J., Graham, V., Ward, C.C., Seth, M., Finch, E., Malouf, N., et al. (2008). STIM1 signalling controls store-operated calcium entry required for development and contractile function in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 10, 688–697.

Strong, R., Miller, R.A., Astle, C.M., Floyd, R.A., Flurkey, K., Hensley, K.L., Javors, M.A., Leeuwenburgh, C., Nelson, J.F., Ongini, E., et al. (2008). Nordihydroguaiaretic acid and aspirin increase lifespan of genetically heterogeneous male mice. *Aging Cell* 7, 641–650.

Stupack, D.G., and Cheresch, D.A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115, 3729–3738.

Styles, R.A., Neal, D.E., and Powell, P.H. (1988). Reproducibility of measurement of prostatic volume by ultrasound. Comparison of transrectal and transabdominal methods. *Eur. Urol.* 14, 266–269.

Su, M.J., Bikle, D.D., Mancianti, M.L., and Pillai, S. (1994). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *J. Biol. Chem.* 269, 14723–14729.

Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., Sugai, M., and Furuse, M. (2013). Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J. Dermatol. Sci.* 70, 12–18.

Sulk, M., Seeliger, S., Aubert, J., Schwab, V.D., Cevikbas, F., Rivier, M., Nowak, P., Voegel, J.J., Buddenkotte, J., and Steinhoff, M. (2012). Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1253–1262.

Sun, T.T., and Green, H. (1976). Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell* 9, 511–521.

Sun, T.T., and Green, H. (1978). Keratin filaments of cultured human epidermal cells. Formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. *J. Biol. Chem.* 253, 2053–2060.

Sun, T., McMinn, P., Coakley, S., Holcombe, M., Smallwood, R., and Macneil, S. (2007). An integrated systems biology approach to understanding the rules of keratinocyte colony formation. *J. R. Soc. Interface R. Soc.* 4, 1077–1092.

Sun, X.-D., You, Y., Zhang, L., Zheng, S., Hong, Y., Li, J., and Gao, X.-H. (2012). The possible role of TRPC6 in atopic dermatitis. *Med. Hypotheses* 78, 42–44.

Suzuki, J., Kanemaru, K., Ishii, K., Ohkura, M., Okubo, Y., and Iino, M. (2014). Imaging intraorganellar Ca<sup>2+</sup> at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun.* 5, 4153.

Swindell, W.R., Masternak, M.M., Kopchick, J.J., Conover, C.A., Bartke, A., and Miller, R.A. (2009). Endocrine regulation of heat shock protein mRNA levels in long-lived dwarf mice. *Mech. Ageing Dev.* 130, 393–400.

Swindell, W.R., Johnston, A., Sun, L., Xing, X., Fisher, G.J., Bulyk, M.L., Elder, J.T., and Gudjonsson, J.E. (2012). Meta-profiles of gene expression during aging: limited similarities

between mouse and human and an unexpectedly decreased inflammatory signature. *PLoS One* 7, e33204.

Sybert, V.P., Dale, B.A., and Holbrook, K.A. (1985). Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *J. Invest. Dermatol.* 84, 191–194.

Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnóczy, G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.* 18, 6349–6361.

Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7, 880–885.

Szewczuk, M.R., and Campbell, R.J. (1980). Loss of immune competence with age may be due to auto-anti-idiotypic antibody regulation. *Nature* 286, 164–166.

Takuwa, N., Zhou, W., Kumada, M., and Takuwa, Y. (1993). Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 268, 138–145.

Takuwa, N., Zhou, W., and Takuwa, Y. (1995). Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell. Signal.* 7, 93–104.

Talens, R.P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H.E.D., Slagboom, P.E., Boomsma, D.I., and Heijmans, B.T. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11, 694–703.

Talmage, R.V., Lester, G.E., and Hirsch, P.F. (2000). Parathyroid hormone and plasma calcium control: an editorial. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 1, 121–126.

Taparia, S., Fleet, J.C., Peng, J.-B., Wang, X.D., and Wood, R.J. (2006). 1,25-Dihydroxyvitamin D and 25-hydroxyvitamin D--mediated regulation of TRPV6 (a putative epithelial calcium channel) mRNA expression in Caco-2 cells. *Eur. J. Nutr.* 45, 196–204.

Tavadia, S., Authi, K.S., Hodgins, M.B., and Munro, C.S. (2004). Expression of the sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase type 2 and 3 isoforms in normal skin and Darier's disease. *Br. J. Dermatol.* 151, 440–445.

Taylor, C.W., and Tovey, S.C. (2012). From parathyroid hormone to cytosolic Ca<sup>2+</sup> signals. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 147–152.

Thebault, S., Roudbaraki, M., Sydorenko, V., Shuba, Y., Lemonnier, L., Slomianny, C., Dewailly, E., Bonnal, J.-L., Mauroy, B., Skryma, R., et al. (2003). Alpha1-adrenergic receptors activate Ca(2+)-permeable cationic channels in prostate cancer epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 111, 1691–1701.

- Thomas, A.P., Bird, G.S., Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L.D., and Putney, J.W. (1996). Spatial and temporal aspects of cellular calcium signaling. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *10*, 1505–1517.
- Tilstra, J.S., Robinson, A.R., Wang, J., Gregg, S.Q., Clauson, C.L., Reay, D.P., Nasto, L.A., St Croix, C.M., Usas, A., Vo, N., et al. (2012). NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 2601–2612.
- Tischler, A.S., Powers, J.F., Downing, J.C., Riseberg, J.C., Shahsavari, M., Ziar, J., and McClain, R.M. (1996). Vitamin D3, lactose, and xylitol stimulate chromaffin cell proliferation in the rat adrenal medulla. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *140*, 115–123.
- Tissenbaum, H.A., and Guarente, L. (2001). Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *410*, 227–230.
- Tomaru, U., Takahashi, S., Ishizu, A., Miyatake, Y., Gohda, A., Suzuki, S., Ono, A., Ohara, J., Baba, T., Murata, S., et al. (2012). Decreased proteasomal activity causes age-related phenotypes and promotes the development of metabolic abnormalities. *Am. J. Pathol.* *180*, 963–972.
- Ton, V.-K., Mandal, D., Vahadji, C., and Rao, R. (2002). Functional expression in yeast of the human secretory pathway Ca(2+), Mn(2+)-ATPase defective in Hailey-Hailey disease. *J. Biol. Chem.* *277*, 6422–6427.
- Tóth, B.I., Oláh, A., Szöllősi, A.G., and Bíró, T. (2014). TRP channels in the skin. *Br. J. Pharmacol.* *171*, 2568–2581.
- Treiber, N., Maity, P., Singh, K., Ferchiu, F., Wlaschek, M., and Scharffetter-Kochanek, K. (2012). The role of manganese superoxide dismutase in skin aging. *Dermatoendocrinol.* *4*, 232–235.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* *429*, 417–423.
- Tsutsumi, M., Inoue, K., Denda, S., Ikeyama, K., Goto, M., and Denda, M. (2009). Mechanical-stimulation-evoked calcium waves in proliferating and differentiated human keratinocytes. *Cell Tissue Res.* *338*, 99–106.
- Tsutsumi, M., Kitahata, H., Nakata, S., Sanno, Y., Nagayama, M., and Denda, M. (2010). Mathematical analysis of intercellular calcium propagation induced by adenosine triphosphate. *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI* *16*, 146–150.

- Tu, C.-L., and Bikle, D.D. (2013). Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 415–427.
- Tu, C.-L., Chang, W., and Bikle, D.D. (2005). Phospholipase cgamma1 is required for activation of store-operated channels in human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 124, 187–197.
- Tu, C.-L., Chang, W., Xie, Z., and Bikle, D.D. (2008). Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 283, 3519–3528.
- Tu, C.-X., Lin, M., Lu, S.-S., Qi, X.-Y., Zhang, R.-X., and Zhang, Y.-Y. (2012). Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes. *Phytother. Res. PTR* 26, 174–179.
- Tummala, R., Romano, R.-A., Fuchs, E., and Sinha, S. (2003). Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family. *Gene* 321, 93–102.
- 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.
- Vanden Abeele, F., Roudbaraki, M., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2003). Store-operated Ca<sup>2+</sup> current in prostate cancer epithelial cells. Role of endogenous Ca<sup>2+</sup> transporter type 1. *J. Biol. Chem.* 278, 15381–15389.
- Vanoverberghe, K., Vanden Abeele, F., Mariot, P., Lepage, G., Roudbaraki, M., Bonnal, J.L., Mauroy, B., Shuba, Y., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2004). Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptotic resistance of neuroendocrine-differentiated prostate cancer cells. *Cell Death Differ.* 11, 321–330.
- Varela, I., Cadiñanos, J., Pendás, A.M., Gutiérrez-Fernández, A., Folgueras, A.R., Sánchez, L.M., Zhou, Z., Rodríguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A., et al. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437, 564–568.
- Velarde, M.C., Flynn, J.M., Day, N.U., Melov, S., and Campisi, J. (2012). Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging* 4, 3–12.
- Velnar, T., Bailey, T., and Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 37, 1528–1542.
- Venkatachalam, K., and Montell, C. (2007). TRP channels. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 387–417.

- Vennekens, R., Hoenderop, J.G., Prenen, J., Stuiver, M., Willems, P.H., Droogmans, G., Nilius, B., and Bindels, R.J. (2000). Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca(2+) channel. *J. Biol. Chem.* 275, 3963–3969.
- Verma, A., and Mehta, K. (2007). Transglutaminase-mediated activation of nuclear transcription factor-kappaB in cancer cells: a new therapeutic opportunity. *Curr. Cancer Drug Targets* 7, 559–565.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T.M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., et al. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* 477, 90–94.
- Viola, J.P.B., Carvalho, L.D.S., Fonseca, B.P.F., and Teixeira, L.K. (2005). NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 38, 335–344.
- Voets, T., Janssens, A., Droogmans, G., and Nilius, B. (2004). Outer pore architecture of a Ca<sup>2+</sup>-selective TRP channel. *J. Biol. Chem.* 279, 15223–15230.
- Walker, G.A., and Lithgow, G.J. (2003). Lifespan extension in *C. elegans* by a molecular chaperone dependent upon insulin-like signals. *Aging Cell* 2, 131–139.
- Waller, J.M., and Maibach, H.I. (2005). Age and skin structure and function, a quantitative approach (I): blood flow, pH, thickness, and ultrasound echogenicity. *Skin Res. Technol. Off. J. Int. Soc. Bioeng. Skin ISBS Int. Soc. Digit. Imaging Skin ISDIS Int. Soc. Skin Imaging ISSI* 11, 221–235.
- Walters, J.R.F., Barley, N.F., Khanji, M., and Rhodes-Kendler, O. (2004). Duodenal expression of the epithelial calcium transporter gene TRPV6: is there evidence for Vitamin D-dependence in humans? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 89-90, 317–319.
- Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* 8, 311–323.
- Wang, D., Liu, P., Yang, Y., and Shen, L. (2010). Formation of a combined Ca/Cd toxicity on lifespan of nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1221–1230.
- Wang, H.-C., Hsieh, S.-C., Yang, J.-H., Lin, S.-Y., and Sheen, L.-Y. (2012). Diallyl trisulfide induces apoptosis of human basal cell carcinoma cells via endoplasmic reticulum stress and the mitochondrial pathway. *Nutr. Cancer* 64, 770–780.
- Wang, T.-T., Tavera-Mendoza, L.E., Laperriere, D., Libby, E., MacLeod, N.B., Nagai, Y., Bourdeau, V., Konstorum, A., Lallemand, B., Zhang, R., et al. (2005). Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> target genes. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 19, 2685–2695.

- Wang, X., Bolotin, D., Chu, D.H., Polak, L., Williams, T., and Fuchs, E. (2006). AP-2alpha: a regulator of EGF receptor signaling and proliferation in skin epidermis. *J. Cell Biol.* *172*, 409–421.
- Wang, X., Pasolli, H.A., Williams, T., and Fuchs, E. (2008). AP-2 factors act in concert with Notch to orchestrate terminal differentiation in skin epidermis. *J. Cell Biol.* *183*, 37–48.
- Wang, Y., Mattson, M.P., and Furukawa, K. (2002). Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J. Neurochem.* *82*, 945–952.
- Wang, Y., Bruce, A.T., Tu, C., Ma, K., Zeng, L., Zheng, P., Liu, Y., and Liu, Y. (2011). Protein aggregation of SERCA2 mutants associated with Darier disease elicits ER stress and apoptosis in keratinocytes. *J. Cell Sci.* *124*, 3568–3580.
- Warskulat, U., Brookmann, S., Reinen, A., and Häussinger, D. (2007). Ultraviolet B radiation induces cell shrinkage and increases osmolyte transporter mRNA expression and osmolyte uptake in HaCaT keratinocytes. *Biol. Chem.* *388*, 1345–1352.
- Wasilenko, W.J., Palad, A.J., Somers, K.D., Blackmore, P.F., Kohn, E.C., Rhim, J.S., Wright, G.L., and Schellhammer, P.F. (1996). Effects of the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole on the proliferation and invasiveness of human prostate tumor cell lines. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *68*, 259–264.
- Watt, F.M. (2002). NEW EMBO MEMBER'S REVIEW. *EMBO J.* *21*, 3919–3926.
- Wei, Y., Zhang, Y.-J., and Cai, Y. (2013). Growth or longevity: the TOR's decision on lifespan regulation. *Biogerontology* *14*, 353–363.
- Weisenberg, R.C. (1972). Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science* *177*, 1104–1105.
- Welter, J.F., and Eckert, R.L. (1995). Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation. *Oncogene* *11*, 2681–2687.
- Westheimer, F.H. (1987). Why nature chose phosphates. *Science* *235*, 1173–1178.
- Whitaker, M., and Larman, M.G. (2001). Calcium and mitosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *12*, 53–58.
- Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., Ferrand, M., Prevarskaya, N., Simonnet, H., Vindrieux, D., et al. (2014a). Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Commun.* *5*, 3792.



- Wiel, C., Lallet-Daher, H., Gitenay, D., Gras, B., Le Calvé, B., Augert, A., Ferrand, M., Prevarskaya, N., Simonnet, H., Vindrieux, D., et al. (2014b). Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat. Commun.* *5*, 3792.
- Wilkinson, J.E., Burmeister, L., Brooks, S.V., Chan, C.-C., Friedline, S., Harrison, D.E., Hejtmancik, J.F., Nadon, N., Strong, R., Wood, L.K., et al. (2012). Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell* *11*, 675–682.
- Woelfle, U., Laszczyk, M.N., Kraus, M., Leuner, K., Kersten, A., Simon-Haarhaus, B., Scheffler, A., Martin, S.F., Müller, W.E., Nashan, D., et al. (2010). Triterpenes promote keratinocyte differentiation in vitro, ex vivo and in vivo: a role for the transient receptor potential canonical (subtype) 6. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 113–123.
- Wolf, M.T.F., Wu, X.-R., and Huang, C.-L. (2013). Uromodulin upregulates TRPV5 by impairing caveolin-mediated endocytosis. *Kidney Int.* *84*, 130–137.
- Worman, H.J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *J. Pathol.* *226*, 316–325.
- Wozniak, M.A., Modzelewska, K., Kwong, L., and Keely, P.J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta* *1692*, 103–119.
- Wray, S., and Burdyga, T. (2010). Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol. Rev.* *90*, 113–178.
- Wu, S., Sangerman, J., Li, M., Brough, G.H., Goodman, S.R., and Stevens, T. (2001). Essential control of an endothelial cell ISOC by the spectrin membrane skeleton. *J. Cell Biol.* *154*, 1225–1233.
- Wu, Y., Palad, A.J., Wasilenko, W.J., Blackmore, P.F., Pincus, W.A., Schechter, G.L., Spoonster, J.R., Kohn, E.C., and Somers, K.D. (1997). Inhibition of head and neck squamous cell carcinoma growth and invasion by the calcium influx inhibitor carboxyamido-triazole. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *3*, 1915–1921.
- Wysocki, A.B. (1999). Skin anatomy, physiology, and pathophysiology. *Nurs. Clin. North Am.* *34*, 777–797, v.
- Xiao, R., Zhang, B., Dong, Y., Gong, J., Xu, T., Liu, J., and Xu, X.Z.S. (2013). A genetic program promotes *C. elegans* longevity at cold temperatures via a thermosensitive TRP channel. *Cell* *152*, 806–817.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S.M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J.M., Lam, C.W., Hynes, M., Goddard, A., et al. (1998). Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature* *391*, 90–92.

- Xu, S., and Chisholm, A.D. (2014). *C. elegans* Epidermal Wounding Induces a Mitochondrial ROS Burst that Promotes Wound Repair. *Dev. Cell* 31, 48–60.
- Xu, S., Cai, Y., and Wei, Y. (2014). mTOR Signaling from Cellular Senescence to Organismal Aging. *Aging Dis.* 5, 263–273.
- Yabe, D., Nakamura, T., Kanazawa, N., Tashiro, K., and Honjo, T. (1997). Calumenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein retained in the endoplasmic reticulum with a novel carboxyl-terminal sequence, HDEF. *J. Biol. Chem.* 272, 18232–18239.
- Yamauchi, D., Raveendran, N.N., Pondugula, S.R., Kampalli, S.B., Sanneman, J.D., Harbidge, D.G., and Marcus, D.C. (2005). Vitamin D upregulates expression of ECaC1 mRNA in semicircular canal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 1353–1357.
- Yáñez, M., Gil-Longo, J., and Campos-Toimil, M. (2012). Calcium binding proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 461–482.
- Yang, L.C., Ng, D.C., and Bikle, D.D. (2003). Role of protein kinase C alpha in calcium induced keratinocyte differentiation: defective regulation in squamous cell carcinoma. *J. Cell. Physiol.* 195, 249–259.
- 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.
- Yap, K.L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., and Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *J. Struct. Funct. Genomics* 1, 8–14.
- Yaswen, P., and Campisi, J. (2007). Oncogene-induced senescence pathways weave an intricate tapestry. *Cell* 128, 233–234.
- Yates, L.L., and Górecki, D.C. (2006). The nuclear factor-kappaB (NF-kappaB): from a versatile transcription factor to a ubiquitous therapeutic target. *Acta Biochim. Pol.* 53, 651–662.
- Yegorov, Y.E., and Zelenin, A.V. (2003). Duration of senescent cell survival in vitro as a characteristic of organism longevity, an additional to the proliferative potential of fibroblasts. *FEBS Lett.* 541, 6–10.
- Yokomichi, N., Nagasawa, T., Coler-Reilly, A., Suzuki, H., Kubota, Y., Yoshioka, R., Tozawa, A., Suzuki, N., and Yamaguchi, Y. (2013). Pathogenesis of Hand-Foot Syndrome induced by PEG-modified liposomal Doxorubicin. *Hum. Cell* 26, 8–18.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J. Biol. Chem.* 276, 13935–13940.

- Young, A.P., Schlisio, S., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., and Kaelin, W.G. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.* *10*, 361–369.
- Youssef, K.K., Van Keymeulen, A., Lapouge, G., Beck, B., Michaux, C., Achouri, Y., Sotiropoulou, P.A., and Blanpain, C. (2010). Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat. Cell Biol.* *12*, 299–305.
- Yuan, H., Kaneko, T., and Matsuo, M. (1995). Relevance of oxidative stress to the limited replicative capacity of cultured human diploid cells: the limit of cumulative population doublings increases under low concentrations of oxygen and decreases in response to aminotriazole. *Mech. Ageing Dev.* *81*, 159–168.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Huang, G.N., Worley, P.F., and Muallem, S. (2007). STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat. Cell Biol.* *9*, 636–645.
- Yuan, J.P., Zeng, W., Dorwart, M.R., Choi, Y.-J., Worley, P.F., and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat. Cell Biol.* *11*, 337–343.
- Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M., and Kiyono, T. (2007). Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 3732–3742.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Eisenstein, M., and Kimchi, A. (2009a). Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* *5*, 720–722.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009b). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* *10*, 285–292.
- Zamansky, G.B., Nguyen, U., and Chou, I.N. (1991). An immunofluorescence study of the calcium-induced coordinated reorganization of microfilaments, keratin intermediate filaments, and microtubules in cultured human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* *97*, 985–994.
- Zampieri, M., Ciccarone, F., Guastafierro, T., Bacalini, M.G., Calabrese, R., Moreno-Villanueva, M., Reale, A., Chevanne, M., Bürkle, A., and Caiafa, P. (2010). Validation of suitable internal control genes for expression studies in aging. *Mech. Ageing Dev.* *131*, 89–95.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2006). Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Handb. Exp. Pharmacol.* 69–91.

- Zhang, G., Li, J., Purkayastha, S., Tang, Y., Zhang, H., Yin, Y., Li, B., Liu, G., and Cai, D. (2013a). Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH. *Nature* 497, 211–216.
- Zhang, Q., Bengtsson, M., Partridge, C., Salehi, A., Braun, M., Cox, R., Eliasson, L., Johnson, P.R.V., Renström, E., Schneider, T., et al. (2007). R-type Ca(2+)-channel-evoked CICR regulates glucose-induced somatostatin secretion. *Nat. Cell Biol.* 9, 453–460.
- Zhang, S.-S., Wen, J., Yang, F., Cai, X.-L., Yang, H., Luo, K.-J., Liu, Q.W., Hu, R.-G., Xie, X., Huang, Q.-Y., et al. (2013b). High expression of transient potential receptor C6 correlated with poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 30, 607.
- Zhang, Y., Ikeno, Y., Qi, W., Chaudhuri, A., Li, Y., Bokov, A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Epstein, C., Richardson, A., et al. (2009). Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 64, 1212–1220.
- Zhao, X., Weisleder, N., Thornton, A., Oppong, Y., Campbell, R., Ma, J., and Brotto, M. (2008). Compromised store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in aged skeletal muscle. *Aging Cell* 7, 561–568.
- Zhao, X.S., Shin, D.M., Liu, L.H., Shull, G.E., and Muallem, S. (2001). Plasticity and adaptation of Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytosis in SERCA2(+/-) mice. *EMBO J.* 20, 2680–2689.
- Zhao, X.Y., Ly, L.H., Peehl, D.M., and Feldman, D. (1997). 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> actions in LNCaP human prostate cancer cells are androgen-dependent. *Endocrinology* 138, 3290–3298.
- Zholos, A.V. (2014). TRPC5. *Handb. Exp. Pharmacol.* 222, 129–156.
- Zholos, A., Beck, B., Sydorenko, V., Lemonnier, L., Bordat, P., Prevarskaya, N., and Skryma, R. (2005). Ca(2+)- and volume-sensitive chloride currents are differentially regulated by agonists and store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *J. Gen. Physiol.* 125, 197–211.
- Zhou, Y., Meraner, P., Kwon, H.T., Machnes, D., Oh-hora, M., Zimmer, J., Huang, Y., Stura, A., Rao, A., and Hogan, P.G. (2010a). STIM1 gates the store-operated calcium channel ORAI1 in vitro. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 112–116.
- Zhou, Y., Ramachandran, S., Oh-Hora, M., Rao, A., and Hogan, P.G. (2010b). Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4896–4901.

Zhu, H., Zhang, H., Jin, F., Fang, M., Huang, M., Yang, C.S., Chen, T., Fu, L., and Pan, Z. (2014). Elevated Orai1 expression mediates tumor-promoting intracellular Ca<sup>2+</sup> oscillations in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 5, 3455–3471.

Zouboulis, C.C., and Boschnakow, A. (2001). Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. *Clin. Exp. Dermatol.* 26, 600–607.